

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Controle do bolor verde ...
1999 TS-PP-1999.00428



CNPMA-3682-1

**CONTROLE DO BOLOR VERDE (*Penicillium digitatum*) EM PÓS-
COLHEITA DE CITROS COM PRODUTOS ALTERNATIVOS**

DANIEL ANDRADE DE SIQUEIRA FRANCO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

0428
1999
TS-PP-1999.00428

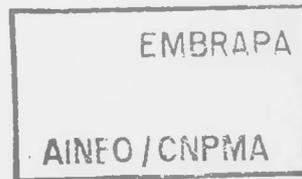
BOTUCATU - SP
Fevereiro - 1999

TS

428

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE DO BOLOR VERDE (*Penicillium digitatum*) EM PÓS-
COLHEITA DE CITROS COM PRODUTOS ALTERNATIVOS**



DANIEL ANDRADE DE SIQUEIRA FRANCO

Orientador: Prof. Dr. Wagner Bettiol

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 1999

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - "JOSÉ CARLOS DE OLIVEIRA"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÔNOMICAS
BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

FICHA CATALOGráfICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIRETORIA DE SERVIÇO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - FCA
UNESP - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Franco, Daniel Andrade de Siqueira
F825c Controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em
pós-colheita de citros com produtos alternativos /
Daniel Andrade de Siqueira Franco. -- Botucatu, 1999
ix, 103 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) -- Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu,
1999

Orientador: Wagner Bettiol
Bibliografia: f. 84-100

1. Citros - Pós-colheita - Doença - Bolor verde
2. Citros - Pós-colheita - Controle biológico - Aditi-
vos
3. Citros - Pós-colheita - Controle biológico -
Extratos naturais
4. Bolor verde - Controle biológico
5. Laranja Pêra - Pós-colheita - Doença I. Título

CDD(21) 634.3194654

Palavras-chave: Bolor verde; Citros; *Penicillium digitatum*;
Bicarbonato de sódio; Ácido bórico; Controle
biológico; Pós-colheita; Sorbato de potássio;
Metabissulfito de sódio; *Cymbopogon citratus*;
Gliocadium roseum; Fungicida; Laranja Pêra.

TÍT

AU

OR

Apr

Da

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	IX
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	4
3 INTRODUÇÃO	7
4 REVISÃO DE LITERATURA	11
4.1 Bolor Verde dos citros	11
4.1.1 Sintomas	11
4.1.2 Etiologia	12
4.1.3 Controle	14
- Preventivo	14
- Físico.....	15
- Químico.....	15
- Biológico	19
4.2 Controle Alternativo do Bolor Verde dos citros	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 Isolamento do fungo	38
5.2 Teste de patogenicidade	39
5.2.1 Inóculo.....	39
5.2.2 Inoculação dos frutos	39

5.3 Comparação do método do flavedo na germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i> com outros métodos.....	40
5.4 Ensaios em tecido de flavedo para avaliar o efeito de produtos alternativos na inibição da germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i>	42
5.5 Seleção de produtos alternativos <i>in vivo</i>	45
5.5.1 Primeiro ensaio <i>in vivo</i>	49
5.5.2 Segundo ensaio <i>in vivo</i>	49
5.5.3 Terceiro ensaio <i>in vivo</i>	50
5.5.4 Quarto ensaio <i>in vivo</i>	51
5.5.5 Quinto ensaio <i>in vivo</i>	52
5.5.6 Sexto ensaio <i>in vivo</i>	52
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
6.1 Isolamento e teste de patogenicidade.....	54
6.2 Comparação do método do flavedo na germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i> com outros métodos.....	54
6.3 Ensaios em tecido de flavedo para avaliar o efeito de produtos alternativos na inibição da germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i>	58
6.4 Seleção de produtos alternativos <i>in vivo</i>	61
6.4.1 Primeiro ensaio	61
6.4.2 Segundo ensaio	62
6.4.3 Terceiro ensaio	63
6.4.4 Quarto ensaio	66
6.4.5 Quinto ensaio	70

6.4.6 Sexto ensaio 71

7 CONCLUSÕES..... 83

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

APÊNDICE 101

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Comparação do método do flavedo na germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i> com outros métodos.....	55
2 Efeito de diferentes produtos na germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i> , utilizando o método do flavedo após 21 h de incubação.....	59
3 Seleção de produtos alternativos para o controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra'.....	63
4 Seleção de produtos alternativos para o controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra'.....	64
5 Seleção de produtos alternativos para o controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra'.....	65
6 Seleção de produtos alternativos para o controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra'.....	67
7 Valores do pH das soluções utilizadas no quarto ensaio em frutos de laranja 'Pêra'.....	69
8 Seleção de produtos alternativos para o controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra'.....	71
9 Seleção de produtos alternativos para o controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra'.....	72

1 RESUMO

A ocorrência de podridões pós-colheita em frutos de citros causa perdas significativas, sendo maiores em países onde não se empregam adequadas tecnologias em pós-colheita. O controle das podridões é realizado, principalmente em frutos cítricos destinados a exportação, armazenamento e/ou desverdecimento, com fungicidas. Porém, devido a preocupação com os riscos de contaminação ambiental e intoxicação humana; ao surgimento de isolados fúngicos resistentes aos fungicidas; e a recente proibição da utilização desses produtos, em pós-colheita, em alguns mercados consumidores; haverá maiores restrições ao uso dos fungicidas, não havendo substitutos viáveis até o momento. Deste modo, elaborou-se este trabalho com o objetivo de avaliar o efeito de produtos alternativos aos fungicidas no controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós colheita de citros, tendo sido testado os seguintes produtos: ácidos acetilsalicílico, salicílico, tartárico, málico, ascórbico, bórico, cítrico, glutâmico, glutamato monossódico; bicarbonato, carbonato e metabissulfito de sódio e potássio; sorbato de potássio; benzoato de sódio; alanina; asparagina; cisteína; lisina; glicina; fenilalanina; prolina; tirosina; triptofano; metionina, isoleucina, óleos

de soja, de eucalipto, de milho, de amêndoas, de oliva, de canola, de girassol, de *Cymbopogon citratus*, de *Vanillosmopsis erytropapa*, extratos de pó-de-guarana, de *Azadiracta indica*, de *Calendula officinarum*, de *Chenopodium ambrosioides*, própolis, Lonlife; leite cru; lecitina; suspensão de sais; vinagre; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Trichoderma harzianum*; *Gliocladium roseum*; *Gliocladium virens*; *Lactobacillus*; Tween 20 e 80; Agral; thiabendazole; prochloraz e imazalil. Para tanto, *in vitro* foi avaliado o potencial de inibição da germinação de conídios de *P. digitatum* e *in vivo*, o de controlar o bolor verde em frutos de laranja 'Pera'.

O efeito dos produtos alternativos, na inibição da germinação de conídios de *P. digitatum*, foi avaliado pelo método desenvolvido no presente trabalho, denominado método do flavedo. O método consiste em: colocar três discos de 12 mm de diâmetro de flavedo de laranja sobre lâminas de microscopia, e sobre estes três gotas de 20 µL de suspensão de inóculo (1×10^5 conídios.mL⁻¹) e, a seguir, 20 µL da suspensão do produto a ser testado; incubar o conjunto em câmara úmida a 25±2°C, no escuro; e avaliar a germinação em microscópio ótico após 21 horas de incubação, adicionando-se uma gota de azul de lactofenol em cada disco do flavedo. Os resultados mostraram que metabissulfito de sódio e potássio a 1% (p/v), carbonato e sorbato de potássio a 1% (p/v), cisteína a 1% (p/v), ácido bórico a 1% (p/v), vinagre a 20 e 30% (v/v), benzoato de sódio a 1500 µ.g.mL⁻¹, prochloraz e imazalil a 1500 µ.L.mL⁻¹ inibiram em 100% a germinação dos conídios de *P. digitatum*.

O efeito dos produtos alternativos no controle da doença foi avaliado em ensaios realizados em laranja 'Pera'. Cada tratamento foi composto por 10 frutos feridos, com um tubo vazado (três milímetros de diâmetro), em dois pontos opostos na região equatorial do fruto, a uma profundidade de, mais ou menos, dois milímetros, atingindo a

região do albedo. Após o fermento, os frutos foram inoculados com 20 μL da suspensão de conídios de *P. digitatum* contendo 1×10^6 conídios. mL^{-1} . Em seguida, em cada fermento, foram aplicados 20 μL da suspensão de um produto dos produtos alternativos, de acordo com o tratamento. Os produtos foram testados ainda em diferentes concentrações e misturas para verificar possível sinergismo. Os produtos alternativos foram comparados com o tratamento com e sem inoculação do patógeno, e com os fungicidas padrões. Os frutos foram incubados a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, a 85-90% de UR e com fotoperíodo de 12 horas de luz, sendo avaliados cinco, seis ou sete dias após a inoculação. Os resultados mostraram que bicarbonato de sódio a 2 e 3% (p/v), carbonato de sódio a 1% (p/v), ácido bórico a 2% (p/v), sorbato de potássio a 1% (p/v), metabissulfito de sódio a 1% (p/v), óleo de *Cymbopogon citratus* a 5% (v/v) mais Tween 80 a 1,7% (v/v) e *Gliocladium roseum* ($8,6 \times 10^6$ conídios. mL^{-1}) foram os produtos que apresentaram melhor desempenho para o controle de *P. digitatum* em laranja 'Pêra', com níveis de controle semelhantes aos fungicidas thiabendazole, prochloraz e imazalil, utilizados como padrões.

ALTERNATIVES PRODUCTS FOR THE CONTROL OF GREEN MOLD (*PENICILLIUM DIGITATUM*) OF CITRUS FRUIT IN POST-HARVEST. Botucatu, 1999, 103 p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DANIEL ANDRADE DE SIQUEIRA FRANCO

Adviser: WAGNER BETTIOL

2 SUMMARY

The occurrence of citrus fruit postharvest rot causes significative losses, being larger in countries where appropriate technologies are not used in post-harvest. The control of the rot is accomplished, mainly in citrus fruits the exportation, storage and/or degreening, with fungicides. Even so, due to concerning with the risks environmental contamination and human intoxication; to the aparence of fungi isolates resistant to fungicides and the recent prohibition of the use of these products, in postharvest, in some consumer markets, there will be larger restrictions to the use of the fungicides, not having viable substitutes until the moment. Thus, this work was developed with the objective of evaluate the effects of alternative products to the fungicides in the control of green mold (*Penicillium digitatum*) in postharvest citrus, having been tested the following products: acetylsalicylic acid, salicylic acid, tartaric acid, malic acid, ascorbic acid, boric acid, citric

acid, glutamic acid; monosodium glutamate; bicarbonate, carbonate, and metabisulphite of sodium and potassium; potassium sorbate; sodium benzoate; alanine; asparagine; cysteine; lysine; glycine; phenilalanine; proline; tyrosyne; tryptophano; metyonine; isoleucyne; soy oils, of eucalypt, of corn, of almond, of olive, of canola, of sunflower, of *Cymbopogon citratus*, of *Vanillosmopsis erytropapa*; extract of powder-of-guarana, of *Azadiracta indica*, of *Calendula officinarum*, of *Chenopodium ambrosioides*; propolis; Lonlife; raw milk; lecethin; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Trichoderma harzianum*; *Gliocladium roseum*; *Gliocladium virens*; *Lactobacillus*; Tween 20 e 80; Agral; thiabendazole; prochloraz e imazalil. For so much, *in vitro* was evaluated the potential of inhibition of the germination of conidia of *P. digitatum* and *in vivo*, the on of controlling the green mold in orange fruits 'Pear'.

The effect of alternative products in the inhibition of the germination of spore of the *P. digitatum* was appraised by the method developed in the present work, denominated method of the flavedo. The method consists of placing three disks of 12 mm of diameter of orange flavedo on microscopia slide, and on these three drops of 20 μL of inoculum suspencion (1×10^5 spore. mL^{-1}) and to follow 20 μL of the suspension of the product to be tested; to incubate the group in humid camara for $25 \pm 2^\circ\text{C}$, in the darkness; and to evaluate the germination in optical microscope after 21 hours of incubation, being added a drop of lactofenol blue in each disk of the flavedo. The results show that sodium and potassium metabisulphite at 1% (w/v), potassium carbonate and sorbate at 1% (w/v), cisteina at 1% (w/v), boric acid at 1% (w/v), vinagre at 20 and 30% (v/v), sodium benzoate at 1500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, prochloraz and imazalil at 1500 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ inhibited in 100% the germination of the conidia of *P. digitatum*.

The effect of the alternative products in the control of the disease, it was evaluated in assay carried out in orange fruits 'Pear'. Each treatment was composed by 10 wounded fruits with a tube drained (three millimeters of diameter), in two opposite points in the area equatorial of fruit, to a depth of more or less two millimeters, reaching the area of the albedo. After the wound the fruits were inoculated with 20 μL of the suspension de spore of *P. digitatum* contends 1×10^6 spore. mL^{-1} . Soon after, in each wound they were applied 20 μL of the suspension of a product of the alternative products in agreement with the treatment. The products were still tested in different concentrations and mistures to verify possible synergismo. The alternative products were compared with the treatment with and without inoculation of the patogeno, and with standard fungicides. The fruits were incubated at $25 \pm 5^\circ\text{C}$ and 85-90% of UR and with photoperiod of 12 hours of light, being appraised five, six or seven days after the inoculation. The results showed that sodium bicarbonate at 2 and 3% (w/v), sodium carbonate at 1% (w/v), boric acid at 2% (w/v), potassium sorbate at 1% (w/v), sodium metabisulphite at 1% (w/v), oil of *Cymbopogon citratus* at 5% (v/v) more Tween 80 to 1,7% (v/v) and *Gliocladium roseum* ($8,6 \times 10^6$ spore. mL^{-1}) they were the products that showed the best performance for the control of *P. digitatum* in fruits of orange 'Pear', with control levels similar to the fungicides thiabendazole, prochloraz and imazalil used as patterns.

Keywords: *Penicillium digitatum*, post-harvest, biological control, diseases, sodium bicarbonate, sodium carbonate, boric acid, potassium sorbate, sodium metabisulphite, *Cymbopogon citratus*, *Gliocladium roseum*.

3 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros. A citricultura encontra-se disseminada por todo o território nacional, com grande importância econômica e social, estando entre os principais produtos agrícolas dos seguintes estados: São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia.

A produção brasileira de laranja, em 1998, foi cerca de 461 milhões de caixas (40,8 Kg), numa área colhida estimada em 993 mil ha, resultando em rendimento médio de 464 cx.ha⁻¹. São Paulo desponta como o principal polo produtor, mantendo a sua liderança nos últimos anos. A produção paulista atinge 383 milhões de caixas, ou 83% da produção nacional (AGRINUAL, 1999).

No tocante às variedades plantadas, a Pêra (41%) e a Natal (26%) em conjunto respondem por 67% do total das laranjas, enquanto a Ponkan (53%) lidera a produção de tangerinas e o Taiti (85%) a de limões e limas ácidas (Amaro & Maia, 1997).

A fruticultura, apesar de representar apenas cerca de 5% das áreas cultivadas no país, é uma atividade capaz de assegurar ao Brasil um percentual significativo

do volume de produção global, colocando-o em segundo lugar entre os produtores de frutas *in natura* (FAO, 1997). Entretanto, o Brasil destina cerca de 1% de sua produção de frutas frescas para o exterior (300.000 t), ocupando o 20º lugar entre os países exportadores. A exportação brasileira de laranja *in natura* não atinge 0,5% da produção nacional, sendo portanto, marginal. Mesmo assim, lidera em volume, tendo alcançado 99,2 mil toneladas, que renderam ao país 20,4 milhões de dólares em 1996. Problemas com variedades, as etapas pós-colheita, as doenças e as embalagens contribuíram para resultados pouco expressivos (Amaro & Maia, 1997; Carraro et al., 1994).

-Entre as doenças mais importantes na deterioração da laranja em pós-colheita destaca-se a causada pelo fungo *Penicillium* spp. Outros patógenos que promovem podridões dos frutos são: *Phytophthora* sp., *Diaporthe citri*, *Alternaria citri*, *Diplodia natalensis* e *Geotrichum candidum* (Brown & Ecker, 1989).

Como forma de controlar esses patógenos vêm sendo utilizados vários métodos: tratamento químico, irradiação, termoterapia, filmes plásticos e práticas culturais visando reduzir o inóculo no campo. Os tratamentos químicos têm sido os mais utilizados, em pré e pós-colheita. No Brasil, tem-se utilizado fungicidas do grupo dos benzimidazóis, que possuem várias restrições de uso devido ao fato de selecionar estirpes resistentes de certos fungos. Neste sentido, diversos trabalhos vêm sendo realizados com objetivo de buscar novos produtos. No entanto, muitos fungicidas eficientes não possuem registro para uso em pós-colheita no Brasil. A situação se agrava no caso de produtos para exportação, uma vez que existem diferenças entre as legislações dos países consumidores na aceitação de determinados fungicidas, bem como na quantidade de resíduos tolerada. Outro fator a ser considerado é o acúmulo de pesticidas na cadeia alimentar, que pode acarretar sérios prejuízos ao consumidor

quando não são observados os períodos de carência e as doses máximas de resíduos tolerados pela legislação (Kretzschmar, 1991).

Por outro lado, a preocupação pública está aumentando em relação aos resíduos de fungicidas nos alimentos. A ingestão destes resíduos representa um risco para a saúde e ameaça a continuidade do uso de fungicidas no futuro. Em 1987 a "National Academy of Sciences" (National Reserch Council, Washington, 1987), publicou uma reportagem revelando a presença de nove princípios oncogênicos em 90% dos fungicidas vendidos. O uso dos fungicidas compreendem em 60% do risco oncogênico, junto com todos os pesticidas usados em alimentos (Wilson et al., 1991).

Alternativas visando amenizar estes problemas vêm sendo pesquisadas e com resultados promissores no controle de vários fitopatógenos em culturas economicamente importantes. Nesta linha de pesquisa, enfoque particular está sendo dado ao controle biológico (Junqueira & Gasparotto, 1991; Luz, 1988; Papavizas & Hundsen, 1980; Sudo, 1989).

Extratos de plantas, produtos alimentares, aditivos de alimentos e resíduos da produção de alimentos vêm sendo testados para o controle de doenças de plantas (Ferracini et al., 1990; Misato et al., 1975; Parc et al., 1993; Sholberg & Gaunce, 1995; Stangarlin & Pascholati, 1994) com resultados satisfatórios e apontando para uma possível utilização prática.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a possibilidade de uso de produtos alternativos aos fungicidas, tais como: microrganismos antagonicos, extratos de plantas, aditivos de alimentos, produtos alimentares e resíduos da produção de alimentos, no controle do bolor verde (*Penicillium digitatum* Sacc.), em pós-

colheita de laranja 'Pêra', realizando-se estudos *in vitro* para avaliar o efeito sobre a germinação de conídios de *P. digitatum* e em laranja 'Pêra' para avaliar o controle da podridão.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo constitui-se de uma revisão de literatura sobre o Bolor Verde, bem como os métodos empregados em seu controle.

4.1 Bolor Verde dos citros

Entre as várias doenças pós-colheita de frutos cítricos, os bolores são as de maior importância econômica. Os bolores também podem ocorrer em pomares, afetando frutos na fase final de maturação. Contudo eles causam maiores prejuízos quando ocorrem após a colheita, durante as operações de manuseio, armazenamento e transporte. Frutos de todas as variedades e cultivares são suscetíveis. Três tipos de bolores existem, dos quais os mais comuns são o bolor azul e o bolor verde, sendo este último o mais freqüente nas principais regiões produtoras nacionais (Feichtenberger et al., 1997).

4.1.1 Sintomas

Os bolores causam podridões moles e aquosas em frutos, que se iniciam por pequenas anasarcas em qualquer parte da superfície da casca do fruto afetado e se desenvolve rapidamente envolvendo-o por completo. O tecido afetado é recoberto por um crescimento de micélio branco, que depois é revestido por uma densa massa de esporos, cuja cor varia em função do fungo envolvido. No bolor verde, o revestimento é de cor verde-oliva, circundado por uma faixa de crescimento branco, relativamente larga e, separando esta do tecido sadio, uma estreita faixa de tecido encharcado. O bolor azul, apresenta uma cor azul esverdeada, com faixa de crescimento branco, estreita e com uma de tecido encharcado -relativamente larga limitando a lesão em desenvolvimento. Em ambiente seco o fruto afetado permanece inteiro, mas apresenta murchamento diminuindo o seu volume e, posteriormente, torna-se mumificado. Em ambiente úmido, desintegra-se por completo.

A podridão verde desenvolve-se mais rapidamente que a azul, sendo comum encontrar-se frutos afetados pelos dois fungos simultaneamente. Nessas condições, os frutos mostram-se recobertos pelas frutificações verde-oliváceas de *Penicillium digitatum*, exibindo entretanto algumas áreas de cor azul de *Penicillium italicum* Wehmer (Feichtenberger et al., 1997; Kimati & Galli, 1980).

4.1.2 Etiologia

Penicillium digitatum Saccardo e *Penicillium italicum* Wehmer são os agentes causais de bolor verde e azul. Conforme Feichtenberger et al. (1997), *Penicillium ulaiense* Hsieh, Su & Tzean também provoca bolor em frutos cítricos, produzindo massas de esporos de cor azul - cinza sobre os frutos. Contudo difere de *P. italicum* pelo fato de produzir

conídios em longos sinêmios de estipe branca (0,5 mm de altura), dando ao bolor o aspecto de barba ou bigode ('whisker mold').

P. digitatum e *P. italicum* são classificados como pertencentes ao Reino Fungi, forma-divisão Deuteromycota, forma-classe Hyphomycetes (fase anamorfa), conhecidos como fungos mitospóricos e pertencentes a divisão Eumycota, ordem Eurotiales (fase teliomorfa) (Landeker, 1996). Apresentam um micélio inter e intracelular, ramificado, hialino, com enzimas capazes de dissolver a lamela média em tecidos do hospedeiro. Produzem enorme quantidade de conídios unicelulares esféricos, catenulados, na extremidade de ramificações de conidióforos típicos do gênero. Ascósporos são produzidos muito raramente na natureza, a partir de escleródios. Colônias em meio artificial são semelhantes, em aparência, às do bolor que desenvolve no fruto infectado.

Esses fungos sobrevivem facilmente de um ano para outro, saprofiticamente, sobre vários tipos de substratos orgânicos, em pomares ou outros ambientes, na forma de conídios. As infecções originam-se de conídios carregados pelo vento que atingem a superfície dos frutos, onde penetram geralmente por ferimentos, embora *P. italicum* seja capaz de penetrar diretamente através da cutícula. Sobre as lesões, os fungos produzem enorme quantidade de conídios unicelulares, mais ou menos esféricos, catenulados. O ciclo da doença pode ser repetido muitas vezes durante o ano, contribuindo para um aumento exponencial dos propágulos do fungo em pomares e galpões de embalagens e armazenamento, caso medidas de controle não sejam adotadas. As três espécies desenvolvem-se melhor em temperaturas próximas a 24°C e muito lentamente em temperaturas acima de 30°C e abaixo de 10°C. Em temperaturas baixas (abaixo de 10°C), *P. italicum* desenvolve melhor que *P.*

digitatum. O desenvolvimento de resistência aos benzimidazóis também é mais freqüente em *P. italicum* do que em *P. digitatum* (Feichtenberger et al., 1997; Kimati & Galli, 1980).

Embora o bolor verde e azul sejam favorecidos por temperatura de armazenagem relativamente altas, eles continuam a sua atividade, lentamente, mesmo a temperaturas próximas do congelamento. Algumas espécies de *Penicillium* produzem etileno, o qual difunde para dentro do 'container' ou câmara de armazenamento, aumentando a respiração dos frutos, afeta a coloração e acelera sua maturidade e senescência, reduzindo assim o período de armazenagem dos frutos sadios.

Em adição às perdas causadas pelo apodrecimento dos frutos por *Penicillium*, ocorre a produção de várias micotoxinas, tal como patulina, as quais contaminam sucos feitos de frutos sadios e frutos parcialmente apodrecidos. Estas micotoxinas podem causar lesões ou degenerações de órgãos internos tais como: intestino, rins e fígado. Elas podem afetar o sistema nervoso e também causar tumores cancerígenos (Agrios, 1988).

4.1.3 Controle

- Preventivo

A adoção de práticas sanitárias é recomendada visando eliminar frutos infectados e outras fontes de inóculo em pomares, veículos, equipamentos, materiais de colheita e transporte, e também os galpões de embalagens e armazenamento. Também se recomenda a desinfestação preventiva de materiais e instalações com produtos à base de cloro, amônio quaternário, formaldeído ou álcool (Feichtenberger et al., 1997).

As medidas preventivas empregadas para o controle são: pulverização das plantas com benzimidazóis, até três semanas antes da colheita; manuseio cuidadoso dos

frutos durante as operações de colheita, transporte, manuseio e armazenamento, visando evitar os ferimentos, que se constituem na principal via de penetração do fungo em frutos (Feichtenberger et al., 1997).

- Físico

Tratamentos térmicos tem sido utilizados no controle de *Penicillium* spp., geralmente associados com tratamento químico (Eckert & Sommer., 1967; Houck, 1967; Smilanick et al., 1995; Williems et al., 1994). Verifica-se também que tratamentos por irradiação, para o controle de podridões de frutas cítricas tem recebido atenção considerável como substituto de tratamentos químicos (Spalding & Reeder, 1985; Stevens et al., 1996). Também, utiliza-se o armazenamento e o transporte de frutos beneficiados a baixas temperaturas (Feichtenberger et al., 1997).

- Químico

Os fungicidas pós-colheita têm permitido um importante papel no desenvolvimento de mercados distantes para frutos cítricos. Antes de 1960, o usual procedimento para manuseio de frutos cítricos, consistia da imersão do fruto numa solução aquecida (43°C) de um fungicida de largo espectro, embrulho do fruto individualmente em papel impregnado com bifenyl e imediato despacho por estrada de ferro a mercados distantes (Eckert & Ogawa, 1985). Os principais compostos com propriedades fungicidas utilizados nesta época, bórax e ortofenilfenato de sódio (SOPP) tem um largo espectro antifúngico e não penetram na superfície do fruto, exceto nos locais feridos. Os frutos são enxaguados com água fresca após o tratamento, porque estes fungicidas são fitotóxicos e os resíduos químicos que permanecem no fruto provenientes da solução relativamente concentrada do tratamento, são inaceitáveis. Esses tratamentos foram moderadamente efetivos contra patógenos se

aplicados nos frutos dentro de um a três dias após a colheita, dependendo mesmo da temperatura ambiente. A finalidade do bifenyl é inibir a esporulação de *Penicillium* em fruto estragado, foi largamente usado na exportação, mas é cercado por problemas associados com odor e resíduos em frutos tratados (Wardowski et al., 1979).

Sec-butylamine foi desenvolvido como um fungicida pós-colheita para frutos cítricos em meados de 1960. Este composto tem um espectro limitado de atividade antifúngica, efetivo principalmente na prevenção de infecção de ferimento por *Penicillium* spp., embora não suprima a esporulação do fungo em frutos estragados. A fitotoxicidade e toxicidade deste composto é baixa a mamíferos, não necessitando enxaguar os frutos após o tratamento. De qualquer maneira, *sec-butylamine* pode ser usado mais eficientemente do que SOPP, o qual necessita de enxágüe após o tratamento. Laranjas colhidas podem ser imergidas em uma solução de *sec-butylamine* a 1% (fosfato ou sal, pH 9) para proteger ferimentos da colheita de infecção por *Penicillium* spp. durante o período de desverdecimento com etileno ou durante armazenamento. *Sec-butylamine* também é adicionado para formulações de cera aplicada aos frutos antes do armazenamento para o controle de *Penicillium*. Puro, ele pode ser volatilizado na câmara de armazenamento ou na embalagem selada do fruto, para ação de fumigação (Eckert & Ogawa, 1985).

A introdução dos fungicidas benzimidazóis, benomyl, thiabendazole, carbendazim e tiofanato metílico no fim da década de 1960, foi um marco no desenvolvimento dos fungicidas pós-colheita para o controle de doenças de frutos cítricos. Estes compostos não são somente altamente efetivos no controle de infecções de ferimentos por *Penicillium* spp., mas membros deste grupo também são igualmente efetivos por causa de suas propriedades sistêmicas. Benomyl tem promovido excelente ação protetora quando frutos são tratados antes

do fermento e inoculação. Em alta dosagem, benomyl e thiabendazole promovem uma barreira protetora na superfície do fruto que inibe a esporulação de *Penicillium* (Eckert & Ogawa, 1985).

O uso intensivo e contínuo de bifenyl, SOPP, thiabendazole, benomyl, e *sec*-butylamine têm criado problema de resistência em *P. digitatum* e *P. italicum* (Davé et al., 1980). Isolados de *Penicillium* que são resistentes a um fungicida, geralmente apresentam resistência cruzada aos compostos estruturalmente relacionados (bifenyl e SOPP; thiabendazole, benomyl, carbendazim e tiofanato metílico). O tratamento do fruto com um fungicida desses grupos, antes do armazenamento, geralmente resulta em seleção e proliferação de variantes resistentes aos fungicidas na população dos patógenos, tanto que um fungicida relacionado estruturalmente não pode ser usado, efetivamente, em algum lote de fruto após armazenagem.

Estudos de incidência de linhagens de bolores verde e azul tolerantes aos benzimidazóis em Israel, revelou que a incidência foi baixa em pomares, média em casas de processamento e altas em condições de armazenagem. As linhagens foram tolerantes a concentrações de 500-1000 vezes mais do que as requeridas para inibir os 'tipos selvagens' sensitivos. Um relativo grau constante de tolerância foi mantido, mesmo após 16 semanas de transferência em meio livre de fungicida ou após inoculação e recuperação em frutos cítricos não tratados. Os resultados sugerem que as linhagens tolerantes são capazes de sobreviver extensos períodos junto com linhagens susceptíveis, mesmo na ausência de pressão de seleção (Gutter et al., 1981).

Imazalil foi o primeiro inibidor de biossíntese de ergosterol (IBE) a ser usado como um fungicida pós-colheita. Imazalil tem sido usado comercialmente

em várias áreas de produção de citros do mundo e foi registrado nos Estados Unidos em 1984 para tratamento de frutos cítricos após a colheita. O espectro antifúngico do imazalil é qualitativamente similar aquele dos benzimidazóis. Imazalil controla *P. digitatum* e *P. italicum* em frutos cítricos, incluindo isolados que são resistentes a thiabendazole, benomyl, SOPP e *sec*-butylamine (Brown, 1981).

Guazatine é um fungicida de largo espectro solúvel em água que pode erradicar infecções incipientes de *Penicillium*. Tratamentos de frutos cítricos com guazatine (250-1000 mg.L⁻¹), um dia antes da inoculação, erradica infecções incipientes do bolor verde e azul, incluindo isolados resistentes aos fungicidas benzimidazóis (Brown, 1983). Guazatine não protege o fruto tratado contra subseqüentes infecções, em novos locais de inoculação, nem altas dosagens do fungicida (2000 mg.L⁻¹) inibe esporulação de *Penicillium* em fruto doente. Guazatine vem sendo aplicado comercialmente para frutos cítricos, mas linhagens resistentes de *P. italicum* vêm sendo obtidas (Wild, 1983).

Prochloraz é um fungicida imidazole, inibidor da biossíntese de ergosterol, o qual tem um espectro de atividade antifúngica qualitativamente similar aquela do imazalil. Prochloraz (1000 mg.L⁻¹) erradicou infecções incipientes de *P. digitatum* e *P. italicum* para cerca de alguns graus, como os tratamentos de benomyl e imazalil (Brown, 1983). Prochloraz controlou isolados de *Penicillium* que foram resistentes a benomyl e thiabendazole. A 500-1000 mg.L⁻¹, prochloraz mostrou ação antiesporulante contra *Penicillium* (Tuset et al., 1981).

Etaconazole é um fungicida triazol, inibidor da biossíntese de ergosterol, o qual controla *Penicillium*, incluindo infecções por isolados resistentes a benzimidazóis. Etaconazole (250-100 mg.L⁻¹) aplicado dentro de 24 horas após a inoculação,

erradicou infecção incipiente de *Penicillium*. Nesta concentração etaconazole suprimiu a esporulação de *Penicillium* em frutos doentes e protegeu frutos tratados de infecções através de novos ferimentos, criados após a aplicação do tratamento. Propiconazole é um fungicida estruturalmente relacionado ao etaconazole, o qual apresenta semelhante atividade antifúngica (Eckert et al., 1981).

No Brasil, os produtos registrados para aplicação em pós-colheita de citros no controle dos bolores verde e azul são: o thiabendazole (Tecto 600 PM e Tecto SC, Novartis Agro), o tiofanato metílico (Metiltiofan, Sipcam Agro S.A.; Cercobin 500 SC e 700 PM, Iharabras S.A.) (Compêndio, 1996) e o imazalil (Magnate 500, Agricur). Os frutos cítricos devem ser tratados logo após a colheita, por imersão ou pulverização.

Os fungicidas ortofenilfenato, imazalil, benomyl e thiabendazole são recomendados para a prevenção dos bolores em frutas cítricas (Homes & Eckert, 1995; Pozzan, 1997). O surgimento de novas cepas de *P. digitatum* resistentes a estes produtos obriga a uma contínua busca de fungicidas (Bus et al., 1991; Davé et al., 1989; Eckert, 1987; Eckert & Ratanayake, 1994; Harding, 1972; Homes et al., 1995; Kaplan et al., 1981; Kumaroto, 1976; Sein & Foguet et al., 1980).

- **Biológico**

Com a retirada de vários fungicidas usados no controle de doença pós-colheita de frutas e vegetais e com o conhecimento dos problemas advindo do uso desses produtos, tem ocorrido grande procura por métodos alternativos de controle das doenças. O controle biológico de doenças de pós-colheita de frutas e vegetais passou a ser intensamente explorado buscando alternativas viáveis. Diversos fungos e bactérias antagônicas estão sendo pesquisados como alternativas para os fungicidas e tem demonstrado efetivo controle de várias

doenças em pós-colheita de citros (Chalutz et al., 1988; Chalutz & Wilson, 1990; Smilanick & Denis-Arrue, 1992; Wilson & Wisniewski, 1989).

O controle biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita data de 1953, quando Gutter e Littauer demonstraram a ação antagonista de *Bacillus subtilis* contra patógenos de citros (Wilson & Wisniewski, 1989). No entanto, a intensificação de trabalhos realizados nessa área é recente, e somente a partir de 1970 aprofundaram-se as atividades de pesquisa, em diversas partes do mundo, na busca de microrganismos antagônicos com potencial de biocontrole sob condições de armazenamento, bem como estudos sobre seu modo de ação.

Em pós-colheita, o controle biológico de patógenos pode ser realizado no campo ou após a colheita. No campo, visa-se o controle de patógenos que penetram nos frutos em determinadas épocas, como na floração, e se desenvolvem posteriormente, durante o armazenamento. Neste caso, realizam-se pulverizações com suspensões de antagonistas nas plantas na época de maior suscetibilidade à entrada do patógeno, evitando sua posterior incidência (Kretzschmar, 1991).

Uma das grandes dificuldades na utilização de microrganismos para o controle de doenças com de antagonistas, têm sido a impossibilidade de controle das condições ambientes. Assim, muitas vezes um trabalho promissor em condições de laboratório não logra êxito no campo devido às condições adversas aos microrganismos utilizados, principalmente destruição por raios ultravioletas e dessecação (Kretzschmar, 1991). Os produtos armazenados normalmente estão sob condições controladas de temperatura e umidade relativa, principalmente no caso de armazenagem a frio. Segundo Wilson & Pusey (1985), existem três fatores que sugerem que o controle biológico é uma

alternativa viável e passível de exploração para o controle de patógenos em pós-colheita: controle das condições ambientes, limitação das áreas de aplicação e ser economicamente praticável sob condições de armazenamento. Por estes motivos, maior número de trabalhos tem sido realizado visando o controle de patógenos que incidem nos produtos vegetais após a colheita. Os tratamentos são feitos com pulverização de suspensão de células de antagonista sobre os frutos antes da armazenagem, ou por imersão destes em suspensões de células de antagonistas.

Até o momento, os trabalhos que obtiveram bons resultados no controle de patógenos em pós-colheita foram aqueles que utilizaram antagonistas com atuação por antibiose. No entanto, Wilson & Chalutz (1989) observaram que o uso de antagonistas que não produzem antibióticos como parte de seu modo de ação pode ter maior aceitação pública, uma vez que não serão introduzidos antibióticos exóticos na cadeia alimentar.

Em citros, Single & Deverall (1984) isolaram diversos fungos e bactérias antagônicas a *Alternaria citri* e a *Geotrichum candidum*, a partir de frutos que foram incubados sob condições ótimas para o surgimento de podridões. Dentre os isolados, *Bacillus subtilis* foi o mais ativo *in vitro* contra *A. citri*, *G. candidum* e também *P. digitatum*. A imersão dos frutos feridos em suspensões de células bacterianas controlou a podridão causada por estes patógenos por um período maior que três semanas. Filtrados de cultura de *B. subtilis* igualmente demonstraram antagonismo a *A. citri* e *G. candidum*, *in vitro* e sobre frutos. Segundo os autores, a ação antagonista de *B. subtilis* deve-se provavelmente aos diversos antibióticos produzidos em cultura, pois culturas filtradas também tiveram um bom controle dos patógenos.

Outros antagonistas aos patógenos de citros foram isolados por Wilson & Chalutz (1989). Neste trabalho foram testados 122 isolados contra *P. digitatum* e *P. italicum*, causadores de podridão em frutos. Desses isolados, duas leveduras, *Debaromyces hansenii* e *Aureobasidium pululans*, e duas bactérias *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas syringae* foram os antagonistas mais efetivos. Estes isolados inibiram igualmente a infecção de *P. digitatum* e *P. italicum* em 50% ou mais. Onze dias após a inoculação, *P. cepacia* conferiu a melhor proteção contra ambas as podridões e produziu zonas de inibição contra os dois patógenos em cultura. A levedura *D. hansenii* não é patogênica às plantas e parece controlar a podridão por *Penicillium* sem produção de antibióticos, sendo, portanto, o mais apto dentre os antagonistas identificados para ganhar aceitação comercial. Além disso, como é uma espécie comumente consumida em leite e queijo, a toxicidade potencial a seres humanos não deverá constituir problema.

Um único antagonista pode ter ação inibitória sobre diversos patógenos causadores de doenças em diferentes hospedeiros. Por exemplo, em estudos realizados com o fungo *Cladobotryum amazonense*, Bastos et al. (1986) verificaram a produção de metabólitos purificado em meio de cultura que exibiram atividade antifúngica. Testes realizados *in vitro* com o antibiótico purificado demonstraram um efeito inibitório sobre a germinação de conídios de uma ampla variedade de fungos fitopatogênicos, como *Botrytis cinerea*, causador do bolor cinzento em tomate, *P. digitatum*, causador do bolor verde em citros e *P. expansum*, causador de bolor azul em maçãs. Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização do fungo *C. amazonense* no controle de doenças de pós-colheita causadas por estes patógenos.

Segundo Lazzaretti (1993), foi possível selecionar quatro isolados de *B. subtilis* (AP-03, AP-12, AP-51, AP-114), que retardaram o crescimento das colônias de *Penicillium* e *Aspergillus* por três e dois dias, respectivamente. Além do menor crescimento micelial, os metabólitos inibiram a capacidade de esporulação dos fungos, principalmente de *Penicillium*.

O uso do controle biológico em substituição ao químico em pós-colheita, é dependente da disponibilidade e da efetividade dos agentes de controle, bem como dos produtos comerciais contendo estes microrganismos. Entretanto, até o momento, são poucos os produtos biológicos disponíveis no mercado para essa modalidade de controle. Além disso, dentre os produtos disponíveis, são raros aqueles devidamente registrados para o uso em escala comercial. Dentre os produtos disponíveis para o controle de doenças em pós-colheita de citros, tem-se o Aspire (*Candida oleophia*) e o BioSave 11 (*Pseudomonas syringae*) para o controle do bolor verde (*P. digitatum*), do bolor azul (*P. italicum*) e da podridão causada por *Geotrichum candidum* (Bettioli, 1997; Janisiewicz & Jeffers, 1997). Entretanto, devido à especificidade desses bioagentes, a participação no mercado é pequena. De acordo com Sanhueza (1998), o produto Aspire é registrado em Israel e USA para ser utilizado em doenças que ocorrem em frutos cítricos durante o período de pós-colheita. Para esta mesma cultura, relata também a utilização das leveduras *Debaromyces hansenii* e *Rhodotorula mucilaginosa* para o controle do *P. digitatum*.

Frutos cítricos destinados a exportação são enxaguados e submetidos a uma série de produtos nos galpões de embalagens, entre os quais: fungicidas, ceras, reguladores de crescimento. O propósito da aplicação de ceras é em parte para dar brilho na aparência do fruto e para reduzir a transpiração, evitando a perda de peso pela senescência

lenta e permanente durante a estocagem. As ceras podem servir também para carregar fungicidas, ou reguladores de crescimento, tais como 2,4-D e GA₃ ou ainda agentes de biocontrole.

A compatibilidade com fungicidas, antioxidantes, e outros produtos químicos usados durante a produção e manuseio pós-colheita do fruto pode ser outro fator que determine o sucesso comercial de agentes de controle biológico. Roberts (1994) relatou que *Candida guilliermondii* reduz a incidência de doenças em pós-colheita de frutos cítricos, quando combinados com thiabendazole a 50 µg.mL⁻¹ e cera.

Os antagonistas ocorrem naturalmente na superfície de frutos de citros e foram usados e reaplicados nos frutos como agentes de biocontrole. Wilson & Wisniewski (1989) encontraram apenas bactérias e leveduras em água de lavagem concentrada da superfície de frutos cítricos, quando plaqueados em meio de ágar. Fungos de podridões apareceram em ágar somente quando estas águas de lavagens foram diluídas, indicando que leveduras e bactérias podem ser supressoras de seu crescimento. Quando frutos e vegetais são lavados, eles são mais susceptíveis aos estragos do que os não lavados.

Wilson & Wisniewski (1989) resumiram informações sobre o modo de ação de alguns antagonistas usados em pós-colheita. A produção de antibiótico aparece como sendo o principal modo de ação nos antagonistas identificados. Em citros, *Bacillus subtilis* age pela produção de antibióticos sobre as doenças do bolor verde e podridão azeda, enquanto que *Trichoderma* sp. age pela produção de antibióticos apenas sobre esta última. A competição por nutrientes e indução de resistência no hospedeiro ocorre em citros por *Debaryomyces hansenii* no controle das doenças do bolor azul e verde, e também na podridão azeda.

Bacillus pumilus controlou significativamente *P. digitatum* em infecções de laranja 'Valência', o qual foi tão efetivo como imazalil e foi melhor do que o tratamento com benomyl (Huang et al., 1992).

Arras (1996) relata o controle de *P. digitatum* em frutos de laranja com um isolado de *Candida famata* (F 35) obtido de folhas de figo. Valores de inibição de 90 a 100% foram obtidos em frutos artificialmente feridos. O modo de ação do antagonista contra o patógeno foi observado por microscopia eletrônica e, revelou uma rápida colonização do micélio do fungo e do ferimento, com atividade fagocítica e lítica contra a hifa. Acredita-se que ocorra competição por espaço e nutrientes, e produção de enzimas líticas na adesão do antagonista às hifas.

A bactéria *Pseudomonas glathei*, não produtora de antibiótico, promoveu um moderado biocontrole do bolor verde em laranjas pós-colheita em condições ambientes (25°C). A habilidade do isolado foi aumentada quando frutos inoculados foram incubados a 30°C por 24 horas antes de se incubar a 25°C. O tratamento a quente (30°C) estimulou a multiplicação da bactéria e retardou a germinação de conídios do fungo. Isto permitiu à bactéria estabelecer-se nos locais dos ferimentos antes da germinação dos conídios e da infecção pelo patógeno (Huang et al., 1995).

Aplicações de *Pseudomonas cepacia* reduziu o bolor verde em pós-colheita em mais de 80% comparado com o controle. A doença foi controlada quando *P. cepacia* foi aplicada dentro de 12 horas ou menos após a inoculação. A bactéria cresceu rapidamente nos ferimentos e não causou problemas visíveis ao fruto. A inibição do crescimento do fungo é causada pelo antibiótico pyrrolnitrina, mas sua ação em citros pode

não ser totalmente devida ao antibiótico. Outras *Pseudomonas* não foram tão efetivas quanto *P. cepacia* (Smilanick & Denis-Arrue, 1992).

Droby et al. (1997) pesquisaram as interações entre CaCl_2 , a cutícula do tecido de 'grapefruit', *P. digitatum* e a levedura *Pichia guilliermondii* isolado US-7. Aplicação de 0,75 ou 1,5% de CaCl_2 na superfície de fermentos de 'grapefruit' reduziu a incidência do bolor verde em 43 a 52%. Testes em laboratório, com uma suspensão de *Pichia guilliermondii* (10^7 células.mL⁻¹), contendo 0,75 ou 1,5% de CaCl_2 , reduziu a incidência do bolor verde de 27 para 3%. Testes em larga escala, com aplicação em imersão de 1,5% de CaCl_2 e *P. guilliermondii* (10^7 células.mL⁻¹) reduziu significativamente o número de fermentos infectados por *P. digitatum*. CaCl_2 , com ou sem células de levedura, estimulou a produção de etileno no tecido do fruto. O aumento na concentração do CaCl_2 resultou em decréscimo na germinação de conídios e alongação do tubo germinativo de *P. digitatum*. Também, inibiu a atividade pectinolítica de preparações naturais de enzimas do fungo. O efeito do cálcio na redução da infecção em fermentos de 'grapefruit' por *P. digitatum* pode ser devido a efeitos diretos no tecido do hospedeiro (dando maior resistência a degradação enzimática) ou no patógeno (interferindo na germinação dos conídios, crescimento e inibição da atividade de enzimas pectinolíticas).

4.2 Controle Alternativo do Bolor Verde dos citros

Laranjas 'Navel' inoculadas com *P. digitatum* não apresentaram podridões quando fumigadas com ácido acético (2 mg AA/litro a 5°C/1 hora). A fumigação não causou descoloração ou aparência de fitotoxidade nos frutos utilizados no ensaio (Sholberg & Gaunce, 1995). A fumigação com ácidos orgânicos de cadeia curta também foi

empregada por Sholberg (1998) com a finalidade de reduzir o potencial de podridões em pós-colheita. Em citros, as podridões causadas por *P. digitatum*, foi reduzida de 86% para 11%, quando frutos receberam fumigação de ácido acético, fórmico e propiônico. Foi observado escurecimento da casca de frutos em laranjas fumigadas com ácido fórmico.

A resistência pós-colheita de laranja 'Valencia' ao *P. digitatum* influenciada pela temperatura e do tempo de cura do ferimento, foi verificado por Bonnas et al. (1995). Shellie & Skaria (1998), demonstraram que o desenvolvimento do bolor verde em 'grapefruit' foi inibido pelo tratamento de quarentena utilizado contra a mosca do fruto. Este tratamento consiste na utilização de uma câmara úmida com ar forçado a 46°C durante cinco horas e subsequente armazenagem de quatro dias a 21°C. A inoculação antes do aquecimento promoveu significativo controle do bolor verde após quatro dias de armazenagem a 21°C. A indução de resistência no hospedeiro via lignificação ou acumulação de fitoalexinas não ocorreu. O modo de ação envolvido no aquecimento a 46°C, possivelmente foi a inibição da síntese protéica a qual afetou o crescimento do patógeno. A desinfestação a quente não apresenta atividade residual de proteção durante o armazenamento e comercialização. Este tratamento pode ser empregado junto a outros tratamentos pós-colheita, como no biocontrole do bolor verde por *Pseudomonas glathei*. Deste modo, retarda a germinação dos conídios de *P. digitatum* e, simultaneamente, estimula a multiplicação da bactéria protetora.

Compostos voláteis que ocorrem naturalmente em frutos cítricos maduros e em ferimentos dos frutos, bem como os constituintes do suco da laranja foram avaliados na inibição e/ou na indução da germinação de conídios de *P. digitatum* (Davis & Smoot, 1972; Eckert & Ratnayake, 1994; Pelser & Eckert, 1977).

Homma et al., citados por Homma et al. (1981c) investigaram a razão porque frutos cítricos raramente apodrecem quando ligados à árvore. Uma substância presente no pedúnculo e pele dos citros foi isolada, purificada, identificada e chamada de 'citrinol'. Esta substância foi dissolvida em solução de bicarbonato de sódio e aplicada em ferimentos da casca de frutos inoculados com *P. digitatum*. Após cinco dias, as partes tratadas dos frutos com citrinol não apresentaram a doença e severo surto do bolor verde foi verificado nos locais de controle. A inibição da doença foi reconhecida não somente devida a ação do citrinol, mas também pela solução de bicarbonato de sódio.

Homma et al. (1981c) utilizaram solução de bicarbonato de sódio no controle de *P. digitatum* e *P. italicum* em pós-colheita de citros. Na germinação de conídios de *P. digitatum*, bicarbonato de sódio a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou inibição de 90%. A solução de bicarbonato de sódio associada a surfactantes e emulsificantes a 0,1%, apresentou efeito preventivo do bolor verde (80-90%) superior ao bicarbonato sozinho. Em ensaios de armazenagem, mostraram que a formulação de bicarbonato de sódio inibiu cerca de 80% e 70-80% o desenvolvimento da doença em frutos de limão e laranja, respectivamente. Em laranjas inoculadas com isolados de *P. digitatum* e *P. italicum* resistentes e sensíveis a tiofanato metílico, bicarbonato de sódio controlou ambos isolados do patógeno, com maior efeito aos isolados resistentes.

Bicarbonato de sódio também é empregado com sucesso no controle de doenças de plantas ornamentais (Horst et al., 1992). Solução aquosa de bicarbonato de sódio a 0,5% e óleo, aplicadas semanalmente na cultura de *Rosa* spp., controlou o mildio pulverulento e a pinta preta causados, respectivamente, por *Sphaerotheca pannosa* e *Diplocarpon rosae*. Bicarbonato de sódio foi empregado por Francisco & May de Mio (1997)

no controle de oídio (*Sphaerotheca pannosa*) na cultura da rosa. Os tratamentos com bicarbonato de sódio nas dosagens de 100 g e 150 g.100L⁻¹ de água, com ou sem espalhante adesivo, foram eficientes no controle do oídio não diferindo do tratamento padrão com enxofre.

A utilização de bicarbonato de sódio vem tornando-se particularmente interessante no controle de fungos em hortaliças, pela sua baixa toxicidade e interferência no meio ambiente. Ele foi pulverizado em pepino no controle da mancha zonada causada por *Leandria momordicae*, proporcionando aumento significativo no rendimento da cultura na dosagem de 10 g.L⁻¹ (Ramiz-Otorola et al., 1995a). Ele foi aplicado isoladamente (10 g.L⁻¹) ou em combinação com óleo vegetal (10 mL.L⁻¹) no controle de *Alternaria solani* em tomateiro, não ocorrendo diferença entre o fungicida padrão e o bicarbonato de sódio, aplicados isoladamente (Ramiz-Otorola et al., 1995b).

Smilanick e Margosan (1998) determinaram a toxicidade de sais de carbonato e bicarbonato para o controle de *P. digitatum*. A DL-50 de conídios em carbonato de sódio, carbonato de potássio, bicarbonato de sódio, bicarbonato de amônio e bicarbonato de potássio foram 530, 855, 1184, 1295 e 3340 µg.mL⁻¹, respectivamente. Todos foram fungistáticos. O controle do bolor verde com carbonato e bicarbonato de sódio foram superiores aos sais de carbonato de potássio, bicarbonato de potássio e amônio. Bicarbonato de sódio pode substituir carbonato de sódio reduzindo o conteúdo de sódio e altos valores de pH, no controle do mofo verde, além dele poder ser clorado enquanto carbonato de sódio não pode. NaOCl (200 µg.mL⁻¹) em bicarbonato de sódio a pH 7,5 aumenta o controle do bolor verde.

O enxágüe em 50 mL de água por fruto ou alta pressão da água de limpeza após o tratamento com carbonato de sódio não reduziu a sua eficiência. Inversamente, a pressão da água de limpeza no fruto antes do tratamento com carbonato de sódio aumentou o controle do bolor verde. Laranjas foram imersas por um minuto em solução de carbonato de sódio a 28, 33, 44, 50, 56 ou 61°C, ocorrendo injúrias na casca do fruto após os tratamentos a 56 e 61°C.

A aplicação pós-colheita de sais orgânicos e inorgânicos foram empregados por Oliver et al. (1998), na supressão da crosta prateada de tubérculos de batata. Todos os compostos (sorbato de potássio, propionato de cálcio, carbonato e bicarbonato de sódio e potássio e bicarbonato de amônia) reduziram a severidade da doença em tubérculos de batata inoculados ou infectados naturalmente, durante 6 semanas de armazenagem em câmara úmida a 22-24°C.

Tratamentos para avaliar a ação de soluções aquecidas de dióxido de enxofre, etanol e peróxido de hidrogênio para o controle pós-colheita do bolor verde de limões foram empregados por Smilanick et al. (1995). Dióxido de enxofre (NaHSO_3 , pH 5) e etanol controlou o bolor verde sem injuriar o fruto, enquanto que peróxido de hidrogênio não foi efetivo no controle do bolor verde e causou injúrias inaceitáveis nos frutos. Os tratamentos selecionados na avaliação foram a imersão de etanol (10%) a 45°C por 150 segundos, dióxido de enxofre (2%) a 45°C por 150 segundos, seguido de dois enxágües em água fresca. Estes tratamentos foram comparados com outros dois métodos existentes: imersão em carbonato de sódio a 3% por 150 segundos seguido por dois enxágües em água fresca, ou em $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de imazalil a 45°C por 60 segundos. A eficiência dos tratamentos com dióxido de enxofre e etanol foram semelhantes àquelas do carbonato de sódio e imazalil. Os resíduos de dióxido de

enxofre nos limões, imediatamente após o tratamento, foram menores do que $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que o do etanol foi de $58,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após sete dias de armazenamento a 20°C o resíduo de etanol foi de $24,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo o conteúdo em frutos não tratados de $3,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Dióxido de enxofre, etanol e carbonato de sódio podem ser valiosos componentes em estratégias de tratamentos alternativos para o manejo da resistência aos fungicidas, porque eles tem modos de ação diferentes dos fungicidas correntemente empregados. A substituição destes tratamentos fungicidas em armazenagem, pode reduzir a seleção de linhagens resistentes aos fungicidas que ocorrem dentro dos galpões de embalagens. A sanitização da casa de processamento com dióxido de enxofre, etanol e carbonato de sódio podem ser de particular importância, mesmo que estes tratamentos não conferem uma persistente proteção de doenças e controle da esporulação.

O tratamento com carbonato de sódio é descrito por Klotz citado por Smilanick et al. (1995), que recomenda a imersão por três a quatro minutos em carbonato de sódio a 1,5-3% a $37,7-43,3^\circ\text{C}$ para o bolor verde, $46,1-47,8^\circ\text{C}$ para podridão azeda causada por *Geotrichum candidum* e $46,1-48,9^\circ\text{C}$ para a podridão marrom causada por *Phytophthora* spp.

Carbonato de sódio é um aditivo alimentar aprovado para muitas aplicações, de qualquer maneira, poucas publicações foram feitas para quantificar sua habilidade para o controle de danos pós-colheita. Usando fruto inoculado 24 horas antes do tratamento, Houck citado por Smilanick et al. (1995), reportou que a imersão de limões em 3% de carbonato de sódio a aproximadamente 45°C por quatro minutos, reduziu o bolor verde em mais de 90% comparado com o controle. Ele foi ineficiente quando aplicado a $25-27^\circ\text{C}$. Evidências do modo de ação do carbonato de sódio foi primeiramente relatada por Marloth citado por Smilanick et al. (1995), o qual verificou que a elongação do tubo germinativo de *P.*

digitatum foi grandemente inibida acima de pH 7, e que a solução de carbonato de sódio (pH 11 a 12) elevou o pH do corte do tecido de infecção na casca do limão para inibir *P. digitatum*. Pelsler & Eckert (1977) confirmaram que a elongação da hifa de *P. digitatum* foi inibida acima de pH 7,5. Marloth citado por Smilanick et al. (1995), observou que bicarbonato e carbonato de sódio apresenta atividade insuficiente para um modo de ação direto, levando a mortalidade de conídios dos bolores verde e azul. Muitos conídios sobreviveram a severos tratamentos (cinco minutos de exposição a carbonato de sódio ou bicarbonato de sódio a 6%) e o fungo pode germinar a pH 9 a 9,6, mais alto do que o pH da solução de carbonato que promoveu bom controle da doença. Os ensaios de Marloth foram realizados à temperatura ambiente, de qualquer maneira, ele provavelmente subestimou a influência do aquecimento na ação do carbonato. Muitos biocidas mostraram aumento de duas a três vezes no potencial a cada 10°C aumentado na temperatura (Kostenbauder citado por Smilanick et al., 1995). Homma et al. (1981c) concluíram similarmente, que o pH sozinho não promove controle do bolor verde, por que outros padrões de pH alto foram ineficientes. Em outros trabalhos, concluíram que apenas o pH elevado é ineficiente para constituir o modo de ação dos carbonatos em fungos (Corral et al. 1988; Depasquale et al. 1990). Dióxido de carbono, um produto da decomposição do carbonato, é inibitório a altas concentrações para muitos fungos, particularmente quando acompanhado por uma moderada pressão positiva, e pode ter uma taxa concebível na inibição deste fungo.

O carbonato de sódio vêm sendo utilizado para melhorar a limpeza e para o controle de podridões pós-colheita de frutos cítricos na Califórnia por mais de 70 anos (Eckert & Eaks citados por Smilanick et al., 1997). Ele é usado freqüentemente em limões antes do armazenamento e, ocasionalmente, em laranjas. Também foi comparado a eficiência

do carbonato de sódio com imazalil em limões para o controle do bolor verde, o qual foi igual ou superior ao tratamento com imazalil. O tratamento com carbonato de sódio reduziu a incidência do bolor verde em mais de 90%, mesmo quando aplicado em limões inoculados 48 horas antes da aplicação do tratamento do carbonato de sódio (Smilanick et al., 1995). De qualquer maneira, muitos aspectos do uso do carbonato de sódio não vêm sendo examinados e poucas publicações existem para dar uma orientação clara de como ele pode ser usado, particularmente em laranjas (Eckert & Eaks citados por Smilanick et al., 1997). Klotz citado por Smilanick et al. (1997) recomendou a imersão dos frutos cítricos por três a quatro minutos em 1,5 a 3% de carbonato de sódio a 37,7 a 43,3°C para o controle do bolor verde, mas no presente nenhuma informação existe para suportar esta recomendação. Smilanick et al. (1997) obtiveram o controle do bolor verde em laranjas com 4 ou 6% de carbonato de sódio a 40,6 ou 43,3°C. Soluções de 4 ou 6% de carbonato de sódio foram similares em eficiência e promoveram um controle superior do bolor verde comparado com carbonato de sódio a 2%. O controle do bolor verde com soluções aquecidas de carbonato de sódio a 40,6 ou 43,3°C, foi ligeiramente superior em relação às soluções a 35 ou 46,1°C. O controle do bolor verde pela imersão de laranjas inoculadas durante um minuto em soluções de carbonato de sódio aquecido foi inferior a imersão por dois minutos. O carbonato de sódio controlou infecções de bolor verde a nível comercial usando um curto período de imersão e baixa temperatura em relação aquelas recomendadas em outros trabalhos com o uso do carbonato de sódio em limões.

Na maioria das linhas de manuseio, o período de imersão de um minuto requer um tanque de aproximadamente 10 metros de comprimento, e um tanque de imersão longo requer proporcionalmente mais espaço e mais materiais para a construção. Os

tanques usados na indústria de limões na Califórnia tem controle da temperatura, e mesmo que o aquecimento não influenciasse a eficiência do tratamento com carbonato de sódio, outras propriedades benéficas que ele possui podem tornar popular o uso do carbonato em laranjas. Os benefícios do aquecimento incluem: o aquecimento acelera a solubilização do carbonato de sódio adicionado para reabastecer aquele carregado pelos frutos tratados; soluções aquecidas limpam melhor o fruto do que soluções frias; frutos aquecidos durante o tratamento de imersão são secos rapidamente e aceitam a cobertura de cera mais uniformemente do que frutos frios ou úmidos; podridão marrom pós-colheita causada por *Phytophthora* spp., pode ser controlada pela água quente (46,1 a 48,9°C) e a eficiência da mistura de ortofenilfenato de sódio e bórax é elevada pelo aquecimento quando aplicados em tanques.

Os conservadores têm sido usados por muitos anos para inibir a deterioração microbiana de alimentos. Os conservadores permitidos para o uso em alimentos incluem propionato de sódio, cálcio e potássio; ácido benzóico e seus sais de sódio, potássio e cálcio; ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio; ésteres de ácidos hidroxibenzoicos; dióxido de enxofre (metabissulfito, sulfito e bissulfito de sódio, potássio e cálcio); nitrato de potássio e sódio (Brasil, 1988). Muitos destes compostos são predominantemente fungistáticos, com sua efetividade em inibição do crescimento dependente de sua constante de dissociação (pKa) (Bandelin citado por Al Zaemay et al., 1993). Na indústria de alimentos, dois ou mais conservadores químicos tem sido frequentemente encontrados para agirem sinergisticamente, tornando-se mais efetivos no controle do crescimento microbiano do que tratamentos individuais (Denyer et al. citados por Al Zaemay et al., 1993).

O ácido sórbico é mais efetivo na sua forma não dissociada ou não ionizada, a pH abaixo de 4,5. A proporção de ácido não dissociado varia de 6-7% a pH 6, 50% a pH 4,75 e 98% a pH 3 (Sofos & Busta, 1981). Ele vêm sendo utilizado em galpão de embalagem de citros para o controle de *Penicillium*, geralmente quando isolados do patógeno são resistentes aos benzimidazóis, SOPP e *sec*-butylamine. Uma pulverização não recuperável de solução de sorbato de potássio (2%) promoveu um controle de *Penicillium*, que foi igual àquele promovido por SOPP (Smoot & McCornack citados por Eckert & Ogawa, 1985). A adição de sorbato de potássio a uma formulação de cera a base de água contendo thiabendazole ou benomyl trouxe uma redução significativa de *Penicillium* em limões e 'grapefruits', de casas de processamento que foram contaminadas com conídios de *Penicillium* resistentes a benzimidazóis (Nelson et al. citados por Eckert & Ogawa, 1985). De qualquer maneira, teste com fruto inoculado e tratado apenas com sorbato de potássio não reduziu a incidência do bolor verde e, mais precisamente retardou o início da doença por uma a duas semanas. O ácido sórbico pode ser visto como um fraco fungicida pós-colheita em comparação com thiabendazole e benomyl; mas nenhum outro fungicida pós-colheita pode ser usado quando ocorrer isolados de *Penicillium* resistentes a fungicidas (Gutter citado por Eckert & Ogawa, 1985).

Ácidos orgânicos e seus sais foram avaliados no controle da antracnose (*Colletotrichum musae*) em pós-colheita de bananas. Frutos de banana inoculados com *C. musae* e tratados com uma formulação de cera e sorbato de potássio a 2%, resultou em eficiente controle da doença (Al Zaemay et al., 1993).

A atividade antimicrobiana do sorbato de potássio é encontrada anteriormente na inibição de bactérias (Buazzi & Marth, 1991; Sofos et al., 1986). Sorbato e

benzoato de potássio, ácido acético e propiônico foram avaliados na inibição do crescimento e produção de micotoxinas de *Aspergillus flavus* em ensaios realizados por Rusul & Marth (1987) e Rusul et al. (1987), respectivamente.

Punja & Gaye (1993) relatam o controle da podridão da raiz preta de cenoura, causada por *Chalara elegans*, com tratamentos de imersão das raízes em soluções de propionato de cálcio, sorbato de potássio, bicarbonato de sódio e amônia e carbonato de potássio. Os tratamentos com níveis de controle efetivos foram relatados a pH baixo, com o emprego de propionato de cálcio e sorbato de potássio.

Bicarbonato de sódio mostrou extraordinário efeito protetor contra bolor verde durante a armazenagem em frutos cítricos. Quando os frutos foram tratados por imersão em soluções de bicarbonato de sódio a 2,1% durante cinco minutos, antes ou depois de serem feridos e inoculados com *P. digitatum*, em ambos os casos o controle do desenvolvimento do bolor verde foi de 100% em armazenamento a 25°C e 100% UR, durante três dias. Frutos tratados com padrões de lactato (pH 3, 4, 5 e 6) e fosfato (pH 7 e 8) seguidos de inoculação e armazenamento, apresentaram cerca de 80% dos frutos com o bolor verde a pH 3. A ocorrência do bolor verde diminuiu com o aumento do pH das soluções, sendo que em frutos tratados com soluções de pH 7 e 8 a doença não ocorreu. Frutos tratados com a solução de bicarbonato de sódio e armazenados durante cinco semanas, apresentaram 1% de frutos estragados no final da primeira semana. Em relação ao controle, a incidência do bolor verde foi de 30% no mesmo período. Após cinco semanas, os frutos tratados com a solução de bicarbonato de sódio apresentaram cerca de 3% de frutos com a doença, enquanto que no controle não tratado a incidência foi de 50% (Arimoto et al., 1977).

Montville & Shih (1991) demonstraram a inibição de fungos que ocorrem naturalmente em milho, com a utilização de bicarbonato de sódio e amônia. Bicarbonato de amônia a 2% inibiu completamente o crescimento de *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium graminearum* e *Penicillium griseofulvum* quando eles foram inoculados em milho autoclavado. Corral et al. (1988), Depasquale et al. (1990) e Montville & Goldstein (1989) relatam eficiente controle de diversos fungos produtores de toxinas, bactérias e leveduras com o emprego de bicarbonato de sódio, potássio e amônio.

Princípios ativos com propriedades fungicidas podem ser obtidos a partir dos extratos de plantas (Wilson & Wisniewski, 1989) e de derivados de produtos de origem diversa. Muitos compostos são promissores no controle de patógenos vegetais, como por exemplo: óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Fagan et al., 1998; Fiori et al., 1998; Valarini et al., 1994), *Chenopodium ambrosioides* (Paré et al., 1993), óleos vegetais (Ávila et al., 1998), *Azadirachta indica* (Belo & Silva, 1998), óleos essenciais de espécies medicinais (Bernardo et al., 1998; Pinheiro & Pessoa, 1998) e de essências florestais (Bonaldo et al., 1998; Fiori et al., 1998), própolis (Bianchini & Bedendo, 1995), leite (Astiarraga & Bettioli, 1997) e Lonlife (Fortes et al., 1997).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, no Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental – CNPMA, Jaguariúna, S.P.

5.1 Isolamento do fungo

Para a obtenção do fungo *Penicillium digitatum* foram realizados isolamentos a partir de laranja ‘Pêra’ e ‘Lima’, mexerica ‘Cravo’ e ‘Poncã’, apresentando sintomas de podridões. As coletas foram feitas em diferentes locais nos municípios de Campinas e Itapira, Estado de São Paulo.

Dos frutos afetados com sintomas característicos do bolor verde, procedeu-se o isolamento direto pela remoção e transferência dos conídios presentes na superfície do tecido infectado dos frutos para placas contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Em seguida, foram incubados a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o aparecimento de colônias bem

definidas do fungo, com repicagens subsequentes em BDA até a obtenção de colônias puras de *Penicillium digitatum*.

A conservação dos isolados foi feita em tubos de cultura com BDA mais 2 mL de óleo mineral (Nujol) esterilizado e em água destilada esterilizada pelo método de Castellani (Figueiredo, 1967) mantidos a temperatura ambiente.

5.2 Teste de patogenicidade

5.2.1 Inóculo

Os isolados foram previamente selecionados levando em consideração o hospedeiro (laranja 'Pêra') coletados em pomar de frutas cítricas. Os quatro isolados de laranja 'Pêra' (09/97; 10/97; 11/97 e 12/97) foram, primeiramente, retirados dos tubos de preservação e transferidos para placas contendo BDA. Em seguida, para induzir boa esporulação, foram incubados à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, com alternância de luz fluorescente (12/12h) pelo período de sete dias.

Suspensões de conídios de *P. digitatum* foram preparadas colocando-se água destilada esterilizada nas placas com a cultura do fungo e, com auxílio de uma alça de Drigalsky, promoveu-se a formação de uma suspensão de conídios e micélio. A suspensão foi filtrada em gaze dupla esterilizada e diluída até a concentração de, aproximadamente, 10^6 conídios/mL, determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Para melhor dispersão dos conídios na suspensão, adicionou-se Tween 80 na proporção de 0,05% da suspensão.

5.2.2 Inoculação dos frutos

Frutos maduros de laranjeira 'Pêra', provenientes de Campinas/SP, foram desinfestados superficialmente pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,5%)

durante três minutos, em seguida, lavados duas vezes em água destilada esterilizada. Os frutos foram dispostos sobre papel absorvente ao ar livre para secagem da água superficial e, em seguida, colocados em bandejas de papelão.

Para a inoculação de *P. digitatum* foram realizados ferimentos (cinco mm de diâmetro x 10 mm de profundidade) em três pontos equidistantes na região equatorial do fruto com auxílio de uma ponteira descartável de micropipeta esterilizada. Em cada ferimento foram depositados 50 µL da suspensão conidial (1×10^6 conídios.mL⁻¹) com auxílio de uma micropipeta. Água destilada esterilizada foi utilizada nos frutos testemunha.

Os quatro isolados selecionados, cada um considerado como um tratamento, foram compostos por seis frutos, dos quais dois foram testemunhas. A incubação foi à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) durante quatro dias, ocasião em que foram feitas as avaliações da incidência, seguindo-se o reisolamento e identificação.

5.3 Comparação do método do flavedo na germinação de conídios de *Penicillium digitatum* com outros métodos.

Da casca lavada de laranjas 'Pêra', após o descarte de todo o albedo, foram retirados do flavedo (parte amarela) discos de 12 mm de diâmetro com furador de rolhas metálico. Os discos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por dois minutos, enxaguados três vezes em água destilada esterilizada e secos em papel toalha. Três discos do flavedo foram colocados na superfície de uma lâmina de vidro de microscopia plana. Esse método, denominado método do flavedo foi comparado com os seguintes métodos: da epiderme destacada da cebola, da lâmina de microscopia escavada, da lâmina de microscopia plana revestida ou não com poliestireno e com ágar-água.

No método da epiderme destacada da cebola, da terceira e/ou quarta epiderme de bulbos de cebola descascados foram cortados discos de 12 mm de diâmetro com furador de rolhas metálico, sendo que três discos foram colocados na superfície de uma lâmina de vidro de microscopia plana (Metodologia adaptada de Homma et al., 1981c). Nos métodos das lâminas de microscopia plana foram utilizadas lâminas de vidro de microscopia plana com dimensões de 1 x 25 x 75 mm, lavadas com detergente, enxaguadas em água corrente de torneira e secas naturalmente, sendo revestida ou não com poliestireno e ágar-água. Para o revestimento com poliestireno (Leite & Nicholson, 1992), utilizou-se uma placa de petri de poliestireno moída contida em um becker de 50 mL, sobre a qual adicionou-se 50 mL de acetato de amila. Após trinta minutos as lâminas foram mergulhadas na mistura, transferidas para uma placa de Petri de vidro e retiradas já revestidas com uma pinça. Estas foram colocadas para secar em suporte de madeira durante seis horas. A película de revestimento de poliestireno de uma das faces da lâmina de microscopia plana foi removida pela raspagem da mesma, utilizando a outra face revestida para o teste de germinação. Com ágar-água foram depositados 3 mL de ágar-água (16 g/L) autoclavado fundente sobre as lâminas e colocadas para solidificação do ágar (Bettioli, 1991; Stangarlin & Pascholati, 1994). No método de lâmina escavada foram utilizadas lâminas escavadas de 2 x 25 x 75 mm lavadas em detergente, enxaguadas e secas (Barros et al., 1995).

Como inóculo foram utilizados conídios de colônias do *P. digitatum*, isolado 10/97, com sete dias de idade, suspensos em água destilada esterilizada acrescida de 0,015% de Tween 80. A concentração do inóculo foi calibrada para 1×10^5 conídios por mL em câmara de Neubauer. Sobre o flavedo e a epiderme de cebola foram depositados 20 μ L do inóculo em cada disco e a seguir colocado mais 20 μ L de água destilada esterilizada sobre

cada gota do inóculo. Nos métodos das lâminas com e sem revestimento o procedimento foi semelhante colocando-se o inóculo em três pontos equidistantes, exceção feita à lâmina escavada que recebeu apenas uma gota central.

Para todos os métodos foram utilizadas cinco lâminas, as quais após receberem a suspensão de conídios foram mantidos em câmara úmida escura a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A germinação foi avaliada em uma lâmina de cada tratamento, após cada período de incubação de 18, 19, 20, 21 e 22 horas, pela observação, em microscópio ótico com aumento de 200x em dez campos por lâmina. A porcentagem de germinação foi determinada com base no número de conídios germinados e o total de conídios no campo. -Antes de realizar a leitura, em cada um dos períodos, foi adicionada uma gota de azul de lactofenol sobre cada gota de inóculo. O conídio foi considerado germinado quando o seu tubo germinativo apresentava tamanho igual ou superior ao maior diâmetro do conídio.

Para análise estatística foi utilizado o teste do Sinal (não paramétrico) a nível de 5% (Conover, 1980).

5.4 Ensaio em tecido de flavedo para avaliar o efeito de produtos alternativos na inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum*.

Para avaliar o efeito dos produtos alternativos na germinação de conídios de *P. digitatum* foram realizados ensaios em flavedo de laranja 'Pêra'.

O isolado de *P. digitatum* 10/97, foi repicado para placas com BDA e incubado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ com alternância de luz (12/12h) por sete dias para promover a esporulação. Uma suspensão de 2×10^5 conídios.mL⁻¹ foi preparada a partir destas colônias empregando-se a mesma metodologia descrita no item 5.2.1.

Os produtos foram testados em sete ensaios utilizando-se a mesma metodologia com a finalidade de viabilizar as leituras. Para cada tratamento foram utilizadas três lâminas, as quais após receberem as suspensões de conídios (50 μL) e dos produtos (50 μL), foram mantidas em câmara úmida escura a $25\pm 2^\circ\text{C}$. A germinação dos conídios foi avaliada em uma lâmina de cada tratamento, após o período de incubação de 21 horas pela observação (aumento de 200 vezes) de dez campos por lâmina, contando-se o total de conídios no campo e o número de conídios germinados. Ao realizar a leitura foi adicionada uma gota de azul de lactofenol sobre cada gota de inóculo. O conídio foi considerado germinado quando o seu tubo germinativo apresentava tamanho igual ou superior ao diâmetro do conídio.

A porcentagem de inibição da germinação dos conídios do fungo foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\% \text{ germinação na testemunha} - \% \text{ germinação no tratamento}}{\% \text{ germinação na testemunha}} \times 100$$

Como foi estudado um grande número de produtos, diversos ensaios foram instalados separadamente. No primeiro ensaio foram avaliados os seguintes produtos: prochloraz (Sportak 450 CE, AgrEvo), imazalil (Magnate 500, Agricur) a $1500 \mu\text{L.mL}^{-1}$, ácido acetilsalicílico (Aspisin, Farmasa - Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A.) a $10000 \mu\text{L.mL}^{-1}$; vinagre (Vinagre Castelo LTDA) a 20 e 30 % (v/v); solução de sais a 1,5 % (v/v), thiabendazole (Tecto 600, Novartis Agro) a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; suspensão de conídios (1×10^5 conídios. mL^{-1}) e água destilada esterilizada.

A solução de sais (1,5%) apresentava a seguinte composição: NH_4NO_3 ($37,10 \text{ g.L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($139,60 \text{ g.L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($10,12 \text{ g.L}^{-1}$), KNO_3 ($26,00 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ($17,70 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($50,70 \text{ g.L}^{-1}$), NaNO_3 ($11,10 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ($0,072 \text{ g.L}^{-1}$) e $\text{ZnMoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($0,0025 \text{ g.L}^{-1}$). Preparou-se com estes componentes uma solução estoque, a qual foi homogeneizada por agitação magnética e aquecimento, sendo diluída, em seguida, para a concentração de 1,5%(v/v).

No segundo ensaio foram avaliados os seguintes produtos: prochloraz a $100 \mu\text{L.mL}^{-1}$; bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, metabissulfito de sódio e sorbato de potássio à 1% (p/v); thiabendazole a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; suspensão de conídios (1×10^5 conídios. mL^{-1}) e água destilada esterilizada.

No terceiro ensaio foram avaliados os seguintes produtos: benzoato de sódio, ácido tartárico, ácido málico e metabissulfito de potássio à $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; *Bacillus subtilis* (Subtin 20) a $10000 \mu\text{L.mL}^{-1}$; Lonlife a $8000 \mu\text{L.mL}^{-1}$; thiabendazole a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; suspensão de conídios e água destilada esterilizada.

No quarto ensaio foram avaliados os seguintes produtos: Tween 80 a 3,4 % (v/v); óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Capim limão, Destilaria Três Barras LTDA) a 10 % (v/v) mais Tween 80 a 3,4 % (v/v); *Vanillosmopsis erythropapa* (Candeia) a 10 % (v/v) mais Tween 80 a 3,4 % (v/v); suspensão de pó-de-guaraná a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$; *Azadirachta indica* (Nim), *Calendula officinarum* e *Chenopodium ambrosioides* (Erva de Santa Maria) a 10 % (v/v), a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; suspensão de conídios (1×10^5 conídios. mL^{-1}) e água destilada esterilizada.

No quinto ensaio foram avaliados: carbonato de potássio, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido cítrico, ácido glutâmico, ácido acetilsalicílico, alanina,

asparagina, cisteína, lisina, glicina e fenilalanina à 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; thiabendazole a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; suspensão de conídios (1×10^5 conídios. mL^{-1}) e água destilada esterilizada.

No sexto ensaio foram avaliados: prolina, tirosina, triptofano, metionina, isoleucina à 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; óleos de soja, de eucalipto, de milho, de amêndoas, de oliva, de canola, de girassol à 5 % (v/v) mais 1,7 % (v/v) de Tween 80; extrato de própolis a 2,5 e 5 % (v/v); Bio-control a 500 e 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$; thiabendazole a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; suspensão de conídios (1×10^5 conídios. mL^{-1}) e água destilada esterilizada.

No sétimo ensaio foram avaliados: leite cru a 5 % (v/v); lecitina a 5% (v/v) mais Tween 20 a 0,015% (v/v); *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico Fresco, Produtos Alimentícios Fleischmann e Royal LTDA) a 0,5 e 1% (p/v); Tween 80 a 1,7% (v/v); Tween 20 a 0,015% (v/v); óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) a 1% (v/v) mais Tween 20 a 0,015% (v/v); óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) a 1% (v/v) mais Tween 20 a 0,015% (v/v) mais bicarbonato de sódio a 1 % (p/v); suspensão de conídios de *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium virens* e *Gliocladium roseum* com 8×10^6 , 3×10^6 e 8×10^6 conídios. mL^{-1} , respectivamente; thiabendazole a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; suspensão de conídios (1×10^5 conídios. mL^{-1}) e água destilada esterilizada.

5.5 Seleção de produtos alternativos *in vivo*

Com o objetivo de selecionar produtos alternativos aos fungicidas para o controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros, foram realizados seis ensaios em laranja 'Pêra'. O motivo da divisão foi devido ao número de produtos testados.

O isolado 10/97 de *P. digitatum*, foi repicado para placas com BDA e incubado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com alternância de luz (12/12horas) por sete dias para promover a

esporulação. Uma suspensão de conídios foi preparada a partir destas colônias empregando-se a mesma metodologia descrita no item 5.2.1.

As laranjas 'Pêra' foram adquiridas em galpão de embalagem no estágio fisiológico maduro, antes de receber qualquer tratamento pós-colheita. Os frutos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) por três minutos e enxaguados duas vezes em água de torneira. Após a secagem, os frutos foram colocados em bandejas de papelão identificadas.

Cada tratamento foi composto por dez frutos feridos com um tubo vazado (três milímetros de diâmetro), em dois pontos opostos na região equatorial do fruto, a uma profundidade de mais ou menos dois milímetros, atingindo a região do albedo. No quinto e sexto ensaios os tratamentos foram compostos por 20 frutos, diferindo dos demais ensaios.

Após o ferimento os frutos foram inoculados com 20 µl da suspensão do fungo contendo $1,7 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹. Em seguida, em cada ferimento, foram aplicados 20 µl da suspensão dos produtos, trocando-se as ponteiras descartáveis esterilizadas. Para o tratamento testemunha com inoculação colocou-se 20 µl de água destilada esterilizada. No tratamento testemunha sem inoculação colocou-se 40 µl de água destilada esterilizada em duas aplicações de 20 µl.

Os frutos foram incubados em uma sala em condições ambiente, à temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, umidade relativa de 85-90% e fotoperíodo de 12/12 horas. Estes parâmetros foram medidos e registrados pelo termohigrógrafo (Sato Keiryoki MFG CO, LTD; modelo R-704; rotação regulada para sete dias), além de observações diárias em um termômetro de máxima e mínima e outro de bulbo seco e úmido. Durante o armazenamento foram realizadas avaliações de incidência e severidade da doença, e presença de efeito

fitotóxico. As avaliações foram realizadas a cinco, seis e sete dias após a inoculação, conforme o ensaio considerado.

Em cada ferimento foi medido, com auxílio de uma régua flexível, o diâmetro médio da lesão nas posições horizontal e vertical, acompanhando a curvatura do fruto. Para cada ensaio, também foi medido a altura média de dez laranjas com a régua flexível acompanhando o seu formato. A severidade da doença foi calculada a partir do diâmetro médio das lesões de cada tratamento, descontando-se três milímetros do diâmetro do ferimento, pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Severidade} = \frac{\text{Diâmetro médio das lesões} \times 100}{\text{Altura média dos frutos}}$$

A incidência da doença foi calculada a partir do número de frutos infectados pela doença em cada tratamento, pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Incidência} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de frutos infectados} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de frutos}}$$

A porcentagem de controle da doença foi calculada a partir do diâmetro médio das lesões de cada tratamento, descontando-se três milímetros do diâmetro do ferimento, pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Controle} = \frac{\text{Testemunha com inóculo} - \text{Tratamento} \times 100}{\text{Testemunha com inóculo}}$$

No quarto, quinto e sexto ensaios foram realizadas análises físicas (cor da casca e dimensões horizontais e verticais dos frutos), físico-químicas e químicas (sólidos solúveis, pH e acidez total) das laranjas, com o objetivo de verificar a maturação das mesmas.

Tomou-se 10 frutos ao acaso no início da montagem dos tratamentos, armazenou-os em câmara fria à 4°C e 85-90% UR para posterior avaliação.

a) Sólidos solúveis (°Brix) – utilizou-se um refratômetro manual, marca Atago, com escala de 0 a 32 °Brix. Foram feitas leituras de 10 frutos, tomando-se uma alíquota de suco proveniente das duas metades de cada fruto espremido. A metodologia seguida foi descrita por Carvalho et al., (1990).

b) pH – determinado potenciométricamente em pHmetro Mettler Toledo-320, no suco de 10 frutos preparados individualmente na proporção de 1:9 em água destilada (Carvalho et al., 1990).

c) Acidez total – determinada nas correspondentes amostras anteriormente preparadas para determinação de pH, empregando-se NaOH (0,1N) para titulação até atingir pH 8,1. O resultado foi expresso em gramas de ácido cítrico anidro.100 mL⁻¹ (Carvalho et al., 1990).

d) Sólidos solúveis/acidez total ('ratio') – determinada pela relação direta entre °Brix e acidez total da amostra, sendo expressa em número puro (Carvalho et al., 1990).

e) Cor da casca – determinada na superfície da casca de dez frutos por ensaio, em duas posições opostas na região equatorial do fruto, utilizando um Colorímetro Minolta, modelo CR-300, com fonte de luz D65 e canhão aberto. Os resultados foram expressos baseado na representação de cor sólida pelo espaço de cor L* a* b*, onde:

+ L (branco); - L (preto) = Luminosidade

+ a (vermelho); - a (verde) = diagrama de cromacidade a*b*

+ b (amarelo); - b (azul) = diagrama de cromacidade a*b*

A metodologia seguida foi descrita por McGuire citada por Smilanick et al. (1995).

5.5.1 Primeiro ensaio *in vivo*.

Os produtos testados no primeiro ensaio *in vivo* foram: sorbato e metabissulfito de potássio a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; ácido tartárico e málico a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; benzoato de sódio a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; bicarbonato de sódio a $30000 \mu\text{g.mL}^{-1}$; metabólitos de *Bacillus subtilis* (Subtin 20) a $10000 \mu\text{l.mL}^{-1}$; *Lactobacillus* (Yakult S.A. Ind. e Com.) a 50% (v/v); *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico Fresco Fleishmann) a 5% (p/v); leite cru a 50% (v/v); tintura de própolis a 10% (v/v); Lonlife a $1500 \mu\text{l.mL}^{-1}$; extrato de *Azadirachta indica* (Nim) a 10% (p/v); *Chenopodium ambrosioides* (Erva de Santa Maria) a 10% (v/v) mais Tween 80 a 1,7% (v/v); *Calendula officinarum* a 10% (v/v); óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (Capim limão) e *Vanillosmopsis erythropapa* (Candeia) a 5% (v/v) mais Tween 80 a 1,7% (v/v); suspensão de sais a 1,5 % (v/v) (Mesma composição do item 5.4.1); Tween 80 a 1,7% (v/v) e vinagre de vinho tinto (Vinagre Castelo LTDA) a 20 e 30% (v/v) em comparação com thiabendazole (Tecto 600), prochloraz (Sportak 450 CE) a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e testemunha com e sem inoculação.

Todos os produtos foram preparados separadamente em uma solução de 50 mL, utilizando-se água destilada esterilizada contida em um Erlenmeyer de 125 mL. O extrato de Nim foi preparado a partir de folhas desidratadas na proporção de 10% (p/v). Com aquecimento em forno microondas durante três minutos e filtragem em gaze esterilizada, seguida de esterilização através de filtração com filtro Millipore de $0,2 \mu\text{m}$.

5.5.2 Segundo ensaio *in vivo*.

Os produtos testados foram: sorbato de potássio, benzoato de sódio e metabissulfito de sódio a 5000 e $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Lonlife a 5000, 8000 e $10000 \mu\text{L.mL}^{-1}$; ácido

ascórbico, salicílico, glutâmico, cítrico e bórico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, carbonato de sódio e potássio e bicarbonato de potássio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$; óleos de eucalipto, de amêndoa, de oliva, de milho, de soja, de canola e de girassol a 10% (v/v) mais Tween 80 a 1,7% (v/v); Tween 80 a 1,7% (v/v); lecitina de soja a 5,5% (v/v) mais Tween 80 a 1,7% (v/v); pó-de-guaraná a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em comparação com thiabendazole (Tecto 600) a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e testemunha com e sem inoculação.

Todos os produtos foram preparados de forma semelhante ao item 5.5.1, exceto os óleos e a lecitina. As emulsões de óleos e a lecitina foram preparadas em tubos de cultura com 10 mL de água destilada esterilizada. Inicialmente os óleos e a lecitina foram homogeneizados com o Tween 80 a 1,7% (v/v) com auxílio do Vortex, acrescentando posteriormente a água destilada esterilizada. A lecitina de soja em seguida também foi colocada em ultra som durante 10 minutos.

5.5.3 Terceiro ensaio *in vivo*.

Os produtos testados no terceiro ensaio foram: L - isoleucina, L - prolina, L - tirosina, L - triptofano, L - lisina monoclóridato, glicina, F - fenilalanina, L - asparagina monohidratada, L - alanina, L - metionina, cisteína clóridato, carbonato de sódio, metabissulfito de sódio, sorbato de potássio, bicarbonato de sódio e glutamato monossódico (Aji-no-moto) a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$; ácido acetilsalicílico (Aspisin) a $10000 \mu\text{L.mL}^{-1}$; Tween 20 a 0,015% (v/v); óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Capim limão) a $10000 \mu\text{L.mL}^{-1}$ mais Tween 20 a 0,015% (v/v); bicarbonato de sódio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ mais óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Capim limão) a $10000 \mu\text{L.mL}^{-1}$ mais Tween 20 a 0,015% (v/v); suspensão de conídios de *Trichoderma harzianum* (1051 ISM 04/97), *Gliocladium roseum*

(CCT - 1203 05/96) e *Gliocladium virens* (CCT - 3219 05/96) a $8,1 \times 10^6$, $8,6 \times 10^6$ e $2,9 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹, respectivamente; prochloraz (Sportak 450 CE) e imazalil (Magnate 500) a 1500 µL.mL⁻¹ em comparação com thiabendazole (Tecto 600) a 1500 µg.mL⁻¹ e testemunha com e sem inoculação.

5.5.4 Quarto ensaio *in vivo*.

Os produtos testados neste ensaio foram: *Sacharomyces cerevisiae* a 5% (p/v); *Gliocladium roseum* a $8,6 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹; *Sacharomyces cerevisiae* a 5% (p/v) mais *Gliocladium roseum* a $8,6 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ na proporção de 1:1; bicarbonato de sódio a 30000 µg.mL⁻¹; bicarbonato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de potássio, sorbato de potássio, metabissulfito de sódio, L – alanina, ácido bórico e glutamato monossódico a 10000 µg.mL⁻¹; Bio-control a 1000 µL.mL⁻¹; Tween 80 a 1,7% (v/v); *Cymbopogon citratus* a 5% (v/v) mais Tween 80 a 1,7% (v/v). Também, foram testadas as misturas de dois produtos, cada um na concentração de 10000 µL.mL⁻¹ (exceto bicarbonato de sódio a 30000 µg.mL⁻¹), com uma proporção de 1:1 em soluções de 50 mL: bicarbonato de sódio + sorbato de potássio; bicarbonato de sódio + carbonato de sódio; bicarbonato de sódio + carbonato de potássio; bicarbonato de sódio + metabissulfito de sódio; bicarbonato de sódio + ácido bórico; bicarbonato de sódio + bicarbonato de potássio; bicarbonato de sódio + L – alanina; bicarbonato de sódio + glutamato monossódico; carbonato de sódio + sorbato de potássio; carbonato de sódio + metabissulfito de sódio; carbonato de sódio + carbonato de potássio; carbonato de sódio + L – alanina; carbonato de sódio + glutamato monossódico; carbonato de sódio + ácido bórico; carbonato de sódio + bicarbonato de potássio; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + sorbato de potássio; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + carbonato de

sódio; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + carbonato de potássio; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + bicarbonato de potássio; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + bicarbonato de sódio; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + metabissulfito de sódio; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + ácido bórico; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + L – alanina; (*Cymbopogon citratus* mais Tween 80) + glutamato monossódico; sorbato de potássio + carbonato de potássio; sorbato de potássio + metabissulfito de sódio; sorbato de potássio + ácido bórico; sorbato de potássio + bicarbonato de potássio; sorbato de potássio + L – alanina; sorbato de potássio + glutamato monossódico; metabissulfito de sódio + carbonato de potássio; metabissulfito de sódio + ácido bórico; metabissulfito de sódio + bicarbonato de potássio; metabissulfito de sódio + L – alanina e metabissulfito de sódio + glutamato monossódico em comparação com thiabendazole (Tecto 600) a $1500 \mu\text{g i.a.mL}^{-1}$ e testemunha com e sem inoculação.

No quarto ensaio foi medido o valor do pH das soluções dos tratamentos, utilizando um pHmetro da marca Digimed e modelo TE-901 previamente calibrado com soluções tampões padrões de pH 4,00 e pH 7,00.

5.5.5 Quinto ensaio *in vivo*.

Os produtos testados neste ensaio foram: Agral (Zeneca Brasil Ltda) a 0,03% (v/v), ácido bórico a 1, 2, 3 e 4 % (p/v) com e sem adição de Agral a 0,03% (v/v) em comparação com thiabendazole (Tecto 600) a $1500 \mu\text{g i.a.mL}^{-1}$ e testemunha com e sem inoculação.

5.5.6 Sexto ensaio *in vivo*.

Neste ensaio foram testados: Agral (Zeneca Brasil Ltda) a 0,03% (v/v), bicarbonato de sódio a 1, 2, 3 e 4 % (p/v) com e sem adição de Agral a 0,03% (v/v) em comparação com thiabendazole (Tecto 600) a 1500 $\mu\text{g i.a. mL}^{-1}$ e testemunha com e sem inoculação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento e teste de patogenicidade

Os resultados obtidos demonstram a patogenicidade dos quatro isolados de *P. digitatum* a frutos cítricos. O aparecimento dos sintomas causados pelo fungo *P. digitatum* ocorreu no 4º dia após a inoculação. Todos os quatro isolados do teste de patogenicidade apresentaram sintomas característicos da doença. Nas laranjas inoculadas a incidência foi de 100%. Dos quatro isolados testados foi selecionado o 10/97 para os estudos subsequentes conforme descrito no item 5.

6.2 Comparação do método do flavedo na germinação de conídios de *Penicillium digitatum* com outros métodos.

A germinação realizada no tecido do flavedo da laranja apresentou uma porcentagem de conídios germinados de 88, 93, 90, 96 e 82%, respectivamente em 18, 19, 20, 21 e 22 horas de incubação, as quais são superiores aos demais tratamentos em todos os períodos de observações (Quadro 1). Nos períodos de leituras de 18, 19 e 20 horas após a incubação, as porcentagens de conídios germinados são altas (88, 93 e 91%), mas o

comprimento do tubo germinativo é pequeno. No período de 21 horas de incubação a germinação dos conídios foi alta (96%), apresentava o tubo germinativo com dimensões que facilitava a contagem. A partir de 21 horas, as hifas dos conídios germinados se entrelaçaram dificultando a leitura, motivo pelo qual o valor da germinação decresceu no período de incubação de 22 horas (82%). Neste método, os campos de observação não apresentam um único foco de leitura devido às irregularidade na superfície do tecido, devendo cuidadosamente regular o foco. Observa-se que o coeficiente de variação para a germinação por este método é menor que para os demais.

Quadro 1 - Comparação do método do flavedo na germinação de conídios de *Penicillium digitatum* com outros métodos.

Método	% de germinação de conídios ^x				
	Período de incubação (horas)				
	18	19	20	21	22
Flavedo de laranja*	88,5 (5,2) ^z	93,1 (3,5) ^z	90,5 (9,8) ^z	96,2 (2,7) ^z	82,4 (19,4) ^z
Epiderme de cebola*	41,9 (56,1)	91,3 (4,8)	16,7 (61,5)	55,0 (37,8)	25,9 (51,7)
Lâmina de microscopia plana	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (316,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Lâmina de microscopia plana revestida com poliestireno	0,2 (217,2)	1,8 (106,2)	6,9 (79,9)	2,7 (65,2)	0,4 (228,6)
Lâmina de microscopia plana revestida com ágar-água	0,0 (0,0)	0,9 (217,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,7 (217,4)
Lâmina de microscopia escavada	4,9 (66,0)	5,2 (27,4)	7,0 (53,5)	12,8 (32,2)	12,9 (23,5)

^x Média de 10 campos por gota, visualizados em uma lâmina.

^z Coeficiente de variação (C.V. %) utilizando os dados originais.

* Teste do Sinal (Análise estatística não paramétrica) ns=0,05.

Na epiderme da cebola, nota-se uma germinação irregular durante todos os períodos de incubação (42, 91, 17, 55 e 26%), com alto coeficiente de variação.

A germinação dos conídios foi nula, no método de lâmina de microscopia plana sem revestimento, em todos os períodos de observação. Nas lâminas de microscopia revestidas com poliestireno a germinação variou entre 0,2 e 6,9% e o coeficiente de variação entre 65,2 e 228,6%. Nesse método, a superfície hidrofóbica das lâminas mantém as gotas da suspensão de conídios com formato convexo, evitando o escorrimento. As lâminas cobertas com meio de cultura ágar-água também apresentaram uma taxa de germinação quase nula (0 e 0,9%), em todos os períodos considerados. No método da lâmina de microscopia escavada, observou-se uma germinação de 5, 5, 7, 13 e 13%, respectivamente em 18, 19, 20, 21 e 22 horas de incubação, mas com C.V. alto.

Analisando os coeficientes de variação (C.V.), verifica-se que o método do flavedo de laranja apresenta valores de C.V. de 5, 3, 10, e 3%, respectivamente em 18, 19, 20 e 21 horas de incubação. No período de 22 horas de incubação o coeficiente aumenta para 19%, provavelmente devido ao crescimento das hifas dos conídios germinados. Os dados da germinação de conídios de *P. digitatum*, quando testados em tecido de flavedo nos períodos de incubação de até 21 horas, apresenta um baixo C.V. (< 10%), com uma % de germinação de conídios entre 88 a 96%.

No método da cebola, o C.V. apresenta ampla variação, com valores de 56, 5, 61, 38 e 52%, respectivamente para as leituras realizadas após 18, 19, 20, 21 e 22 horas da incubação.

Empregando o teste do Sinal (Conover, 1980), uma análise estatística não paramétrica, foram comparados os métodos de germinação de conídios do flavedo de

laranja e o da epiderme da cebola. Em todos os períodos de incubação, exceto no período de 19 horas, o método do flavedo da laranja foi significativo a nível de 5% em relação ao método da epiderme da cebola. Considerando este resultado e os valores do C.V., bem como a porcentagem de germinação de conídios, conclui-se que o método do flavedo da laranja é o mais adequado para a avaliação da germinação dos conídios de *Penicillium digitatum*.

Os métodos da lâmina de microscopia plana revestida ou não com poliestireno ou ágar-água e o da lâmina escavada, apresentaram uma porcentagem de germinação de conídios entre 0 e 13%, não sendo possível utilizá-los nos estudos da germinação de conídios de *P. digitatum*. Nestes métodos verifica-se também valores de C.V. elevados com variação entre 0 e 316%, não havendo a necessidade do emprego do teste do Sinal.

A baixa ou nula germinação verificada nos métodos de lâminas de microscopia plana, revestida ou não com poliestireno ou ágar-água e os das lâminas escavadas, estão de acordo com os resultados obtidos em outras pesquisas. Os conídios de *P. digitatum* germinam prontamente em extratos de frutos de citros e em meio complexo como batata-dextrose-ágar (BDA). Eles também germinam em água contendo glicose, ácido ascórbico e misturas de ácidos orgânicos e açúcares simples, mas o desenvolvimento das hifas depende da adição de fonte de carbono e de nitrogênio. Pouca ou nenhuma germinação ocorre em água destilada (Kavanagh & Wood, 1971; Pelsler & Eckert, 1977). French et al. (1978), Eckert et al. (1992) e Eckert & Ratnayake (1994) também relatam que a germinação de conídios de *P. digitatum* geralmente é baixa ou nula em água destilada ou em meio de cultura ágar-água.

Das duas espécies mais comuns de *Penicillium* que ocorrem em citros, *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, a primeira é mais fastidiosa nutricionalmente, infectando somente frutos cítricos e requerendo uma mistura de nutrientes específicos para vigorosa germinação e desenvolvimento das hifas (Eckert et al., 1992). Deste modo, o efeito do tecido do flavedo, na resposta à germinação dos conídios de *P. digitatum*, apresentou resultados promissores podendo este método ser empregado na seleção de produtos que atuam na inibição da germinação de conídios de *P. digitatum*.

6.3 Ensaio em tecido de flavedo para avaliar o efeito de produtos alternativos na inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum*.

Os resultados da inibição da germinação de conídios de *P. digitatum* dos sete ensaios realizados são apresentados no Quadro 2.

Bicarbonato de potássio, alanina, ácido tartárico, ácido málico, lisina, glicina, fenilalanina, prolina, tirosina, triptofano, metionina, isoleucina, *Calendula officinarum*, *Chenopodium ambrosioides*, *Azadirachta indica*, pó-de-guaraná, leite cru, Lonlife, Tween 80, Tween 20, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de oliva, óleo de amêndoas, óleo de milho, óleo de soja, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium virens* e *Gliocladium roseum* não inibiram a germinação de conídios de *P. digitatum*.

O fungicida thiabendazole inibiu a germinação de conídios entre 5 e 26%. As hifas dos conídios germinados apresentaram paralisação do desenvolvimento, bem como nítidas deformações. No primeiro ensaio, ocorreu interferência na leitura da germinação dos conídios pela presença de partículas do fungicida utilizado na concentração de 1500

Quadro 2 – Efeito de diferentes produtos na inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum*, utilizando o método do flavedo após 21 h de incubação.

Tratamento	% Inibição ^z
Água destilada esterilizada	-
Prochloraz 1500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	100
Imazalil 1500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	100
Ácido acetilsalicílico 10000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	100
Vinagre 20%	100
Vinagre 30%	100
Solução de 'sais' 1,5 %	3,0
Thiabendazole 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	16,1
Prochloraz 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	38,1
Bicarbonato de sódio 1%	95,1
Carbonato de sódio 1%	96,2
Metabissulfito de sódio 1%	100
Sorbato de potássio 1%	100
Bicarbonato de potássio 1%	0
Thiabendazole 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	26,4
Benzoato de sódio 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100
Ácido tartárico 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0
Ácido málico 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0
Metabissulfito de k 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100
<i>Bacillus subtilis</i> 10000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	11,2
Lonlife a 8000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0
Thiabendazole 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	18,8
Tween 80 a 3,4 %	0
<i>Cymbopogon citratus</i> a 10 % + Tween 80 a 3,4 %	14,2
<i>Vanillosmopsis erytropapa</i> 10 % + Tween 80 a 3,4 %	0
Pó-de-guaraná a 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0
<i>Azadirachta indica</i> (Nim) 10%	0
<i>Calendula officinarum</i> 10%	0
<i>Chenopodium ambrosioides</i> 10%	0
Thiabendazole 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14
Carbonato de potássio 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100
Ácido ascórbico 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	80,1
Ácido bórico 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100
Ácido cítrico 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	91,1
Ácido glutâmico 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	11,2
Ácido acetilsalicílico 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0
Alanina 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0
Asparagina 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	97,8
Cisteína 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100

Continua

Tratamento	% Inibição ^z
Lisina 10000 µg.mL ⁻¹	0
Glicina 10000 µg.mL ⁻¹	0
Fenilalanina 10000 µg.mL ⁻¹	0
Thiabendazole 100 µg.mL ⁻¹	4,9
Prolina 10000 µg.mL ⁻¹	0
Tirosina 10000 µg.mL ⁻¹	0
Triptofano 10000 µg.mL ⁻¹	0
Metionina 10000 µg.mL ⁻¹	0
Isoleucina 10000 µg.mL ⁻¹	0
Óleo de soja 5 % + Tween 80 1,7 %	0
Óleo de eucalipto 5 % + Tween 80 1,7 %	50,6
Óleo de milho 5 % + Tween 80 1,7 %	0
Óleo de amêndoas 5 % + Tween 80 1,7 %	0
Óleo de oliva 5 % + Tween 80 1,7 %	0
Óleo de canola 5 % + Tween 80 1,7 %	0
Óleo de girassol 5 % + Tween 80 1,7 %	0
Própolis 2,5 %	98,3
Própolis 5 %	73
Bio-control 500 µL.mL ⁻¹	26,4
Bio-control 1000 µL.mL ⁻¹	59,6
Thiabendazole 100 µg.mL ⁻¹	5
Leite cru 5 %	0
Lecitina 5% + Tween 20 a 0,015%	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 0,5 %	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1%	0
Tween 80 a 1,7%;	0
Tween 20 a 0,015%	0
<i>Cymbopogon citratus</i> 1% + Tween 20 a 0,015%	95
<i>Cymbopogon citratus</i> 1% + Tween 20 a 0,015% + bicarbonato Na 1%	97,7
<i>Trichoderma harzianum</i> 8,1x10 ⁶	0
<i>Gliocladium virens</i> 3x10 ⁶	0
<i>Gliocladium roseum</i> 8,6x10 ⁶	0
Thiabendazole 100 µg.mL ⁻¹	6

^zMédia de 10 campos por tratamento.

µg.mL⁻¹. Para evitar este problema, nos ensaios seguintes, reduziu-se a concentração da solução do fungicida para 100 µg.mL⁻¹. Estes resultados confirmam as observações realizadas por Gottlieb & Kumar citados por Gutter et al. (1981). Eles verificaram que thiabendazole detêm a elongação e o crescimento do micélio mais eficientemente do que inibe a germinação

de conídios de *P. digitatum*. O fungicida imazaliil inibiu a germinação em 100%, enquanto que o prochloraz inibiu entre 38-100%.

Bicarbonato e carbonato de sódio, *Cymbopogon citratus* mais Tween 20, ácido ascórbico, asparagina e extrato de própolis apresentaram inibição da germinação de conídios de *P. digitatum* acima de 80%, enquanto que a solução de sais, ácido glutâmico, óleo de eucalipto e *B. subtilis* inibiram entre 3-51%.

Inibiram totalmente a germinação de conídios de *P. digitatum* os seguintes produtos alternativos: vinagre, carbonato de potássio, metabissulfito de sódio e potássio, sorbato de potássio, ácido bórico, benzoato de sódio e cisteína (Quadro 2). Estes produtos podem apresentar potencial de controle da doença em frutos.

6.4 Seleção de produtos alternativos *in vivo*

Em todos os ensaios realizados os fungicidas thiabendazole, prochloraz e imazalil controlaram totalmente a doença (Quadros 3-9), mostrando a alta efetividade dos produtos e estando de acordo com a literatura (Eckert & Ogawa, 1985; Gutter et al., 1981; Homes & Eckert, 1995; Peres et al., 1997; Smilanick et al., 1997). Desta forma, os produtos selecionados como padrões foram adequados.

6.4.1 Primeiro ensaio

Bicarbonato de sódio controlou a doença em 100%, enquanto que sorbato de potássio, *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico Fleischmann) e *Cymbopogon citratus* (óleo essencial de capim limão) apresentaram controle de 68, 64 e 59 %, respectivamente. Já os tratamentos de benzoato de sódio, ácido tartárico, própolis e *Azadiracta indica* (Nim) controlaram a doença em 22, 15, 12 e 2 %, respectivamente. Os

demais produtos (Tween 80, vinagre a 20 e 30%, sais, *Vanillosmopsis erythropapa* mais Tween 80, *Calendula officinarum*, *Chenopodium ambrosioides* mais Tween 80, Lonlife, leite cru, *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis*, metabissulfito de potássio e ácido málico) não foram efetivos no controle do *P. digitatum* em frutos de laranja 'Pêra' (Quadro 3).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou efeito fitotóxico na casca dos frutos de laranja, ao redor dos ferimentos da inoculação. Foram observados halos de fitotoxicidade com média de diâmetro de 0,4 mm, após sete dias da inoculação. Também foi observado, que este tratamento apresentou menor incidência de frutos infectados pela doença (Quadro 3).

6.4.2 Segundo ensaio

Carbonato de sódio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, metabissulfito de sódio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ácido bórico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, bicarbonato de potássio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, carbonato de potássio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Tween 80 a 1,7%, Lonlife a $5000 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e sorbato de potássio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ controlaram em 92, 81, 72, 68, 68, 56, 54 e 51 %, respectivamente. Já os tratamentos de ácido glutâmico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, lecitina de soja a 5,5%, óleo de soja a 10%, benzoato de sódio $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ácido salicílico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ácido ascórbico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ácido cítrico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, óleo de amêndoas a 10%, óleo de milho a 10%, Lonlife a $8000 \mu\text{L.mL}^{-1}$, metabissulfito de sódio a $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, óleo de oliva a 10% e guaraná a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ controlaram a doença em 22, 17, 16, 15, 14, 13, 13, 10, 10, 10, 10, 9 e 5 %, respectivamente.

A severidade do bolor verde na testemunha com inóculo foi de 87% e para o tratamento com carbonato de sódio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi de 7% (Quadro 4).

Quadro 3 – Seleção de produtos alternativos para o controle de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja ‘Pêra’.

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Testemunha com inóculo	90	3,7	36,9	0,0
Ácido málico 1500 µg.mL ⁻¹	90	4,6	46,1	0,0
Metabissulfito K 1500 µg.mL ⁻¹	90	5,6	56,1	0,0
<i>Bacillus subtilis</i> 1%	70	5,3	52,5	0,0
<i>Lactobacillus</i> – Yakult 50%	80	5,6	56,4	0,0
Leite cru 50%	80	6,2	61,6	0,0
Lonlife 1500 µL.mL ⁻¹	100	6,1	61,0	0,0
<i>Chenopodium ambrosioides</i> 10% + Tween 80 a 1,7%	80	4,4	43,9	0,0
<i>Calendula officinarum</i> 10%	90	4,8	47,9	0,0
<i>Vanillosmopsis erythropapa</i> 5% + Tween 80 a 1,7%	60	4,1	41,0	0,0
Sais 1,5%	90	4,9	48,8	0,0
Vinagre 20%	90	5,6	55,9	0,0
Vinagre 30%	100	5,6	55,6	0,0
Tween 80 a 1,7%	80	3,8	37,6	0,0
<i>Azadirachta indica</i> 10%	80	3,6	36,0	2,0
Tintura de própolis 10%	80	3,2	32,2	12,0
Ácido tartárico 1500 µg.mL ⁻¹	70	3,1	31,5	15,0
Benzoato de Na 1500 µg.mL ⁻¹	80	2,9	28,9	22,0
<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%	20	2,1	21,1	59,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%	40	1,3	13,3	64,0
Sorbato K 1500 µg.mL ⁻¹	40	1,2	12,0	68,0
Testemunha sem inóculo	0	0,0	0,0	100,0
Thiabendazole 1500 µg.mL ⁻¹	0	0,0	0,0	100,0
Prochloraz 1500 µL.mL ⁻¹	0	0,0	0,0	100,0
Bicarbonato Na 3%	0	0,0	0,0	100,0

^x Dez frutos por tratamento; ^y Diâmetro médio da lesão em 20 ferimentos por tratamento; ^z S=(DML/Alt. f.) x100
Leitura após 7 dias de incubação a 25°C±5 e 85-90% UR.

6.4.3 Terceiro ensaio

G. roseum, sorbato de potássio, metabissulfito de sódio, carbonato de sódio e alanina apresentaram controle de 98, 97, 94, 92 e 91%, respectivamente do bolor verde. Já os tratamentos com glutamato monossódico, lisina, glicina, isoleucina e bicarbonato de sódio controlaram a doença em 84, 77, 71, 67 e 66%, respectivamente (Quadro 5).

Quadro 4 – Seleção de produtos alternativos para o controle de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra'.

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Testemunha com inóculo	100	8,7	87,0	0,0
Óleo eucalipto 10% + Tween 80 a 1,7%	100	8,7	87,0	0,0
Óleo de canola 10% + Tween 80 a 1,7%	100	8,7	87,0	0,0
Óleo de girassol 10% + Tween 80 a 1,7%	100	8,7	87,0	0,0
Pó-de-guaraná 1%	100	8,2	82,5	5,2
Óleo de oliva 10% + Tween 80 a 1,7%	100	7,9	79,3	8,9
Metabissulfito Na 0,5%	100	7,8	78,0	10,3
Lonlife 0,8%	100	7,8	78,0	10,3
Óleo de milho 10% + Tween 80 a 1,7%	100	7,8	78,0	10,3
Óleo de amendoas 10% + Tween 80 a 1,7%	90	7,8	78,0	10,3
Ácido cítrico 1%	100	7,6	75,8	12,9
Ácido ascórbico 1%	100	7,6	75,6	13,1
Ácido salicílico 1%	100	7,5	74,6	14,2
Benzoato Na 0,5%	100	7,4	74,1	14,8
Óleo de soja 10% + Tween 80 a 1,7%	100	7,3	72,8	16,4
Lecitina de soja 5,5% + Tween 80 a 1,7%	90	7,2	72,4	16,8
Ácido glutâmico 1%	100	6,8	68,0	21,8
Sorbato K 0,5%	100	6,7	66,8	23,3
Lonlife 1%	90	6,1	60,6	30,3
Benzoato Na 1% ¹	80	4,9	49,3	43,4
Sorbato K 1%	90	4,2	42,3	51,4
Lonlife 0,5%	70	4,0	40,0	54,0
Tween 80 a 1,7%	100	3,8	38,2	56,1
Carbonato K 1%	60	2,8	28,0	67,8
Bicarbonato K 1%	50	2,8	27,6	68,2
Ácido bórico 1%	40	2,4	24,0	72,4
Metabissulfito Na 1%	40	1,6	16,4	81,2
Carbonato Na 1%	30	0,7	7,0	92,0
Testemunha sem inóculo	0	0,0	0,0	100,0
Thiabendazole 1500 µg.mL ⁻¹	0	0,0	0,0	100,0

^x Dez frutos por tratamento; ^y Diâmetro médio da lesão em 20 ferimentos por tratamento; ^z S=(DML/Alt. f.) x100
Leitura após 7 dias de incubação a 25°C±5 e 85-90% UR.

Quadro 5 – Seleção de produtos alternativos para o controle de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja ‘Pêra’.

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Testemunha com inóculo	90	6,0	59,9	0,0
<i>Trichoderma harzianum</i> 8,1 x 10 ⁶ conídios.mL ⁻¹	100	5,4	53,7	10,3
Asparagina 1%	90	4,3	43,4	27,5
Cisteína 1%	90	4,1	41,3	31,0
<i>Gliocladium virens</i> 2,9 x 10 ⁶ conídios.mL ⁻¹	70	4,1	41,0	31,5
<i>Cymbopogon citratus</i> 1% + Tween 20 a 0,015%	80	3,6	36,3	39,4
Prolina 1%	60	3,5	34,8	42,0
Ácido acetilsalicílico 1%	90	3,4	34,5	42,4
Triptofano 1%	80	3,2	31,7	47,1
Tween 20 a 0,015%	50	2,9	29,0	51,6
Bicarbonato Na 1% + <i>Cymbopogon citratus</i> 1% + Tween 20 a 0,015%	70	2,7	27,0	54,9
Tirosina 1%	60	2,6	26,5	55,8
Metionina 1%	60	2,4	24,2	59,6
Fenilalanina 1%	80	2,3	22,8	62,0
Bicarbonato Na 1%	50	2,0	20,3	66,2
Isoleucina 1%	30	1,9	19,5	67,4
Glicina 1%	60	1,7	17,3	71,1
Lisina 1%	40	1,4	13,7	77,1
Glutamato monossódico 1%	40	1,0	9,7	83,9
Alanina 1%	30	0,6	5,6	90,7
Carbonato Na 1%	30	0,5	5,0	91,6
Metabissulfito Na 1%	20	0,4	3,6	93,9
Sorbato K 1%	10	0,1	1,5	97,5
<i>Gliocladium roseum</i> 8,6 x 10 ⁶ conídios.mL ⁻¹	50	0,1	1,2	98,0
Testemunha sem inóculo	0	0,0	0,0	100,0
Thiabendazole 1500 µg.mL ⁻¹	0	0,0	0,0	100,0
Prochloraz 1500 µL.mL ⁻¹	0	0,0	0,0	100,0
Imazalil 1500 µL.mL ⁻¹	0	0,0	0,0	100,0

^xDez frutos por tratamento; ^y Diâmetro médio da lesão em 20 ferimentos por tratamento; ^z S=(DML/Alt. f.) x100
Leitura após 7 dias de incubação a 25°C±5 e 85-90% UR.

Os tratamentos de fenilalanina, metionina, tirosina, Tween mais *C. cyratus* mais bicarbonato, Tween 20, apresentaram controle de 62, 60, 56, 55 e 52%, respectivamente. Tratamentos com nível de controle de 47, 42, 42, 39, 31, 31, 27 e 10%

foram respectivamente triptofano, ácido acetilsalicílico, prolina, Tween mais *C. citratus*, *G. vireus*, cisteína, asparagina e *T. harzeanum*.

Os controles mais efetivos do bolor verde foram obtidos com *G. roseum*, sorbato de potássio, metabissulfito de sódio, carbonato de sódio e alanina (Quadro 5).

6.4.4 Quarto ensaio

Thiabendazole controlou a doença em 100%, enquanto que carbonato de sódio mais ácido bórico, bicarbonato de sódio, ácido bórico, bicarbonato de sódio mais ácido bórico, metabissulfito de sódio e carbonato de sódio mais carbonato de potássio apresentaram controle de 90, 89, 84, 76, 74 e 70%, respectivamente. Já os tratamentos de carbonato de sódio, metabissulfito de sódio mais ácido bórico, carbonato de sódio mais sorbato de potássio, bicarbonato de sódio mais carbonato de sódio, carbonato de sódio mais bicarbonato de potássio, *Cymbopogon citratus* mais Tween 80 e bicarbonato de sódio mais L-alanina controlaram a doença em 69, 67, 66, 65, 61, 61 e 59%, respectivamente. Os demais tratamentos apresentaram níveis de controle abaixo de 60% (Quadro 6).

Os controles mais efetivos do bolor verde foram obtidos com carbonato de sódio mais ácido bórico, bicarbonato de sódio, ácido bórico, carbonato de sódio os quais apresentam incidência de frutos infectados pela doença de 4, 4, 5 e 5, respectivamente.

A severidade do bolor verde na testemunha foi de 94 % e para o tratamento com carbonato de sódio mais ácido bórico foi de 9 % (Quadro 6).

Os resultados das análises físicas, físico-químicas e químicas da matéria prima são apresentados no Apêndice.

Quadro 6 – Seleção de produtos alternativos para o controle de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra'.

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Testemunha com inóculo	100	9,4	93,6	0,0
Bio-control 1000 µL.mL ⁻¹	100	9,4	94,1	0,0
Tween 80 a 1,7%	100	9,7	97,0	0,0
<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Glutamato monossódico 1%	100	8,9	89,0	4,9
<i>Gliocladium roseum</i> 8,6 x 10 ⁶ conídios/mL	100	8,5	85,4	8,8
Alanina 1%	100	8,5	84,9	9,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%	100	8,4	84,5	9,7
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> 5% + <i>Gliocladium roseum</i> 8,6 x 10 ⁶ conídios/mL	100	8,4	84,4	9,9
Metabissulfito Na 1% + Bicarbonato K 1%	100	8,4	84,0	10,3
Bicarbonato Na 3% + Metabissulfito Na 1%	100	7,7	76,9	17,9
Glutamato monossódico 1%	100	7,7	76,8	18,0
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%) + Bicarbonato K 1%	90	7,6	75,9	18,9
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5%+ Tween 80 a 1,7%) + Metabissulfito Na 1%	100	7,5	75,1	19,8
Metabissulfito Na 1% + Carbonato K 1%	100	7,2	71,8	23,4
Carbonato Na 1% + Metabissulfito Na 1%	100	7,1	71,0	24,2
Sorbato K 1% + Alanina 1%	90	7,1	70,8	24,4
Sorbato K 1% + Bicarbonato K 1%	100	7,0	69,8	25,5
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%) + Carbonato Na 1%	100	6,8	68,4	27,0
Sorbato K 1% + Metabissulfito Na 1%	100	6,8	68,4	27,0
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%) + Sorbato K 1%	100	6,7	67,0	28,4
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%) + Carbonato K 1%	100	6,7	66,8	28,7
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%) + Alanina 1%	100	6,7	66,6	28,8
Metabissulfito Na 1% + Glutamato monossódico 1%	100	6,6	65,8	29,8
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%)+ Ácido bórico 1%	100	5,9	58,6	37,4

Continua

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Metabissulfito Na 1% + Glutamato monossódico 1%	100	6,6	65,8	29,8
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%)+ Ácido bórico 1%	100	5,9	58,6	37,4
Metabissulfito Na 1% +Alanina 1%	100	5,5	54,8	41,5
Sorbato K 1%	100	5,3	52,9	43,5
Sorbato K 1% + Glutamato monossódico 1%	90	5,3	52,7	43,7
Carbonato Na 1% + Glutamato monossódico 1%	90	5,2	52,5	43,9
Bicarbonato Na 3% + Carbonato K 1%	70	5,1	50,8	45,8
Bicarbonato K 1%	80	4,9	48,6	48,1
Bicarbonato Na 3%+Sorbato K 1%	90	4,8	48,1	48,7
Carbonato Na 1%+ Alanina 1%	90	4,8	47,9	48,8
Sorbato K 1% + carbonato K 1%	100	4,7	46,9	49,9
Carbonato K 1%	90	4,7	46,7	50,1
Bicarbonato Na 3% + Glutamato monossódico 1%	70	4,4	44,4	52,6
Bicarbonato Na 3% + Bicarbonato K 1%	80	4,2	42,3	54,8
(<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%) + Bicarbonato Na 3%	100	4,1	41,3	55,9
Sorbato K 1% + Ácido bórico 1%	90	4,0	40,6	56,7
Bicarbonato Na 3% + Alanina 1%	70	3,8	38,0	59,4
<i>Cymbopogon citratus</i> 5% + Tween 80 a 1,7%	80	3,7	36,7	60,8
Carbonato Na 1% + Bicarbonato K 1%	80	3,7	36,7	60,8
Bicarbonato Na 3% + Carbonato Na 1%	70	3,2	32,3	65,5
Carbonato Na 1%+ Sorbato K 1%	60	3,2	31,8	66,0
Metabissulfito Na 1% + Ácido bórico 1%	80	3,1	31,1	66,8
Carbonato Na 1%	50	2,9	28,6	69,4
Carbonato Na 1% + Carbonato K 1%	60	2,8	28,1	70,0
Metabissulfito Na 1%	90	2,4	23,9	74,4
Bicarbonato Na 3% + Ácido bórico 1%	60	2,2	22,2	76,3
Ácido bórico 1%	50	1,5	14,7	84,3
Bicarbonato Na 3%	40	1,0	10,3	89,0
Carbonato Na 1% + Ác. bórico 1%	40	0,9	9,1	90,3

Continua

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Testemunha sem inóculo	0	0,0	0,0	100,0
Thiabendazole 1500 µg.mL ⁻¹	0	0,0	0,0	100,0

^x Dez frutos por tratamento; ^y Diâmetro médio da lesão em 20 ferimentos por tratamento; ^z S=(DML/Alt. f.) x100
 Leitura após 5 dias de incubação a 25°C±5 e 85-90% UR.
 Misturas das soluções foram realizadas na proporção de 1:1.

Os valores do pH das soluções dos tratamentos mais efetivos, carbonato de sódio mais ácido bórico, bicarbonato de sódio, ácido bórico e carbonato de sódio foram respectivamente de 9,1; 9,4; 6,0 e 10,3 (Quadro 7).

Quadro 7 – Valores do pH das soluções utilizadas no quarto ensaio em frutos de laranja ‘Pêra’.

Tratamento	pH
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Metabissulfito Na	2,3
Bio-control	2,5
<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80	3,2
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Ácido bórico	3,5
Metabissulfito Na + Ácido bórico	3,5
Metabissulfito Na + L - Alanina	3,8
Metabissulfito de Na	4,1
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Alanina	4,1
Metabissulfito Na + Glutamato Na	4,7
Tween 80	4,8
<i>Gliocladium roseum</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Glutamato Na	5,3
Sorbato K + Metabissulfito Na	5,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,8
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Sorbato K	5,9
Ácido bórico	6
Sorbato K + Ácido bórico	6,7
Testemunha com inóculo	6,8
Metabissulfito Na + Bicarbonato K	6,9
<i>Gliocladium roseum</i>	7
Alanina	7
Glutamato monossódico	7,1
Sorbato K + L - Alanina	7,2
Thiabendazole	7,3
Sorbato K + Glutamato Na	7,3
Testemunha sem inóculo	7,4
Sorbato K	7,5
Metabissulfito Na + Carbonato K	8,7

Continua

Tratamento	pH
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Bicarbonato K	8,8
Bicarbonato Na + Ácido bórico	8,9
Bicarbonato Na + Metabissulfito Na	9
Carbonato Na + Metabissulfito Na	9
Bicarbonato Na + Sorbato K	9,1
Bicarbonato Na + Bicarbonato K	9,1
Bicarbonato Na + L - Alanina	9,1
Bicarbonato Na + Glutamato monossódico	9,1
Carbonato Na + Ácido bórico	9,1
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Bicarbonato Na	9,2
Sorbato K + Bicarbonato K	9,2
Bicarbonato K	9,4
Bicarbonato Na	9,4
Bicarbonato Na + Carbonato Na	9,4
Bicarbonato Na + Carbonato K	9,4
Carbonato Na + L - Alanina	9,5
Carbonato Na + Glutamato monossódico	9,7
Carbonato Na + Bicarbonato K	9,8
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Carbonato Na	10
(<i>Cymbopogon citratus</i> + Tween 80) + Carbonato K	10
Carbonato K	10,2
Carbonato Na + Sorbato K	10,2
Carbonato Na	10,3
Sorbato K + Carbonato K	10,3
Carbonato Na + Carbonato K	10,5

6.4.5 Quinto ensaio

Os tratamentos com ácido bórico a 1%, ácido bórico a 1% mais Agral, ácido bórico a 2% mais Agral e ácido bórico a 3% controlaram a doença em 78, 87, 98 e 98%, respectivamente. Ácido bórico a 2% e ácido bórico a 3% mais Agral controlaram a doença em 100%, enquanto que o espalhante adesivo Agral não apresentou efeito sobre a doença (Quadro 8). O controle do bolor verde utilizando o ácido bórico com o espalhante adesivo Agral não apresentou diferença em relação apenas ao ácido bórico em todas as concentrações. O tratamento com eficiência no controle de 100% e incidência nula da doença foi verificado com o emprego do ácido bórico a 2% (Quadro 8).

Quadro 8 – Seleção de produtos alternativos para o controle de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra'.

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Agral 0,03%	95	8,8	87,7	0,0
Testemunha com inóculo	100	8,7	86,6	0,0
Ácido Bórico 1%	45	1,9	19,2	77,9
Ácido Bórico 1% + Agral 0,03%	45	1,1	11,1	87,2
Ácido Bórico 2% + Agral 0,03%	15	0,2	1,7	98,0
Ácido Bórico 3%	5	0,1	1,5	98,3
Testemunha sem inóculo	0	0,0	0,0	100,0
Thiabendazole 1500 ppm	0	0,0	0,0	100,0
Ácido Bórico 2%	0	0,0	0,0	100,0
Ácido Bórico 3% + Agral 0,03%	0	0,0	0,0	100,0
Ácido Bórico 4%	0	0,0	0,0	100,0
Ácido Bórico 4% + Agral 0,03%	0	0,0	0,0	100,0

^x 20 frutos por tratamento; ^y Diâmetro médio da lesão em 40 ferimentos por tratamento; ^z $S=(DML/Alt. f.) \times 100$.
Leitura após 6 dias de incubação a 25°C±5 e 85-90% UR.

A severidade do bolor verde na testemunha foi de 87 %, sendo nulas para os tratamentos com ácido bórico a 2%, ácido bórico a 3% mais Agral, ácido bórico a 4%, ácido bórico a 4% mais Agral (Quadro 8).

6.4.6 Sexto ensaio

Os tratamentos com bicarbonato de sódio a 1% mais Agral, bicarbonato de sódio a 1%, bicarbonato de sódio a 4%, bicarbonato de sódio a 2% mais Agral, bicarbonato de sódio a 2%, bicarbonato de sódio a 3%, bicarbonato de sódio a 4% mais Agral e bicarbonato de sódio a 3% mais Agral controlaram a doença em 67, 79, 90, 93, 94, 96, 97 e 99%, respectivamente (Quadro 9).

O controle do bolor verde utilizando bicarbonato de sódio com o espalhante adesivo Agral, não apresentou diferença em relação apenas ao uso do bicarbonato de sódio em todas as concentrações. O tratamento com eficiência no controle de 94% e incidência de 15% da doença foi verificado com o emprego do bicarbonato de sódio a 2% (Quadro 9).

Quadro 9 – Seleção de produtos alternativos para o controle de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja ‘Pêra’.

Tratamento	Incidência ^x	Lesão ^y	Severidade ^z	% Controle
Agral 0,03%	95	8,8	87,7	0
Testemunha com inóculo	100	8,7	86,6	0,4
Bicarbonato Na 1% + Agral 0,03%	60	2,9	29,1	66,6
Bicarbonato Na 1%	35	1,8	18,0	79,3
Bicarbonato Na 4%	20	0,8	8,5	90,3
Bicarbonato Na 2% + Agral 0,03%	30	0,6	5,9	93,3
Bicarbonato Na 2%	15	0,6	5,5	93,7
Bicarbonato Na 3%	15	0,3	3,2	96,3
Bicarbonato Na 4% + Agral 0,03%	10	0,2	2,2	97,5
Bicarbonato Na 3% + Agral 0,03%	5	0,1	0,9	99,0
Testemunha sem inóculo	0	0,0	0,0	100
Thiabendazole 1500 ppm	0	0,0	0,0	100

^x 20 frutos por tratamento; ^y Diâmetro médio da lesão em 40 ferimentos por tratamento; ^z S=(DML/Alt. f.) x100
Leitura após 6 dias de incubação a 25°C±5 e 85-90% UR.

Os resultados das análises químicas, tamanho e coloração dos frutos foram os mesmos obtidos no item 6.4.5 e Apêndice .

Imazalil avaliado no primeiro ensaio no flavedo (Quadro 2) apresentou inibição superior na germinação de conídios de *P. digitatum* em relação a thiabendazole. Nos ensaios *in vivo*, ambos fungicidas apresentaram eficiente controle do bolor verde em frutos de laranja ‘Pêra’ (Quadro 5). O emprego desses fungicidas em pós-colheita de citros para o controle do bolor verde causado por *P. digitatum* é relatado por Eckert & Ogawa (1985), Peres et al. (1997) e Smilanick et al. (1997).

Prochloraz apresentou inibição da germinação de conídios de *P. digitatum* de 100 e 38%, respectivamente no primeiro e segundo ensaio no tecido de flavedo (Quadro 2). Entretanto, sua eficiência no controle do bolor verde em frutos de laranja ‘Pêra’ sempre foi de 100%, verificado no primeiro e terceiro ensaio *in vivo* (Quadros 3 e 5).

Ácido acetilsalicílico apresentou resultados opostos de 100% e 0% de inibição na germinação de conídios, respectivamente no 1º e 5º ensaios no flavedo (Quadro 2). No controle do bolor verde em frutos de laranja, apresentou 42% no controle da doença, com incidência da mesma em 90% dos frutos inoculados (Quadro 5).

Vinagre a 20 e 30% utilizados no 1º ensaio do flavedo (Quadro 2) apresentaram eficientes inibições nas germinações de conídios de *P. digitatum*. Efeito contrário foi verificado em frutos de laranja, com ausência de controle do bolor verde (Quadro 3). Na composição do Vinagre Castelo existe cerca de 4% de ácido acético. Este ácido em fumigação (2 mg.L^{-1}), foi utilizado para o controle do bolor verde em pós-colheita de citros com redução da doença de 86 para 11% (Sholberg, 1998) e na prevenção de doenças pós-colheita (Sholberg & Gaunce, 1995) e em cereais (Rusul et al., 1987). Neste trabalho, provavelmente o ácido acético existente no vinagre volatilizou e perdeu-se, não ocorrendo o efeito de fumigação sobre os conídios do fungo como relatado por Sholberg (1998). Bettiol (dados não publicados) obteve controle de *Botrytis*, *Penicillium*, *Monilinia* em frutos de maçã com o uso de vinagre em concentrações semelhantes.

A solução de sais elaborada a partir do resultado da análise química do resíduo de fermentação glutâmica do melaço (RFGM), empregada no 1º ensaio do flavedo, apresentou 3% de inibição da germinação de conídios do fungo. Este nível de controle na germinação, provavelmente foi devido a ação direta dos sais sobre os conídios. Seu efeito no controle de *P. digitatum* em frutos do primeiro ensaio foi nulo (Quadro 3), apresentando 90% de frutos infectados, não sendo viável sua utilização prática. Essa solução foi utilizada devido ao seu efeito no controle de *Sphaerotheca fuliginea* (Astiarraga e Bettiol, 1998).

A solução de bicarbonato de sódio a 1% apresentou 95% de inibição na germinação de conídios de *P. digitatum* (Quadro 2). Em relação ao seu efeito em frutos, no 3º ensaio (Quadro 5), verifica-se um controle da doença de 66%, com 50% de frutos infectados após sete dias da incubação. No 6º ensaio (Quadro 9), a solução de bicarbonato de sódio também a 1%, controlou o bolor verde em 79%, com 35% de frutos infectados após seis dias da incubação. O controle da doença obtido com solução de bicarbonato de sódio a 3%, no 1º ensaio (Quadro 3), foi de 100% após sete dias da incubação. No 4º ensaio (Quadro 6), o controle da doença com a mesma solução foi de 89% e incidência de frutos infectados de 40% após cinco dias da incubação. No 6º ensaio (Quadro 9), o controle da doença com a solução de bicarbonato de sódio a 3% foi de 96%, com 15% de frutos infectados após seis dias da incubação. Esta variação nos resultados obtidos com a mesma solução de bicarbonato de sódio provavelmente é devido aos diferentes pontos de maturação dos frutos entre os ensaios realizados. A maturação dos frutos interfere diretamente no desenvolvimento da doença, a qual é verificada pela severidade da doença nos frutos do controle inoculado dos ensaios. Quanto mais avançado o estágio de maturação, analisada principalmente pela relação $^{\circ}\text{Brix} \cdot \text{acidez total}^{-1}$, maior a severidade da doença nos frutos e, conseqüentemente, menor período para a realização das leituras nos ensaios. O pH das soluções dos produtos associados ao bicarbonato de sódio variou entre 9 e 9,4 (Quadro 7), com melhor controle a pH 8,9 da mistura deste com o ácido bórico. O bicarbonato de sódio vem sendo relatado com eficiente controle de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlechtend.:Fr.) Pollacci (Homma et al., 1981a), *Penicillium digitatum*, *Pyricularia oryzae*, *Diaporthe citri*, *S. fuliginea* e *Leveillula taurica* (Homma et al., 1981b), *Penicillium digitatum* e *P. italicum* (Homma et al., 1981c), *S. fuliginea*, *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm, *Alternaria cucumerina* (Ellis & Everh.) J. A.

Elliott, *Ulocladium cucurbitae* (Letendre & Roumeguere) Simmons (Ziv & Zitter, 1992), *Chalara elegans* Nag Raj & Kendrick (Punja & Gaye, 1993), *Sphaerotheca pannosa* (Wallr.:Fr.) Lév. var. *rosae* Woronichin e *Diplocarpon rosae* F. A. Wolf (Horst et al., 1992), *Helminthosporium solani* Durieu & Montagne (Oliver et al., 1998), *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (Mlikota & Smilanick, 1998) e *P. digitatum* (Smilanick & Margosan, 1998). Nesse trabalho, também ficou demonstrado o seu potencial no uso em pós-colheita de citros.

Com ácido bórico e bicarbonato de sódio individualmente, foram obtidos controles promissores do bolor verde de 84 e 89%, com incidência de infecções nos frutos de 50 e 40%, respectivamente (Quadro 6).

Resultados promissores foram obtidos por Homma et al. (1981bc) quando utilizaram emulsificantes e surfactantes associados a solução de bicarbonato de sódio. No 6º ensaio (Quadro 9), não foram obtidos incrementos significativos no controle da doença com o emprego do espalhante adesivo Agral. Provavelmente esses resultados ocorrem devido à aplicação localizada da solução nos ferimentos realizados na casca dos frutos. Maiores diferenças poderão ser avaliadas, quando estas soluções forem aplicadas em toda a superfície do fruto, interagindo a ação de adesividade, recobrimento de toda a superfície do fruto e possível cristalização da solução (Homma et al., 1981a).

A utilização de soluções de bicarbonato de sódio nas concentrações de 2 e 3%, proporcionou controle do bolor verde nas condições dos ensaios de 94 a 99%, com incidência da doença entre 5 a 15%. Este nível de controle aproxima-se ao do fungicida thiabendazole a $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Portanto, soluções de bicarbonato de sódio a 2 e 3% são promissoras para o controle do bolor verde em pós-colheita de citros.

A inibição da germinação de conídios de *P. digitatum* com bicarbonato de potássio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi nulo no tecido de flavedo (Quadro 2). Quando aplicado em laranjas, foi obtido controle de 68 e 48% da doença, respectivamente nos 2º e 4º ensaios (Quadros 4 e 6). Considerando o 4º ensaio (Quadro 6), bicarbonato de potássio aumentou o controle da doença para 55 e 61%, quando em combinação com bicarbonato de sódio e carbonato de potássio respectivamente. Misturas de bicarbonato de potássio com sorbato de potássio, *C. citratus* e metabissulfito de sódio, reduziram o controle do bolor verde comparado com a sua utilização individual. Analisando o pH das soluções do 4º ensaio (Quadro 13), verifica-se que o controle do bolor verde com soluções de bicarbonato de potássio variou do pH 6,9 ao 10. O melhor controle com a solução de bicarbonato de potássio foi de 61% em pH 10. Em soluções de bicarbonato de potássio com pH inferior a esse, o controle do bolor verde foi decrescendo.

A solução de carbonato de sódio a 1% utilizada no 2º ensaio no flavedo (Quadro 2), apresentou 96% de inibição na germinação de conídios do *P. digitatum*. Quando a solução de carbonato de cálcio foi aplicada em frutos no 2º e 3º ensaios (Quadros 4 e 5, respectivamente), essa solução apresentou 92% de controle do bolor verde, com incidência de frutos infectados de 30%, após sete dias de incubação em ambos ensaios. Carbonato de sódio associado a outros produtos, obteve efeito sinérgico no controle do bolor verde nas combinações com carbonato de potássio e ácido bórico. Essa última mistura apresentou efeito pronunciado, aumentando o controle da doença de 69% para 90% (Quadro 6). Com relação ao pH das soluções do 4º ensaio nos frutos, esses variaram de 9 a 10,3, havendo controle da doença acima e abaixo de 50% em ambos os extremos (Quadro 7).

A solução de carbonato de potássio a 1% empregada no 5º ensaio do flavedo apresentou 100% de inibição na germinação de conídios do fungo. Quando a solução de carbonato de potássio foi avaliada em frutos, apresentou controle do bolor verde de 68 e 50% nos 2º e 4º ensaios, respectivamente (Quadros 4 e 6). Esta variação na resposta ao controle do bolor verde provavelmente seja devido à maturação dos frutos, resultando em avaliações do 2º e 4º ensaios em sete e cinco dias (Quadros 4 e 6). Considerando as combinações da solução de carbonato de potássio com as outras soluções no 4º ensaio em frutos, ocorreu efeito de sinergismo apenas quando essa foi associada à solução de carbonato de sódio (Quadro 6). Com o aumento do pH das soluções combinadas a do carbonato de potássio, exceto para a mistura com *C. citratus*, houve aumento no controle da doença (Quadros 6 e 7).

Metabissulfito de sódio e de potássio, respectivamente a 10000 e 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiram a germinação de conídios em 100%, analisados no 2º e 3º ensaios no flavedo, respectivamente. No ensaio realizado em frutos, metabissulfito de potássio não foi eficiente no controle do bolor verde, apresentando ausência de controle (1º ensaio, Quadro 3). Metabissulfito de sódio nas concentrações de 5000 e 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram controle do bolor verde de 10 e 81%, respectivamente (2º ensaio, Quadro 4). Quando empregado na concentração de 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no 3º e 4º ensaios (Quadros 5 e 6), o controle foi de 94 e 74%, respectivamente. Todas as misturas de metabissulfito de sódio com outros produtos, apresentaram níveis de controle inferior aquele obtido com o metabissulfito aplicado individualmente (Quadro 6). Metabissulfito de sódio e potássio são substâncias químicas geradoras de SO_2 , o qual é utilizado para o controle de fungos em pós colheita (Silva, 1998).

Sua utilização em laranja 'pêra' no controle do bolor verde foi promissora, com níveis de controle entre 70 a 90%, com uma concentração de $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A solução de sorbato de potássio a 1% inibiu em 100% a germinação de conídios de *P. digitatum* no 2º ensaio realizado no tecido do flavedo (Quadro 2). Esta solução quando avaliada no controle do bolor verde em frutos, apresentou variações no controle da doença conforme a concentração utilizada. Comparando a mesma concentração da solução de sorbato de potássio utilizada em ensaios diferentes também ocorreu variações na resposta ao controle da doença. No 1º ensaio em laranjas, a solução de sorbato de potássio a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, controlou a doença em 68%, após sete dias de incubação (Quadro 3). Quando uma solução de sorbato de potássio a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi utilizada no 2º ensaio, o controle da doença foi de 51%, após sete dias da inoculação (Quadro 4). Com essa mesma concentração da solução ($10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foi obtido controle do bolor verde de 97 e 43%, nos 3º e 4º ensaios, após sete e cinco dias da incubação, respectivamente (Quadros 5 e 6). Nas misturas de soluções de sorbato de potássio com soluções de outros produtos empregadas no 4º ensaio, e mesmo individualmente, o pH destas soluções variou entre 5,5 a 10,3. Efeito de sinergismo da combinação de sorbato de potássio com glutamato monossódico foi baixo, elevando o controle da doença em 1%, em relação à solução de sorbato de potássio (Quadro 6). Apesar do efeito de sinergismo ocorrido nesta mistura de soluções, o índice de controle foi inferior a 97%, obtido com a mesma concentração da solução de sorbato de potássio no 3º ensaio (Quadro 5).

As diferenças no controle do bolor verde provavelmente devem ser devido às diferenças na composição química dos tecidos do flavedo e do albedo dos frutos, a qual provavelmente varia com o estágio de maturação dos frutos. Verificou-se que o pH é um

fator que interfere na dissociação do sorbato de potássio, afetando a eficiência no controle de doenças. O pH da solução de sorbato de potássio empregada no 4º ensaio foi de 7,5.

A solução de ácido bórico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu em 100% a germinação de conídios de *P. digitatum*, no 5º ensaio em tecido do flavedo (Quadro 2). Ensaio em frutos de laranja 'Pêra', a mesma solução controlou o bolor verde em 72 e 84% nos 2º e 4º ensaios, respectivamente (Quadros 4 e 6). Quando esta solução foi combinada às outras no 4º ensaio em frutos, ocorreu efeito de sinergismo apenas com a de carbonato de sódio, elevando o controle da doença para 90%, com incremento de 6% no controle do bolor verde em relação à solução de ácido bórico. A variação do pH das misturas das soluções do 4º ensaio foi entre 3,5 a 9,1, com eficiente controle de 84 e 90% da doença em pH 6 e 9,1, respectivamente (Quadros 6 e 7). O efeito do espalhante adesivo Agral, associado à solução de ácido bórico, não resultou em aumento de eficiência desta solução no controle do bolor verde em todas as concentrações, exceto para a de 1% (Quadro 8). Com o aumento da concentração da solução de ácido bórico de 1% para 4%, o controle do bolor verde nos frutos apresentou diferença apenas entre a concentração de 1%, com ou sem espalhante adesivo. Entre as concentrações das soluções de 2, 3 e 4%, com ou sem espalhante adesivo, o controle da doença foi efetivo e semelhante.

O controle do bolor verde com a solução de glutamato monossódico a $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ realizado em frutos foi de 84 e 18% nos 3º e 4º ensaios, respectivamente (Quadros 5 e 6). Esta diferença está relacionada às diferenças entre os frutos do 3º e 4º ensaios, verificada pela severidade da doença no controle inoculado de cada ensaio e também pelo período de incubação dos ensaios. A severidade da doença foi de 60 e 94%, enquanto que a avaliação dos ensaios foi realizada ao sétimo e quinto dias após a incubação, nas

mesmas condições, para o 3º e 4º ensaios, respectivamente (Quadros 5 e 6). No 4º ensaio em frutos, a solução de glutamato monossódio e suas respectivas misturas, apresentou efeito de sinergismo apenas com a combinação com o sorbato de potássio. No entanto, os níveis de controle do bolor verde com esta mistura, foi inferior a 50% (Quadro 5). O pH destas soluções variaram entre 4,7 e 9,7 (Quadro 7).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* inibiu a germinação de conídios em 14, 95 e 98%, nas concentrações de 10, 1 e 1%, acrescida de Tween 80, 20 e 20, nas concentrações de 3,4, 0,015 e 0,015%, respectivamente (Quadro 2). A solução de *C. citratus* a 5% acrescida de Tween 80 a 1,7% aplicada em frutos, controlou a doença em 43% no 1º ensaio (Quadro 3). Solução de *C. citratus* a 1% acrescida de Tween 20 a 0,015%, controlou a doença em 39% no 3º ensaio (Quadro 5). A solução de *C. citratus* a 5% acrescida de Tween 80 a 1,7% em combinação com outras soluções no 4º ensaio em frutos, apresentaram controles da doença inferiores a 50% em todas as combinações, exceto para a de *C. citratus* individualmente com controle de 61% (Quadro 6). O efeito de sinergismo não ocorreu quando a solução de *C. citratus* foi associada às outras soluções, no 3º e 4º ensaios (Quadros 5 e 6). Em relação ao pH das misturas das soluções, estes apresentaram valores de 2,3 a 10, com maior eficiência no controle do bolor verde em pH 3,2 (Quadro 7).

As suspensões dos aminoácidos (lisina, glicina, fenilalanina, prolina, tirosina, triptofano, metionina e isoleucina) à 1%, não foram eficientes na inibição da germinação de conídios de *P. digitatum* em tecido de flavedo (Quadro 2). Entretanto, o controle do bolor verde em frutos de laranja variou de 42 a 77% (Quadro 5). Esses dados indicam que há necessidade de se estudar detalhadamente esses produtos, inclusive com misturas adequadas e agentes solubilizantes dos aminoácidos.

Nas concentrações estudadas as soluções de *Calendula officinarum*, *Azadirachta indica*, pó-de-guaraná, *Vanillosmopsis erytropapa* mais Tween 80, *Chenopodium ambrosioides* mais Tween 80, Lonlife, leite cru, lecitina de soja, Tween 80, *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium virens* não controlaram a germinação de conídios e o bolor verde em frutos de laranja Pêra (Quadros 2, 3, 4 e 5). Estes resultados não concordam com trabalhos realizados com outros patógenos (Astiarraga & Bettioli, 1997; Belo & Silva, 1998; Fortes et al., 1997; Lazzaretti, 1993 e Paré et al., 1993).

Emulsões de óleo de canola, de girassol, de oliva, de eucalipto, de amêndoa, de milho e de soja não inibiram a germinação de conídios de *P. digitatum* (Quadro 2), e inclusive apresentaram pequeno efeito no controle do bolor verde em frutos (Quadro 4).

Suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Gliocladium roseum* não foram eficientes em inibir a germinação de conídios de *P. digitatum* em tecido de flavedo (Quadro 2). Em frutos, esses organismos foram relativamente efetivos no controle do bolor verde, com destaque ao *G. roseum* com 98% de controle da doença (Quadros 3, 5 e 6). *G. roseum* têm sido observado parasitando inúmeros fungos e apresentando um potencial antagônico a fungos fitopatogênicos. Ele é empregado no controle do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, na cultura do moranguinho. O principal mecanismo pelo qual *G. roseum* inibe *B. cinerea* em morango é a competição por substrato, sendo também reportado ação por meio de enzimas líticas no controle biológico (Melo, 1998). Neste trabalho, o possível mecanismo de ação envolvido entre *G. roseum* e *P. digitatum*, relaciona-se à competição por substrato ou ação por enzimas líticas, devido à ausência de inibição na germinação de conídios de *P. digitatum*.

O controle do bolor verde empregando-se *S. cerevisiae* a 5% (Quadro 3) foi de 64%, devendo o mesmo ser novamente testado de forma preventiva e em outras concentrações. Assim, será estudado o seu possível potencial contra *P. digitatum*. Esta levedura mostrou resultados promissores na proteção de plantas de café suscetíveis ao fungo *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem alaranjada, bem como de plantas de milho e sorgo suscetíveis à *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose (Stangarlin & Pascholati, 1994).

De forma geral, pode-se afirmar, pelos resultados obtidos e por dados da literatura, que bicarbonato e carbonato de sódio, ácido bórico, sorbato de potássio, metabissulfito de sódio, *Gliocladium roseum* e *Cymbopogon citratus* apresentam potencial de uso para o controle do bolor verde de frutos cítricos, devendo os mesmos serem testados em condições comerciais.

7 CONCLUSÕES

- O método do flavedo é adequado para o estudo de germinação de *P. digitatum*.
- Produtos alternativos como bicarbonato de sódio a 2 e 3% (p/v), carbonato de sódio a 1% (p/v), ácido bórico a 2% (p/v), sorbato de potássio a 1% (p/v), metabissulfito de sódio a 1% (p/v), óleo de *Cymbopogon citratus* a 5% (v/v) mais Tween 80 a 1,7% (v/v) e *Gliocladium roseum* ($8,6 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹) foram promissores no controle de *P. digitatum*, em laranja 'Pêra' em pós-colheita.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRINUAL – ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Argos Comunicação, 1999. 521p.
- AGRIOS, G.N. Postharvest Diseases of Plant Products Caused by Ascomycetes and Imperfect Fungi in: *Plant Pathology* 3 ed. Academic Press, inc., 1988, p. 436-450.
- AL ZAEMEY, A.B., MAGAN, N., THOMPSON, A.K. Studies on the effect of fruit-coating polymers and organic acids on growth of *Colletotrichum musae in vitro* and on post-harvest control of anthracnose of bananas. *Mycological Research*, v. 97, p. 1463-1468, 1993.
- ARIMOTO, Y., HOMMA, Y., MISATO, T. The effect of sodium hydrogencarbonate on occurrence of citrus storage diseases *Journal of Pesticide Science*, v. 2, n. 2, p. 163-167, 1977.

- ARRAS, G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in fruits. *Postharvest Biology and Technology*, v. 8, n. 3, p. 191-198, 1996.
- ASTIARRAGA, B.D. & BETTIOL, W. Controle de *Sphaerotheca fuliginea* da abóbora com leite. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 246, 1997.
- ÁVILA, Z.R., MELLO, S.C.M., RIBEIRO, Z.M.A., MAGALHÃES, B.P. Efeito de óleos vegetais na germinação de conídios de *Alternaria cassicae*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 224, 1998.
- BARROS, S.T., OLIVEIRA, N.T., MAIA, L.C. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. *Summa Phytopathologica*, v. 21, n.2, p. 168-170, 1995.
- BASTOS, C.N., NEILL, S., HORGAN, R. Antifungal activity of a metabolite produced by *Cladobotryum amazonense*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, n. 03, p. 733-736, 1986.
- BELO, E.L.F., SILVA, G.S. Efeito da incorporação de folhas de neem ao solo sobre *Sclerocium rolfsii* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 226, 1998.
- BERNARDO, R., SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN, J.R., CRUZ, M.E.S., PASCHOLATI, S.F. Fungitoxicidade de alguns óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 227, 1998.
- BETTIOL, W. Biocontrole na Filosfera: Problemas e Perspectivas *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 5, p. 59-97, 1997.

- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos In: BETTIOL, W. (Org.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991, p. 223-236.
- BIANCHINI, L., BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Summa Phytopathologica*, v. 21, n. 1, p. 97, 1995.
- BONALDO, S., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., CRUZ, M.E.S., PASCHOLAT, S.F. Inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos e indução de fitoalexinas por *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 229, 1998.
- BONNAS, D.S., CHITARRA, M.I.F., CHITARRA, A.B., MACHADO, J. da C. & GAVILANES, M.L. Resistência pós-colheita de laranja Valencia ao *Penicillium digitatum* influenciada pela temperatura e tempo de cura de ferimento. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 169-173, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. *Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988*. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 19 dez. 1988. Seção I, p. 24716-24723.
- BROWN, G.E. Control of Florida citrus decays with guuatazine. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, v. 96, p. 335-337, 1983.
- BROWN, G.E. Investigations with experimental citrus postharvest fungicides in Florida. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. v. 2, p. 815-818, 1981.

- BROWN, G.E., ECKERT, J.W. Postharvest Fungal Diseases In: WHITESIDE, J.O., GERNSEY, S.M., TIMMER, L.W. *Compendium of citrus diseases*. St. Paul, APS Press., 1989, 80p.
- BUAZZI, M.M. & MARTH, E. H. Mechanisms in the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate. *Food Microbiology*, v. 8, p. 249-256, 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.
- CARRARO, A. F., CUNHA, M.M. *Manual de Exportação de Frutas*. Brasília: MAARA - SDR - FRUPEX/ IICA. 1994, 254 p.
- CARVALHO, C.R.L., MANTOVANI, D.M.B., CARVALHO, P.R.N. et al. *Análises Químicas de Alimentos*. Campinas: Instituto de tecnologia de Alimentos, 1990. 121p. (Manual Técnico).
- CHALUTZ, E. & WILSON, C.L. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*, v. 74, p. 134-137, 1990.
- CHALUTZ, E., DROBY, S., WILSON, C.L. Microbial protection against post harvest diseases of citrus fruit. *Phytoparasitica*, v. 16, p. 195-196, 1988.
- Compêndio de Defensivos Agrícolas: Guia Prático de Produtos Fitossanitários para uso Agrícola* 5 ed. São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda, p. 432-434, 1996.

- CONOVER, W.J. *Practical Nonparametric Statistics*, 2 ed., New York: John Wiley & Sons, 1980, p. 493.
- CORRAL, L. G., POST, L.S., MONTVILLE, T.J. Antimicrobial Activity of Sodium Bicarbonate. *Journal of Food Science*, v.53, p. 981-982, 1988.
- DAVÉ, B., SALES, M., and WALIA, M. Resistance of different strains of *Penicillium digitatum* to treatment in California citrus packinghouses. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, v. 102, p. 178-179, 1989.
- DAVÉ, B.A., KAPLAN, H.J., PETRI, J.F. The isolation of *Penicillium digitatum* Sacc. strains tolerant to 2- AB, SOPP, TBZ and benomyl. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, v. 93, p. 344-347, 1980.
- DAVIS, P.L., SMOOT, J.J. Germination de *Penicillium digitatum* spores as affected by solutions of volatile componentes of citrus fruits *Phytopathology*, v. 62, p. 488-489, 1972.
- DEPASQUALE, D.A., EL-NABARAWY, A., ROSEN, J.D., and MONTVILLE, T.J. Ammonium Bicarbonate Inhibition of Mycotoxigenic Fungi and Yeasts, *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 324-328, 1990.
- DROBY, S., WISNIEWSKI, M.E., COHEN, L., WEISS, B., TOUITOU, D., EILAM, Y., CHALUTZ, E. Influence of CaCl_2 on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* *Phytopathology*, v. 87, n. 3, p. 310-315, 1997.
- ECKERT, J. W. *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensitivity to imazalil. *Phytopathology*, v. 77, p. 1728, 1987. (Abstr.).

- ECKERT, J. W., OGAWA, J.M. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits *Annual Review of Phytopathology*, v. 23, p.421-454, 1985.
- ECKERT, J. W., SOMMER, N.F. Control of diseases of fruits and vegetables by postharvest treatment. *Annual Review of Phytopathology*, v. 5, p. 391-432, 1967.
- ECKERT, J.W., BRETSCHEIDER, B.F., RATNAYAKE, M. Investigations on new postharvest fungicides for citrus fruit in California. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. v. 2, p. 804-810, 1981.
- ECKERT, J.W., RATNAYAKE, M. Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia *Phytopathology*, v. 84, n.7, p.46-75, 1994.
- ECKERT, J.W., RATNAYAKE, M., WOLFNER, A.L. Effect of volatile compounds from citrus fruits and other plant materials upon fungus spore germination. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, v. 3, p. 1049-1052, 1992.
- FAGAN, C., TAGAMI, O.K., PASCHOLATI Efeito do extrato bruto de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) no crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, v. 24, n. 1, p. 74, 1998.
- FAO, *Production Yearbook*, v. 51, p. 55, 1997.
- FEICHTENBERGER, E., MULLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.)
In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIM FILHO, A., CAMARGO, L.E.A.,

- RESENDE, J.A.M. *Manual de Fitopatologia Doenças de Plantas Cultivadas*, 3. ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v. 2, p. 261-296.
- FERRACINI, V.L., MELO, I.S., FRIGHETO, R.T.S. Influencia de extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. no crescimento micelial e germinação de escleródios de *Sclerotium rolfsii*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 15, n. 2, p. 76, 1990.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. *O Biológico*, v. 33, p.9-13, 1967.
- FIORI, A.C.G., VIDA, J.B., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. & CRUZ, M.É.S. Efeito do extrato bruto e do óleo essencial de plantas medicinais no crescimento micelial de *Didymela bryoniae*. *Summa Phytopathologica*, v. 24, n. 1, p. 74, 1998.
- FORTES, N.L.P., DIB, A.P., XAVIER, A.C.O.C., SOUZA, A.D. Efeito do Ionlife sobre o crescimento micelial de *colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium graminearum*, *fusarium solani*, *Alternaria solani* e *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 264, 1997.
- FRANCISCO, D.P. & MAY DE MIO, L.L. Efeito do bicarbonato de sódio no controle de oídio (*Sphaerotheca pannosa*) na cultura da rosa *Fitopatologia Brasileira*, v. 22 (Suplemento) p. 264, 1997.
- FRENCH, R.C., LONG, R.K., LATTERELL, F.M., GRAHAM, C.L., SMOOT, J.J. SHAW, P.E. Effect of nonanal, citral, and citrus oils on germination of conidia of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Phytopathology*, v. 68, n. 6, p. 877-882, 1978.

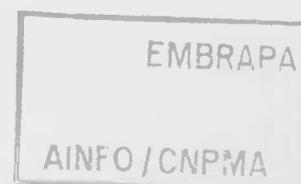
- GUTTER, Y., SHACHNAI, A., SCHIFFMANN-NADEL, M., DINOOR, A. Biological aspects of citrus molds tolerant to benzimidazole fungicides *Phytopathology*, v. 71, n. 5, p. 482-487, 1981.
- HARDING, P.R., Jr. Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, v. 56, p. 256-260, 1972.
- HOMES, G.J. and ECKERT, J.W. Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, v. 79, n. 10, p. 1068-1073, 1995.
- HOMMA, Y., ARIMOTO, Y., MISATO, T. Effect of Sodium Bicarbonate on Each Growth Stage of Cucumber Powdery Mildew Fungus (*Sphaerotheca fuliginea*) in Its Life Cycle *Journal of Pesticide Science*, v. 6, p. 201-209, 1981a.
- HOMMA, Y., ARIMOTO, Y., MISATO, T. Effects of Emulsifiers and Surfactants on the Protective Values of Sodium Bicarbonate *Journal of Pesticide Science*, v. 6, p. 145-153, 1981b.
- HOMMA, Y., ARIMOTO, Y., MISATO, T. The Control of Citrus Storage Disease by Sodium Bicarbonate Formulation *Proceedings of the International Society of Citriculture*, v.2, p. 823 -825, 1981c.
- HORST, R.K., KAMAMOTO, S.O., and PORTER, L.L. Effect of sodium bicarbonate and oils on the control of powdery mildew and black spot of roses. *Plant Disease*, v. 76, p. 247-251, 1992.

- HOUCK, L.G. Hot water treatments for control of *Penicillium digitatum* green mold of Eureka lemons. *Phytopathology*, v. 57, p. 99, 1967. (Abstr.).
- HUANG, H., DEVERALL, B.J., MORRIS, S.C. Postharvest control of green mould on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. *Postharvest Biology and Tecnology*, v. 5, n. 1-2, p. 129-137, 1995.
- HUANG, Y., WILD, B. L. and MORRIS, S. C. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Annals Applied Biology*, v.120, p. 367-372, 1992.
- JANISIEWICZ, W.J. & JEFFERS, S.N. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, v. 16, n. 7, p. 629-633, 1997.
- JUNQUEIRA, N.T.V. & GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W. ed. *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, p. 307- 331, 1991.
- KAPLAN, H. J., DAVÉ, B. A., and PETRI, J.F. Tolerance of citrus pathogens to current packinghouse treatment. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, v. 2, p. 788-791, 1981.
- KAVANAGH, J.A. and WOOD, R.K.S. Green mould of oranges caused by *Penicillium digitatum* Sacc,; effect of additives on spore germination and infection *Annals Applied Biology*, v. 67, p. 35-44, 1971.

- KIMATI, H., GALLI, F. Doença dos Citros in GALLI, F., et al. *Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas*, 2. ed., São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p.213- 235, 1980.
- KRETZSCHMAR, A. A. Controle biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita. In: BETTIOL, W. *Controle biológico de doenças de plantas*, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 53-69, 1991.
- KUMAROTO, R. Resistance to benomyl and thiophanate methyl in strains of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in Japan. *Plant Diseases Reporter*, v. 69, n. 2, p. 168-172, 1976.
- LANDECKER, E.M. Kingdom Fungi: Form-Division Deuteromycota *Fundamentals of the fungi*. Fourth edition, p. 213-225, 1996.
- LAZZARETTI, E. *Controle de fungos transportados por sementes de trigo com Bacillus subtilis*. Piracicaba, 1993, 102p. Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP.
- LEITE, B., NICHOLSON, R.L. Mycosporine-Alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola* *Experimental Mycology*, 16: 76-86, 1992.
- LUZ, W.C. Biocontrole de ferrugem da folha do trigo. *Fitopatologia brasileira*, v. 13, p. 111, 1988.

- MARLOTH, R.H. The influence of hydrogen-ion concentration and of sodium bicarbonate and related substances on *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Phytopathology*, v. 21, p. 169-198, 1931.
- MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. *Controle Biológico*, v. 1, Jaguariúna, SP. EMBRAPA-CNPMA, p. 17-59, 1998.
- MISATO, T., KAWAMOTO, S.O., NATSUME, T., YOSHIOKA, A., KISHI, K. Utilization of food additives as agricultural fungicides. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v. 41, p. 73-76, 1975.
- MLIKOTA, F., SMILANICK Control of *Botrytis cinerea* and postharvest gray mold on grapes with carbonate and bicarbonate salts. *Phytopathology*, v. 88, n. 9, S64, 1998.
- MONTVILLE, T.J. and SHIH, P.L. Inhibition of Mycotoxigenic fungi in corn by ammonium and sodium bicarbonate. *Journal of Food Protection*, v. 54, p. 295-297, 1991.
- MONTVILLE, T.J., and GOLDSTEIN, P.K. Sodium bicarbonate of aflatoxigenesis in corn *Journal of Food Protection*, v. 52, p. 45-48, 1989.
- OLIVER, C., HALSETH, E.D., MIZUBUTI, E.S.G., LORIA, R. Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers *Plant Disease*, v. 82, n. 2, p. 213-217, 1998.
- PAPAVIZAS, G.C. & HUNDSEN, R.D. Biological control of soilborne fungae propagules. *Annual Review of Phytopathology*, v. 18, p. 389-412, 1980.

- PARÉ, P.W., ZAJICEK, J., FERRACINI, V.L., MELO, I.S. Antifungal Terpenoids from *Chenopodium ambrosioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 21, n.6/7, p. 649-653, 1993.
- PELSER, P. du T., ECKERT, J.W. Constituent of orange juice that stimulate the germination of conidia of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology*, v. 67, n. 6, p. 747-754, 1977.
- PINHEIRO, P.L., PESSOA, M.N.G. Efeito do óleo essencial de plantas medicinais no controle de *Sclerotium rolfsii* 'in vitro'. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 294, 1998.
- POZZAN, M.A. Comportamento e Tratamentos de Frutos Cítricos em Pós-Colheita *Laranja*, v.18, n. 1, 189-204, 1997.
- PUNJA, Z.K., and GAYE, M.M. Influence of postharvest handling practices and dip treatments on development of black root rot on fresh marketed carrots. *Plant Disease*, v.77, p. 989-995, 1993.
- RAMIREZ-OTAROLA, J.R., KUPPER MORETTO, K.C., CHURATA-MASCA, M.G.C. Efeito do bicarbonato de sódio no controle de *Leandria momordicae* em pepino. *Summa Phytopathologica*, v. 21, n. 1, 117, 1995a.
- RAMIREZ-OTAROLA, J.R., KUPPER MORETTO, K.C., CHURATA-MASCA, M.G.C. Efeito do bicarbonato de sódio e do óleo vegetal no controle de *Alternaria solani* em tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v. 21, n. 1, 117, 1995b.



- ROBERTS, R.G. Integrating Biological Control into Postharvest Disease Management Strategies. *HotScience*, v. 29, n. 7, p. 758-762, 1994.
- RUSUL, G., and MARTH, E.H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of potassium benzoate or potassium sorbate and at different initial pH values. *Journal of Food Protection*, v. 50, p. 820-825, 1987.
- RUSUL, G., EL-GAZZAR, F.E., and MARTH, E.H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of acetic or propionic acid and at different initial pH values. *Journal of Food Protection*, v. 50, p. 909-914, 1987.
- SANHUEZA, R.M.V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos In: *Anais do VI SICONBIOL*, Rio de Janeiro, p. 340-343, 1998.
- SEIN, B.E., FOGUET J.L. Evaluación de fungicidas post-cosecha para el control de pudriciones causadas por *Penicillium digitatum* en limones. *Ver. Ind. Y Agrícola de Tucumán*, v. 57, n. 2, p. 23-28, 1980.
- SHELLIE, K.C., and SKARIA, M. Reduction of green mold on grapefruit after hot forced-air quarantine treatment. *Plant Disease*, v. 82, p. 380-382, 1998.
- SHOLBERG, P.L. Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay *Plant Disease*, 82: 689-693, 1998.
- SHOLBERG, P.L., GAUNCE, A.P. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent postharvest decay. *Hort Science*, v. 30, n. 6, p. 1271-1275, 1995.

- SILVA, E. A.B.R. Controle pós-colheita de *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* em uva 'itália' pelo uso de sachês de metabissulfito de sódio. Botucatu, 1998, 88p., Tese de Doutorado. FCA/UNESP.
- SINGH, V. & DEVERALL, B.J. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 83, n. 3, p. 487-490, 1984.
- SMILANICK, J.L., and DENIS-ARRUE, R. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease*, v. 76, p. 481-485, 1992.
- SMILANICK, J.L., MARGOSAN, D.A., and HENSON, D.J. Evolution of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. *Plant Disease*, v. 79, p. 742-747, 1995.
- SMILANIK, J.L., MARGOSAN, D.A. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts *Phytopathology*, v. 88, n. 9, S83, 1998.
- SMILANIK, J.L., MICHAEL, I.F., MANSOUR, M.F., MACKEY, B.E., MARGOSAN, D.A., FLORES, D., WEIST, C.F. Improved control of green mold of citrus with imazalil in warm water compared with its use in wax *Plant Disease*, v. 81, n. 11, p. 1299-1304, 1997.
- SOFOS, J.N. and BUSTA, F.F. Antimicrobial activity of sorbate *Journal of Food Protection*, v. 44, n. 8, p. 614-622, 1981.

- SOFGS, J.N., PIERSON, M.D., BLOCHER, J.C., and BUSTA, F.F. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*, v. 3, p. 1-17, 1986.
- SPALDING, D.H., and REEDER, W.F. Effect of hot water and gamma radiatio on postharvest decay of graypefruit. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, v. 98, p. 207-208, 1985.
- STANGARLIN, J.R., PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phytopathologica*, v. 20, p. 16-21, 1994.
- STEVENS, C.; WILSON, C.L.; LU, J.Y.; KHAN, V.A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; KABWE, M.K.; HAUNG,Z.; ADEYEYE, O.; PUSEY, L.P.; WISNIEWSKI, M.E.; WEST, M. Plant hormesis induced by ultraviolet lighth-C for contorling postharvest diseases of tree fruits. *Crop Protection*, v. 15, n. 2, p. 129-134, 1996.
- SUDO, S. Biocontrole de *Catacauma torrindiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa preta no coqueiro. In: *REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS*, 3, 1989. Piracicaba. Anais Piracicaba, USP/EMBRAPA, p. 57-59, 1989.
- TUSET, J.J., PIQUER, J., GARCIA, J., MARTINEZ, J.M., ROCO, M. Activity of imidazole fungicides to control postharvest citrus decay. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. v. 2, p. 784-787, 1981.

- VALARINI, P.J., FRIGHETTO, R.T.S., MELO, I.S. The effect of medicinal herb *Cymbopogon citratus* on control of phytopathogenic fungi in bean crop. *Revista de Agricultura*, v. 69, n. 2, p. 139-150, 1994.
- WARDOWSKI, W.F., TING, S.V., SMOOT, J.J., DAVIS, P.L., CRAIG, J.O. Difhenyl residues in Florida grapefruit and oranges following actual and simulated long export shipments. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 104, p. 440-443, 1979.
- WILD, B. L. Double resistance by citrus green mold *Penicillium digitatum* to the fungicides guazatine and benomyl. *Annals Applied Biology*, v. 103, p. 237-241, 1983.
- WILLIEMS, M.R., BROWN, M.A., VESK, M., BRADY, C. Effect of postharvest heat treatments on fruit quality, surface structure, and fungal disease in Valencia oranges. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 34, n. 8, p. 1183-1190, 1994.
- WILSON, C. L., WISNIEWSKI, M.E., BILES, C.L., MCLAUGHLIN, CHALUTZ, E., and DROBY, S. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. Bet Dagan, Israel. *Crop Protection*, v. 10, p. 172-177 1991.
- WILSON, C.L. & CHALUTZ, E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae*, v. 40, n. 2, p. 105-112, 1989.

WILSON, C.L. & WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology *Annual Review Phytopathology*, v. 27, p. 425-441, 1989.

WILSON, C.L., PUSEY, P.L. Potential for Biological Control of Postharvest Plant Diseases *Plant Disease*, v. 69, n. 5, 375- 378, 1985.

ZIV, O., ZITTER, T.A. Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases *Plant Disease*, v. 76, p. 513-517, 1992.

APÊNDICE 1.- Os resultados das análises físico-químicas e químicas dos sucos dos frutos do quarto ensaio são apresentados no Apêndice 1.1. Um balanço organoléptico equilibrado situa-se entre 12 a 18 na relação sólidos solúveis.acidez total⁻¹ ('ratio') (Carvalho et al., 1990). Portanto, o suco com uma relação sólidos solúveis.acidez total⁻¹ de 15,4 está com um balanço organoléptico dentro dos padrões.

Apêndice 1.1 – Características físico-químicas e químicas dos frutos do quarto ensaio.

Características físico-químicas e químicas do suco dos frutos^x

°Brix	pH	Massa (g)	mL NaOH 0,1N	Acidez total	°Brix/acidez total
8,3	4,12	10,2	8,6	0,54	15,4

^x Média do suco individual de 10 frutos amostrados ao acaso.

A altura média dos frutos foi de 7,00 cm, enquanto que a medida média de sua altura, acompanhando a curvatura do fruto, foi de 10,00 cm. A cor média dos frutos foi de: L 62,77; a+ 7,25; b+ 53,36; os valores máximos de leitura foram: L 86,02; a+ 26,06; b+ 62,79; e os valores mínimos de leitura foram: L 54,11; a- 7,00; b+ 62,79.

APÊNDICE 2.- Os resultados das análises físico-químicas e químicas dos sucos dos frutos do quinto ensaio são apresentados no Apêndice 2.1. Estes, demonstram que os sucos estão com um balanço organoléptico dentro dos padrões (Carvalho, et al., 1990).

Apêndice 2.1 – Características físico-químicas e químicas dos frutos do quinto ensaio.

Características físico-químicas e químicas do suco dos frutos^x

°Brix	pH	Massa (g)	mL NaOH 0,1N	Acidez total	°Brix/acidez total
10,92	3,77	10,37	12,60	0,78	14,78

^x Média do suco individual de 20 frutos amostrados ao acaso.

A altura média dos frutos foi de 7,14 cm, enquanto que a largura média foi de 6,59 cm medidos com auxílio de um paquímetro. A cor média dos frutos foi de: L 64,97; a+ 10,78; b+ 63,53; os valores máximos de leitura foram: L 69,32; a+ 27,25; b+ 72,04; e os valores mínimos de leitura foram: L 59,87; a- 10,52; b+ 50,50.

EMBRAPA Tese - 428	
FICHA DO LIVRO	
AUTOR FRANCO, Daniel Andrade de Siqueira	
TITULO: Controle do Bolor Verde (Penicillium digitatum)...	
DEVOLVER EM	NOME DO LEITOR
24/9/99	Daniel A S Franco
08/12/99	Alex



