CONTROLE BIOLÓGICO CLÁSSICO DE PATÓGENOS DE FRUTOS NO BRASIL - SITUAÇÃO ATUAL

S.C.C. de H. Tavares, EMBRAPA-CPATSA, C.Postal 33, CEP 56300-000, Petrolina, PE, E-mail: selmaht@cpatsa.embrapa.br

O controle de fitopatógenos em frutos é possivel mediante algumas medidas que podem ser somadas ao controle biológico como uma alternativa, a fim de minimizar o impacto no ambiente e na saúde humana, bem como na redução de custos, quando comparado, por exemplo, ao controle químico. Apesar da existência de trabalhos com controle biológico de doenças de plantas no Brasil desde a década de 40, os estudos em biocontrole de patógenos de frutos têm ênfase nos últimos 10 anos. Contudo, ainda se realiza uma grande percentagem a nível de laboratório (Bettiol, 1996).

Com o objetivo de conhecer melhor a situação de controle biológico dos patógenos de frutos de expressão nas culturas de importância sócio-econômica no Brasil, levantou-se para esta mesa redonda alguns dos trabalhos já desenvolvidos nesta linha de pesquisa.

No controle biológico, além da participação do patógeno, do antagonista e da planta, tem-se a participação do meio ambiente e suas inúmeras variáveis que são fundamentais e muitas vezes decisivas para o sucesso desse controle. Os exudados produzidos pelos frutos, por exemplo, propiciam o desenvolvimento de grupos de organismos que competem pelo aproveitamento desses nutrientes. Dependendo do estádio de desenvolvimento dos frutos, das condições do manejo e do impacto ambiental na cultura, esses exudados podem variar em composição interferindo quantitativa e qualitativamente na população epífita (Sanhueza e Melo, 1995). Esta situação reforça a política de identificação e seleção de antagônicos em oondições naturais iguais as do patógeno, a fim de aumentar as possibilidades de sucesso no biocontrole conforme Preece e Dickinson, 1971 e Dickinson., 1971 e Dickinson e Preece 1976, citados por Bettiol, 1986. Contudo, em alguns trabalhos, observam-se resultados positivos com antagônicos

que não faziam parte da flora epífita do produto alvo, sendo muitas vezes testados em produtos e locais diferentes dos de origem.

Para alguns antagonistas com potencial para o biocontrole e que são prejudicados em situações a ele adversas, como, por exemplo, no campo, os raios ultravioletas ou no armazenamento em baixas temperaturas cabeira, portanto, a manipulação genética visando-se a resistência as condições diversas e o aumento do antagonismo (Robbs, 1986).

Vários resultados têm sido obtidos no Brasil, nas pesquisas em condições de campo ou no tratamento pós-colheita, alguns deles com êxitos parciais ou totais no biocontrole de patógenos de frutas, pelo processo clássico, isto é, com a introdução , massal de antagônicos específicos. Seguem-se alguns exemplos registrados na literatura especializada nas seguintes culturas por pesquisadores de diversas instituições:

1-Maçã - Um dos primeiros trabalhos no Brasil em controle biológico de patógenos de frutos foi realizado em maçã através de estudos desenvolvidos pela EMBRAPA-CNPFT, em Vacaria, RS, visando principalmente o controle do patógeno Penicillium expansum, responsável pela maior porcentagem de perdas de frutos em câmara fria. Nos testes realizados "in vitro", foi observada inibição da germinação de esporos do fungo P.expansum quando imerso em suspensão de Bacillus subtilis. Em testes realizados em frutos, em préinoculação e a temperatura ambiente, observou-se que B. subtilis (9x10¹⁰ cel/ml), e B thuringiensis (2%c.), ocasionaram a redução da incidência de podridão por P. expansum (10² esp/ml) em até 80%. Ouando realizado o teste em câmara fria, o melhor controle foi obtido por B subtilis em pré-inoculação, reduzindo a incidência do patógeno em até 70%. O mesmo antagonista, quando misturado em suspensão com patógeno, controlou a doença em 56% (Kretzchmar, 1989); (Kretzchmar e Sanhueza 1991); (Sanhueza e Borsói 1991). Por fim, nas temperaturas ambiente (20°C) e a frio (0-1°C), fez-se a comparação dos resultados do controle biológico em maçã com os do tratamento químico. Foi utilizado um isolado de B. subtilis e três isolados epífitas

de maçã madura anteriormente selecionados, com o Tiabendazolio (0,45%) e com hipoclorito de sódio (1%), em pré tratamento e 24 h antes a inoculação de *P. expansum*. Todos os antagônicos controlaram significativamente a podridão quando comparados à testemunha (sem tratamento) e com os tratamentos de proteção química (Sanhueza et al 1992). Um outro microorganismo selecionado, antagonista a *P. expansum*, foi uma bactéria (8 sp) que foi avaliada quanto à sobrevivência em frutos de maçã à temperatura de 0-1°C. Verificou-se a presença da bactéria por 40 dias, porém em declínio crescente da população. Como marcador da bactéria, foi utilizado seu mutante resistente a antibiótico (Cattanio e Sanhueza, 1994). Estes estudos mostram o potencial dos antagônicos testados para controle de P.expansum, em condições de baixas temperaturas, em ambientes naturais de ocorrência do patógeno.

Alternaria sp e Fusarium spp., patógenos de difícil controle, causam podridão carpelar da macieira. Estes patógenos podem-se instalar durante ou após a floração, permanecendo em estado latente na região carpelar, desenvolvendo-se na maturação dos frutos, antes ou na pós-colheita.

2- Pêssego - O fungo *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão-parda do pessegueiro, responsável por elevados prejuízos no Brasill e nos demais países produtores, motivou estudos de controle biológico, com destaque para o emprego de uma estirpe de *B. subtilis*, denominada B-3. Vem-se obtendo, com a aplicação de tal cepa, excelentes resultados no controle de *M. fructicola*, em flores de pessegueiro e no tratamento de frutos em pós-colheita. Anualmente tem-se o propósito de gerar tecnologia para produção massal de B-3 em usina piloto, para sua utilização no Rio Grande do Sul, tendo em vista as avaliações de uso desta no controle integrado. Reações positivas de compatibilidade também foram obtidas com o fungicida Dicloram para o controle de mais um patógeno de frutos, *Rhizopus* sp. Da mesma forma também foram obtidos bons resultados de conservação a frio com o adjuvante cera para brilho de frutos (Fortes 1986, também citado por Robbs 1986 e Roobs 1992).

Outro êxito vem sendo observado com metabólicos de *B. subtilis*, estudados no controle da podridão parda, pela UFPR, em Curitiba. Tratamento com pulverização e imersão de frutos, com e sem inoculação de *M. fructicola*, foram comparados com os tratamentos químicos, Thiabendazol (67,5 ml/100 1 de água). Observou-se, 72 horas após, controle nas concetrações de 1.500 e 3.000 ppm de extratos de metabólicos de *B. subtilis*, sendo semelhante ao químico (Tratch et al 1993).

- **3- Mamão** Visando o biocontrole de antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutas de mamões, estudos foram conduzidos, na UFRPE, Recife, PE, onde foram utilizadas quatro cepas de B. subtilis (AP-42, AP-105, AP-332, AP-471) e três espécies de *Trichoderma* sp. (*T. viride* TR2, *T. Koningii*-T15 e *T. harzianum*-T25). "In vitro", a inibição de 62,2% do crescimento micelial do patógeno foi para T15 e TR2 e de 44,2%, para AP-42. "In vitro", os mamões foram inoculados com disco de BDA com o patógeno, e tratados com os antagônicos por pulverização e imersão, com aplicação simultânea ao patógeno seguidos de TR2 e AP-47, apenas em imersão. Nos tratamentos preventivos, TR-2 em pulverização proporcionou redução da severidade da doença em 85,88%, enquanto que em imersão, os eleitos positivos foram para TR2 (65,40%) e TR25 (64,38%), sem que fosse observada reação significativa dos isolados de B. subtilis utilizados (ROSA et al, 1994).
- **4- Manga -** toda região semi-árida brasileira, principalmente no Vale do São Francisco, vem sendo acometida por podridões secas e morte descendente da mangueira, causada pelo fungo *Botryodiplodia theobromae*, que infecta todas as partes da planta, em qualquer idade, levando-a à morte. Em frutos, pode ocasionar queda na pré-colheita e manchas que deterioram a polpa na pós-colheita. Leveduras antagônicas têm sido pesquisadas a partir da flora epífita de frutos pela UFRPE, Recife, PE e pela EMBRAPA-CPATSDA, Petrolina, PE. Dos isolados obtidos, apenas cinco (LR4, LMR-4, LMR3, LMR-5, LR-3) reduziram a incidência da doença em 50 a 62,5% nos pontos de

inoculação do patógeno. Estudando-se diferentes concentrações do patógeno 03, 04, 10⁵ conídios/ml, induziram redução da doença, destacando-se a Levedura LMR-5, com 81% de redução para a menor concentração, as quais também foram comparadas e diferenciadas do tratamento químico Benomyl. "In vitro", estudou-se a influência das cinco Leveduras e Benomyl sobre a germinação do patógeno, evidenciando inibição, variando de 90 a 96,2% para as Leveduras, enquanto que Benomyl proporcionou 78,5% (Silva et al, 1995).

- 5- Videira A podridão cinzenta causada por *Botrytis cinerea* afeta todos os órgãos da parreira de forma significativa em regiões com alta umidade relativa, deteriorando os frutos na pré e/ou pós colheita, principalmente em variedades de uvas viníferas brancas. Além das perdas na colheita, os vinhos resultantes da vinificação de uvas botritizadas são de menor qualidade. A alternativa para um controle biológico testando-se o isolado de *Trichoderma* T1, foi realizada no Rio Grande do Sul (EMBRAPA/UCS). Entre os tratamentos: *Trichoderma* T1, químico Ronilam, *Trichoderma* + químico e testemunha sem tratamento, observou-se que T1 sozinho induziu proteção inferior ao químico, porém quando no controle integrado, obteve-se maior eficiência, até quando utilizava-se o químico em sub dosagem (Silva-Ribeiro et al. 1994).
- 6- Acerola A antracnose causada peo fungo *C. gloeosporioides* tem sido causa de perdas na colheita, depreciação e deterioração de frutos de acerola na pós-colheita, principalmente em regiões de alta umidade relativa ou em baixas umidades quando sob irrigação. Visando o biocontrole do patógeno, a UFRPE, Recife, PE, desenvolveu trabalhos "In vitro", testando-se quatro isolados de *B. subtilis* (AP-42, AP-105, AP-332, AP-471) e quatro espécies de *Trichoderma* (*T. viride* TR2, *T. polysporum* T11, *T. kaningii* T15, *T. harzianum* T25). Os isolados de B. subtilis ofereceram contole acima de 50% destacando-se AP-471 com 86%, sem diferença estatística entre tratamentos com imersão e pulverização, com melhor atuação dos antagonistas quando aplicado antes da inoculação do patógeno. Quanto às espécies de

Trichoderma, testadas, todas recobriram a epiderme dos frutos, promovendo a deterioração destes no período de três dias (Rosa e Oliveira 1995).

- **7- Morango** O efeito de *B. subtilis* no controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) no morango, tem sido estudado na EMBRAPA-CNPMA e CNPUV. foi identificado que um isolado de *B. subtilis* (AP-85) e mistura de isolados aplicados em frutos, 24 horas antes da inoculação do patógeno, apresentaram controle da doença similar ao controle químico com Iprodione (75/1001) (Bettiol 1990).
- **8- Inhame** Para o biocontrole da podridão verde do inhame causada por *Penicillium sclerotigenum*, foi avaliado na UFRPE, em Recife, PE a reação de cinco isolados de *Trichoderma* spp. comparados a tratamento químico com o fungicida sistêmico Benomyl. Pedaços de tubérculos foram imersos por 30 minutos em suspensões do antagônico e inoculados com o patógeno uma hora após. Observou-se que *T. viride* promoveu inibição da esporulação e apresentou menor área de infecção, porém não diferindo da testemunha absoluta, enquanto que Benomyl controlou totalmente infecção (Correia et al. 1992).
- 9- Tomate O potencial de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e Leveduras para biocontrole de Erwinia carotovora subsp. carotovora em frutos de tomate, foi verificado pela UFRPE, Recife, PE, visandose o controle da podridão mole do tomate. A aplicação dos antagonistas foi realizada antes, durante e após a inoculação do patógeno, sendo feitas avaliações através da medição do diâmetro das lesões, com 24, 48 e 72 horas após. Observou-se que o melhor período para o tratamento foi com 24 horas antes do patógeno, e que não houve diferença significativa quanto à eficiência das Leveduras e das *Pseudomonas* nos períodos incubados, apresentando redução da infecção de 99,4 a 100%. Quando os antagônicos foram aplicados 12 horas após o patógeno, não houve redução da severidade da doença para as leveduras, enquanto que as *Pseudomonas* atingiram uma redução de até 65,2% (Oliveira et al. 1994)

Tem sido conduzido pela ESALQ/USP, Campinas, SP e EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, SP, um trabalho visando selecionar antagonistas para o biocontrole de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (PST), um importante patógeno de folhas e frutos na cultura do tomate e que tem nas sementes. Um eficiente veículo disseminação sobre novas técnicas de seleção foram procedidas pulverizações de *Bacillus* spp. "In vitro" como também em sementes, no que foi obtido resultado positivo para o primeiro método. Nos tratamentos em sementes, foi constatada a redução do patógeno em até oito vezes a população original, números estes semelhantes ao tratamento com tetraciclina, normalmente usada como controle (Soares et al. 1994).

10- Pimentão - Visando-se o controle de Erwinia corotovora subsp. cotorovora, causadora de podridão mole do pimentão, desenvolveu-se na UFRPE, em Recife, PE, seleção de antagônicos da flora epífita de frutos de pimentão sadios. Foram então obtidos onze isolados de leveduras e dez de Pseudomonas spp. fluorescentes e aplicados em frutos feridos, duas horas antes, simultaneamente e duas, quatro, seis e doze horas após a inoculação do patógeno. Os maiores níveis de controle foram para os isolados Rhodotorula sp e Pseudomonas marginalis. No tratamento com doze horas a redução máxima de infecção foi de 77,4%, para o isolado LD-4, seguido do isolado LD-19 com 76,9% ambos Rhodotorula sp. O isolado P-5 de Pseudomonas sp. proporcionou o máximo nível de controle (100%) para tratamentos simultâneos e duas horas antes ao patógeno. Realizou-se estudos de suplementação de frutos de pimentão com cálcio (CaCl 2 0,5%), tendo sido observado uma redução da doença em até 39,7%. Estudou-se então a interação dos antagônicos selecionados mais cálcio (CaCl 2-0,5%). Observando-se um efeito negativo, diminuindo a ação dos antagônicos (LD-19 e P-5) com valores de RSD iguais a 72,5 e 73,3%.

Por fim estudos "In vitro" foram realizados objetivando verificar o mecanismo de ação envolvido, utilizando-se a técnica de discos de papel de filtro, quando, verificou-se que nenhum dos antagonistas inibiu o patógeno nos meios de cultura NYDA e KMB. Os resultados indicam que nos mecanismos envolvidos não incluem a competição pelo

ferro presente no meio utilizado e sugere exclusão da antibiose "In vitro" para ambos antagonistas, característica esta altamente desejáveis no controle de patógenos pós-colheita de frutos. Apesar desta evidência, outros estudos são recomendados para verificar a produção de antibióticos "In vivo", no local do ferimento (Melo et al 1995).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de serem poucas as publicações na área de controle biológico de patógenos de frutos no Brasil, a maioria das pesquisas vem obtendo bons resultados. Entre os trabalhos, observa-se o cuidado de muitos em fazer valer o controle biológico, procurando caminhos que aumentem o sucesso, para tal, pesquisando no meio real de ocorrência dos problemas, procurando considerar todos os aspectos do ambiente e manejo do produto alvo, antes e após o referido tratamento.

Dentro desse contexto é possível atingir em menor espaço de tempo o controle biológico aplicado em larga escala, também no Brasil. Haja vista que em outros países como Estados Unidos (Wilson st al. 1985) está já é uma realidade.

lém do exposto, alerta ainda se faz necessário, uma vez que o controle biológico de patógenos de frutos tem muitas dificuldades a serem vencidas. Geralmente acontece a necessidade de utilizar suspensões antagônicas em alta concentração, o que irá possivelmente tornar o custo de produção muito alto, devido principalmente ao substrato utilizado. Portanto, é preciso desenvolve formulações de produtos biológicos para produção em larga escala que possam competir com fungicidas e/ou serem usados em controle integrado.

ma outra limitação, é o estreito espectro de ação dos antagonistas com relação aos patógenos e variáveis do ambiente. É necessário procurar antagonistas ou mistura deles que possam abranger os diferentes patógenos do produto alvo e que apresentem atividades constantes em diversas condições ambientais.

uanto a não correlação de alguns estudos "In vivo" e "In vitro" pode ser explicada pelo tipo de ação antagônica envolvida, podendo ser por competição de outros nutrientes não presentes no meio de

cultura, ou podendo ser por espaço e indução de resistência. Existe, portanto, possibilidade de eliminação de microorganismos com percentuais para controle quando são realizados testes "in vitro" antes dos "in vivi".

Um outro fator a analisar, é a avaliação do impacto de utilização do biocontrolador em larga escala, como por exemplo quando no antagonismo, por antibiose na liberação de metabólitos a fim de conhecer a insenção de danos desses químicos na cadeia alimentar.

Por fim, ressaltamos a importância da adoção do controle biológico como mais uma alternativa, sem porém pensar em apenas substituir outros métodos e sem eliminar as demais medidas de manejo e cuidados que visam diminuir a incidência ou severidade de doenças.

REFERÊNCIAS

- Berton, O. Controle biológico da podridão carpelar da macieira "In vitro". Fitopatologia Brasileira, v.15 (2) p.148 nº 170. Julho 1990.
- Bettiol, W. Controle biológico de doenças de plantas Fundação Cargill, Piracicaba, SP. p 13-15. 1986.
- Bettiol, W.; Chini, R.: Mosca, J.L. & Vitti, A.J. Efeito de *Bacillus subtilis* no controle do mofo cinzento (Botrytis cinerea) do morango. Summa Phytopatologica. v.16(1) p.39. Janeiro/março. Resumo nº 65. 1990.
- Castro, J.V. de. Perdas e qualidades pós-colheita de frutas. Anais 35º Congresso Brasileiro de Olericultura. Mesa Redonda nº 5. p.136-138, Foz do Iguaçu, PR. 1995.
- Cattanio, M.E. & Valdebenito-Sanhueza, R.M. Obtenção e sobrevivência em maçãs de mutantes resistentes a antibióticos de uma bactéria antagônica a *Penicillium expansum*. Resumos, 4ª SICONBIOL p.52. 1994.
- Chitarra, M.J.F. & Chitarra, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças-Fisiologia e Manejo. ESAL - FACEPE Lavras - M.G. 293p. 1990.

- Corrêa, R.M.S., Corrêa, M.M. & Cavalcante, U.M.T. Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. Sobre *Penicillium sclerotigenum* em tuberas de inhame (*Dioscorea cayenensis* L. AM:), III SICONBIOL. EMBRAPA-CNPDA. Águas de Lindóia. p.245. 1992.
- Fortes, J.F. Controle biológico da podridão parda, Molnilinia fructicola (Wint.) Honey em flores de pessegueiro. Fitopatologia Brasileira 11:359, resumo nº 166. 1986.
- Kretzchmar, A.A. Controle biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita em fruteiras. ANAIS. 3º Reunião Brasileira sobre controle biológico de doenças de plantas. p.10-19 USP. Piracicaba. 1989.
- Kretzchmar, A.A. & Valdebenito-Sanhueza, R.M. Avaliação de Bacillus subtilis e Bacillus thuringiensis no controle de Penicillium expansum em frutos de macieira após colheita. Anais IV Reunião Brasileira sobre controle biológico de doenças de plantas. p.27. Resumo 55. Outubro 1991.
- Melo, R.A.G., Mariano, R.L.R., Michereff, S.J., Menezes, M. & Coelho, R.S.B. Controle biológico da podridão mole de pimentão (*Capsicum annuum*), causada por *Erwinia carotovora* subsp. carotovora. Summa Phytopatológica vol.21 (3-4) p.206-212. 1995...
- Oliveira, D.F., Marques., E.U.A., Mariano, R.L.R. & Michereff, S.J. Potencial de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e Leveduras para o biocontrole de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* em frutos de tomate. Summa Phytopatológica. vol.20 (1) p.42. 1994.
- Robbs, C.F. Potencialidades de bactérias no biocontrole de doenças de plantas. Anais I Reunião sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas. p.17 a 23. Fundação Cargill, Piracicaba, 1986.
- Roobs, C. Controle biológico de doenças em plantas. In-Manual de Controle Biológico-Sociedade Nacional de Agricultura. p.46-51. 1992.

- Rosa, R.C.T. & Oliveira, S.M.A. Controle biológico *de Colletotrichum gloespoorioides* em frutos de acerola (*Malpighia glabra* L.). Fitopatologia Brasileira v.20 Resumo p.267. 1995.
- Rosa, R.C., Oliveira, S.M.A., Menezes, M. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão. Fitopatologia Brasileira v.19 (suplemento). Resumo nº 171. Agosto 1994.
- Sanhueza, R.M.V. & Borsói, M. Métodos para seleção de antagônicos a *Penicillum expansum* afetando maçãs em condições de laboratório. Anais IV Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas. p-27. Resumo 52. Outubro 1991.
- Sanhueza, R.M.V. & Melo J.S. de. Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridão de pós colheita. P.11 a 13, IN: Métodos de Seleção de Microorganismos Antagônicos a fitopatógenos Manual Técnico. EMBRAPA-CNPMA. Jaguariuna, SP. 1995.
- Sanhueza, R.M.V. Podridões de frutos de clima temperado em póscolheita e seu controle. Mesa Redonda M₂ D p.274. Fitopatologia brasileira vol.20 (suplemento). Agosto 1995.
- Sanhueza, R.M.V., Kretzchmar, A.A. & Borsói, M. Avaliação de organismos antagônicos a *Penicillium expansum* em maçãs cv. Fugi em pós colheita. Fitopatologia brasileira vol.17 (4), p. 423-429. Desembro 1992.
- Silva, J.B., Pedrosa, R.A., Tavares, L.A., Silveira, N.S.S. da, Andrade, D.E.G.T., Michereff, S.J., Mariano, R.L.R. & Tavares, S.C.C. de H. Antagonismo de Leveduras a *Botryodiplodia theobromae* em frutos de manga. Fitopatologia Brasileira, v.20 (suplemento). Resumo nº 315. 1995.
- Silva-Ribeiro, R.T., Valdebenito Sanhueza, R.M. & Henriques, R.M.V. Aplicação de um isolado antagônico de *Trichoderma* sp no controle biológico e integrado da podridão cinzenta em videira. Resumo. 4º SICONBIOL p.55. 1994.

- Soares, F.M.P., Valarini, P.J. & Menten, J.O.M. Seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Pseudomonas syringae* pv. tomato (PST) em sementes de tomateiro. Summa Phytopatológica. vol.20 (1) p.54. 1994.
- Tratch, R., Lima, M.L.R.Z. da C., Lima Neto, V. da C., Araujo, F.F. & Bettiol, W. Controle da podridão parda do pêssego com metabólitos de *Bacillus subtilis*. Summa Phytopatológica v.19(1) p.29 no 6. 1993.
- Ventura, J.A. Controle de doenças em pós colheita de frutos tropicias. Mesa Redonda 11 M2 - A fitopatologia Brasileira, v.20, agosto 273. 1995.
- Wilaon, C.F. & Pusy, P.L. Potential for biological controle of postharvest plant diseases. Plant Dis. 69: 375-378. 1985.