

# *Cryptococcus laurentii* Aplicado em Pós-Colheita Reduz Podridões em Maçãs

Luiz E. B. Blum<sup>1</sup>, Cassandro V. T. Amarante<sup>2</sup>, Rosa M. Valdebenito-Sanhueza<sup>3</sup>, Letícia S. Guimarães<sup>2</sup>, Alexandre Dezanet<sup>2</sup> & Pedro Hack Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-970, Brasília, DF, e-mail: luizblum@unb.br;

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Cx. Postal 281, CEP 88502-970, Lages, SC; <sup>3</sup>EMBRAPA Uva e Vinho, Cx. Postal 130, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS

(Aceito para publicação em 17/02/2004)

Autor para correspondência: Luiz E. B. Blum

BLUM, L.E.B., AMARANTE, C.V.T., VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. GUIMARÃES, L.S., DEZANET, A. & HACK NETO, P. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. Fitopatologia Brasileira 29:433-436. 2004.

## RESUMO

As podridões pós-colheita podem ocasionar perdas substanciais em maçãs (*Malus domestica*). O mofo azul (*Penicillium expansum*), a podridão amarga (*Glomerella cingulata*) e a podridão olho-de-boi (*Pezicula malicorticis*) estão entre as mais comuns. Grande atenção tem sido dada ao uso de alternativas de controle às doenças pós-colheita. A aplicação pós-colheita de leveduras, como o *Cryptococcus laurentii*, é uma das opções. Neste estudo testou-se a eficiência de *C. laurentii* (isolado 36) para o controle de podridões em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. Após aplicação dos produtos, através de imersão, os frutos foram armazenados em laboratório (15-20 °C / 60-70% UR) ou em câmara fria (1 °C / 90-95% UR). Os patógenos foram inoculados na concentração de 10<sup>2</sup> conídios ml<sup>-1</sup>, a levedura a 10<sup>7</sup> células ml<sup>-1</sup> e os fungicidas a

150 mg l<sup>-1</sup>. Em testes de laboratório, a aplicação de *C. laurentii* reduziu as podridões (*G. cingulata*, *P. expansum* e *P. malicorticis*) da maçã tanto quanto os fungicidas testados (thiabendazol e iprodione). Nos testes efetuados em câmara fria, constatou-se que, após o armazenamento, o tratamento de maçãs com *C. laurentii* foi tão eficiente quanto os tratamentos com fungicidas (thiabendazol, iprodione, digluconato de clorohexidina, dicloro-s-triazinatriona sódica, dicloroisocianurato de sódio e hipoclorito de sódio) na redução da podridão causada por *P. expansum*. Aplicação de *C. laurentii* não alterou a firmeza de polpa nem o teor de sólidos solúveis totais (°Brix) dos frutos.

**Palavras-chave adicionais:** *Glomerella cingulata*, *Malus domestica*, *Penicillium expansum*, *Pezicula malicorticis*.

## ABSTRACT

### Post harvest application of *Cryptococcus laurentii* reduces apple fruit rots

Rots might be responsible for substantial post harvest losses in apples (*Malus domestica*). The blue mold caused by *Penicillium expansum*, the bitter rot caused by *Glomerella cingulata*, and the 'bull's-eye rot' induced by *Pezicula malicorticis* are among of the most common rots. Great attention has been given to less environmental damaging alternatives for the control of postharvest diseases. The post harvest application of yeast-like fungi, such as *Cryptococcus laurentii*, is one option for controlling fruit rot. This study was carried out to test the efficiency of *C. laurentii* on fruit rot control in 'Fuji' and 'Gala' apples. After application of treatments,

by immersion, the fruits were stored in the laboratory (15-20 °C / 60-70% RH) or in cold storage (1 °C / 90-95% RH). The pathogens were applied at a concentration of 10<sup>2</sup> conidia ml<sup>-1</sup>, the yeast at 10<sup>7</sup> cells ml<sup>-1</sup>, and the fungicides at 150 mg l<sup>-1</sup>. The *Cryptococcus laurentii* was as efficient in reducing apple fruit rots (*G. cingulata*, *P. expansum*, and *P. malicorticis*) as were the fungicides thiabendazole and iprodione. In cold storage trials, *C. laurentii* was as efficient as the fungicides (thiabendazole, iprodione, chlorhexidine digluconate, sodium dichloro-s-triazinetrione, sodium dicloroisocyanurate, and sodium hypochloride) in reducing *P. expansum* fruit rot. The application of *C. laurentii* did not affect flesh firmness and the total soluble solids content (°Brix) of the fruits.

A cultura da macieira (*Malus domestica* Borkh.) é de grande importância econômica para o estado de Santa Catarina. O estado é o maior produtor brasileiro da cultura, com uma produção na safra 2001/2002 de cerca de 400 mil toneladas (ABPM, 2002). Todavia, perdas substanciais da produção de maçãs resultam de podridões após a colheita dos frutos. As podridões causadas por *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk (podridão amarga), *Penicillium expansum* Link. (mofo azul) e *Pezicula malicorticis* (H. Jacks.) Nannf. (podridão olho-de-boi) em pós-colheita estão entre as mais importantes (Boneti *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2000).

O controle pós-colheita de doenças em maçãs geralmente é feito com a imersão de frutos em soluções fungicidas. Entretanto, a redução no uso de fungicidas é uma preocupação mundial. O controle biológico de doenças em pomáceas tem mostrado resultados satisfatórios (Janisiewicz & Roitman, 1998; 1990; Valdebenito-Sanhueza & Cattanio, 2001). Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a eficiência da levedura *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner no controle pós-colheita de podridão amarga, mofo azul e podridão olho-de-boi em maçãs, cvs. Gala e Fuji.

Para obtenção de inoculo, *P. expansum*, *G. cingulata* e

*P. malicorticis* foram cultivados em BDA, sob temperatura ambiente (15 a 20 °C), durante sete, dez e 14 dias, respectivamente. *Cryptococcus laurentii* (isolado 36), selecionado por Valdebenito-Sanhueza & Cattanio (2001), foi cultivado por 72 h em BDA.

Os testes em laboratório, cujos produtos estudados estão apresentados na Tabela 1, foram delineados em blocos acaso, com oito repetições de 20 frutos cada. Inicialmente, os frutos da cv. Fuji foram desinfetados em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante 3 min e então perfurados com alfinetes próximos à região equatorial (quatro furos equidistantes de 1 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade). Em seguida, os frutos foram imersos durante 15 min nas suspensões compostas de água esterilizada infestada com os patógenos (concentração de inoculo ajustada para 10<sup>2</sup> conídios dos patógenos ml<sup>-1</sup>). Em tais suspensões foram, então, aplicados os fungicidas ou a levedura (concentração ajustada para 10<sup>7</sup> células ml<sup>-1</sup>). Em cada experimento foi incluído um tratamento testemunha onde somente a levedura foi aplicada, no entanto, este tratamento e seus resultados não foram apresentados (Tabela 1) por não ter sido usado na análise estatística. Posteriormente à aplicação dos produtos, os frutos foram acondicionados em bandejas de papelão e incubados em sala de ambiente escuro a 15-20 °C / 60-70% UR. Após o aparecimento dos sintomas iniciais, diariamente foram avaliados a incidência (%) e o diâmetro das lesões (mm) ocasionadas pelo patógenos. Para simplificar a apresentação dos dados (Tabela 1), foram apresentados apenas os resultados referentes às avaliações efetuadas aos dez dias para *P. expansum*, 22 dias para *G. cingulata* e aos 30 dias para *P. malicorticis*.

Os quatro testes (três com a cv. Fuji e um com a cv. Gala), em câmara fria comercial, (Tabela 2) foram delineados em blocos acaso, com seis repetições de 20 frutos cada. Inicialmente, os frutos (cvs. Fuji e Gala) foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para os testes de

laboratório. No entanto, as suspensões foram preparadas em água esterilizada infestada com *P. expansum* (concentração de inoculo ajustada para 10<sup>2</sup> conídios ml<sup>-1</sup>), nas quais, foram misturados os fungicidas ou a levedura (concentração ajustada para 10<sup>7</sup> células ml<sup>-1</sup>). Em cada experimento foi incluído um tratamento testemunha onde somente a levedura foi aplicada, no entanto, este tratamento e seus resultados não foram apresentados (Tabela 1) por não ter sido usado na análise estatística. Posteriormente à aplicação dos produtos, os frutos foram acondicionados em bandejas, que foram colocadas em caixas comerciais de papelão (capacidade para 18 kg de frutos), e, então, armazenados a 1 °C / 90-95% UR em câmara fria (Empresa Yakult S.A., Lages/SC). Após um período de 40 a 90 dias de armazenamento em câmara fria, dependendo do experimento (Tabela 2), os frutos foram avaliados imediatamente e sete dias após a retirada da câmara fria, quanto à incidência de doença (%), o diâmetro das lesões (mm) ocasionadas pelo patógeno, a firmeza de polpa (Kg F cm<sup>-2</sup>) e os teores de sólidos solúveis totais (°Brix).

Comprovada a significância dos dados através da Análise de Variância, as médias dos tratamentos foram comparadas entre si através do teste de Tukey (P = 5%).

Nos testes efetuados em laboratório, o tratamento de frutos com *C. laurentii* foi tão ou mais eficiente na redução do diâmetro das lesões e na incidência das podridões quanto aqueles com os fungicidas thiabendazol e iprodione (Tabela 1). Nas avaliações efetuadas, constatou-se que o tratamento com a levedura reduziu significativamente a incidência (%) e o tamanho (diâmetro em mm) das lesões das podridões, quando comparado ao tratamento testemunha com os patógenos (Tabela 1).

Nos experimentos realizados em câmara fria com maçãs cv. Fuji, *C. laurentii*, thiabendazol, iprodione, digluconato de clorhexidina, dicloro-s-triazinatriona sódica, dicloroisocianurato de sódio e hipoclorito de sódio foram eficientes na redução do diâmetro das lesões e da incidência

**TABELA 1** - Diâmetro e incidência das podridões causadas por *Glomerella cingulata*, *Penicillium expansum* e *Pezizula malicorticis*, em maçãs (*Malus domestica*) cv. Fuji

Tratamento	Diâmetro da lesão (mm)					
	<i>G. cingulata</i>		<i>P. expansum</i>		<i>P. malicorticis</i>	
	1 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	1 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	1 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>
Patógeno [10 <sup>2</sup> conídios ml <sup>-1</sup> ] (P)	7,5 a <sup>3</sup>	2,3 a	6,2 a	6,0 a	4,9 a	0,6 a
Iprodione [150 mg l <sup>-1</sup> ] + (P)	5,5 b	1,1 bc	0,4 c	4,2 ab	1,7 b	0,1 b
Thiabendazol [150 mg l <sup>-1</sup> ] + (P)	5,2 b	1,6 ab	2,6 b	4,4 ab	1,1 bc	0,2 b
Levedura [10 <sup>7</sup> ufc ml <sup>-1</sup> ] + (P)	3,0 c	0,2 c	0,1 c	0,1 c	0,6 c	0,1 b
	Incidência de podridão (%)					
Patógeno [10 <sup>2</sup> conídios ml <sup>-1</sup> ] (P)	26,9 a	12,7 a	44,5 a	38,6 a	30,7 a	7,1 a
Iprodione [150 mg l <sup>-1</sup> ] + (P)	22,6 ab	5,8 bc	4,0 c	26,8 a	12,3 bc	0,6 b
Thiabendazol [150 mg l <sup>-1</sup> ] + (P)	20,3 b	8,1 ab	19,8 b	28,3 a	7,1 cd	2,1 b
Levedura [10 <sup>7</sup> ufc ml <sup>-1</sup> ] + (P)	14,6 c	1,5 c	0,7 c	0,7 b	3,6 d	1,5 b

<sup>1</sup> Teste 1; <sup>2</sup> Teste 2; <sup>3</sup> Os dados apresentados referem-se às avaliações efetuadas aos dez, 22 e 30 dias após a inoculação de *Penicillium expansum*, *Glomerella cingulata* e *Pezizula malicorticis*, respectivamente (Para maior detalhe verificar Material e Métodos); <sup>4</sup> Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%). No tratamento apenas com a levedura não houve desenvolvimento de lesões, portanto foi omitido da tabela por não ter sido usado na análise estatística.

**TABELA 2** - Diâmetro de lesões e incidência de mofo azul (*Penicillium expansum*), firmeza de polpa e teor de sólidos solúveis totais (SST, °Brix) em maçãs (*Malus domestica*), cvs. Fuji e Gala, após armazenamento em câmara fria (1°C/90-95% UR)

Tratamento	Fuji								Gala	
	Teste 1 <sup>1</sup>		Teste 2 <sup>2</sup>		Teste 3 <sup>3</sup>		Teste 4 <sup>4</sup>			
	0 d <sup>5</sup>	7 d <sup>6</sup>	0 d	7 d	0 d	7 d	0 d	7 d	0 d	7 d
Diâmetro (mm)										
Patógeno [10 <sup>2</sup> conídios ml <sup>-1</sup> ] (P)	1,1a <sup>7</sup>	6,7a	0,3a	4,4a	6,8a	16,8a	0,9a	4,5a		
Iprodione [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	0,1b	1,3b	0,0b	2,6b	0,7b	2,7b	0,0b	0,6c		
Thiabendazol [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	0,1b	0,6b	0,1b	1,1b	0,4b	1,2bc	0,0b	0,0c		
Levedura [10 <sup>7</sup> ufc ml <sup>-1</sup> ] + P	0,0b	0,6b	0,1b	1,4b	0,2b	0,8bc	0,3b	2,9ab		
Dicloro-s-triazinatriona sódica [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	0,9b	2,2bc	0,1b	0,8c		
Hipoclorito de Na [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	0,0b	1,0bc	0,0b	0,8c		
Digluconato de clorohexidina [150mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	0,6b	1,2bc	*	*		
Dicloroisocianurato de Na [150mg l <sup>-1</sup> ] + P	* <sup>8</sup>	*	*	*	*	*	0,4ab	1,4bc		
Incidência de podridão (%)										
Patógeno [10 <sup>2</sup> conídios ml <sup>-1</sup> ] (P)	4,9a <sup>7</sup>	19,0a	2,1a	13,4a	18,3a	27,5a	4,6a	13,6a		
Iprodione [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	0,7b	3,8b	0,2b	10,5a	3,1b	7,8b	0,4bc	3,3b		
Thiabendazol [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	0,5b	1,3b	0,3b	3,6bc	1,3bc	2,8cd	0,0c	0,0b		
Levedura [10 <sup>7</sup> ufc ml <sup>-1</sup> ] + P	0,0b	1,8b	0,3b	5,4b	0,6bc	1,7d	1,9bc	11,4a		
Dicloro-s-triazinatriona sódica [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	2,7bc	4,2cd	0,6bc	3,0b		
Hipoclorito de Na [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	0,2cd	7,2bc	0,0c	4,0b		
Digluconato de clorohexidina [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	1,3bc	2,2d	*	*		
Dicloroisocianurato de Na [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	*	*	2,3b	4,4b		
Firmeza de polpa (kgF)										
Patógeno [10 <sup>2</sup> conídios ml <sup>-1</sup> ] (P)	6,7 <sup>7</sup>	6,8	7,1	6,6	8,0	7,6	7,1	6,2		
Thiabendazol [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	6,6	6,9	6,9	6,8	7,7	7,3	7,1	6,3		
Iprodione [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	6,5	6,6	6,8	6,6	8,0	7,6	6,7	6,1		
Levedura [10 <sup>7</sup> ufc ml <sup>-1</sup> ] + P	6,8	6,5	6,7	6,5	7,8	7,4	7,0	6,3		
Dicloro-s-triazinatriona sódica [150mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	7,9	7,4	7,1	6,0		
Hipoclorito de Na [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	7,9	8,0	6,7	5,9		
Digluconato de clorohexidina [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	7,4	7,3	*	*		
Dicloroisocianurato de Na [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	*	*	6,7	6,0		
Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)										
Patógeno [10 <sup>2</sup> conídios ml <sup>-1</sup> ] (P)	15,6 <sup>7</sup>	15,8	13,5	14,2	15,5	15,7	13,1	13,4		
Thiabendazol [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	15,4	15,6	14,1	14,0	15,4	15,7	14,2	14,3		
Levedura [10 <sup>7</sup> ufc ml <sup>-1</sup> ] + P	16,0	15,5	14,6	14,5	15,4	15,9	14,0	13,9		
Iprodione [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	15,4	15,4	14,0	14,3	15,5	15,8	13,9	14,1		
Dicloro-s-triazinatriona sódica [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	15,3	15,7	13,7	14,1		
Hipoclorito de Na [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	15,3	15,6	14,0	14,1		
Digluconato de clorohexidina [150mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	15,2	15,8	*	*		
Dicloroisocianurato de Na [150 mg l <sup>-1</sup> ] + P	*	*	*	*	*	*	13,5	13,9		

<sup>1</sup>Teste 1 = frutos mantidos por 60 dias em câmara fria (CF); <sup>2</sup>Teste 2 = frutos mantidos por 40 dias em CF; <sup>3</sup>Teste 3 = frutos mantidos por 90 dias em CF; <sup>4</sup>Teste 4 = frutos mantidos por 90 dias em CF; <sup>5</sup>Avaliação após a retirada da CF; <sup>6</sup>Avaliação sete dias após a retirada da CF; <sup>7</sup>Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, 5%); <sup>8</sup>\* = não testado. No tratamento apenas com a levedura não houve desenvolvimento de lesões, portanto foi omitido da tabela por não ter sido usado na análise estatística.

do mofo azul ocasionado por *P. expansum* (Tabela 2). Nas avaliações efetuadas imediatamente e sete dias após a retirada dos frutos do armazenamento em câmara fria, a levedura reduziu a incidência e o tamanho das lesões da podridão causada por *P. expansum* (Tabela 2). Todavia, no experimento

efetuado com a cv. Gala, a levedura reduziu significativamente os danos causados por *P. expansum* somente na avaliação efetuada imediatamente após a retirada dos frutos da câmara fria. Constatou-se também, que a aplicação de *C. laurentii* não alterou a qualidade dos frutos, característica expressa

através das avaliações de firmeza da polpa e teor de sólidos solúveis totais (°Brix) (Tabela 2).

A competição por nutrientes e o hiperparasitismo podem ter sido os mecanismos de controle pois Castoria *et al.* (1997) relataram que *C. laurentii* agiu contra *P. expansum* e *Botrytis cinerea* Pers: Fr. por competição de nutrientes e por produção de altos níveis de atividade extracelular de  $\alpha$ -1,3 glucanase na região da parede celular dos patógenos. Adicionalmente, Valdebenito-Sanhueza & Cattanio (2001) relataram que o isolado 36 de *C. laurentii* não induziu resistência em maçã e não apresentou antibiose *in vitro* contra *P. expansum*.

São inúmeros os exemplos de antagonistas bem sucedidos em laboratório, sob condições controladas, que fracassam quando submetidos ao ambiente natural ou comercial, onde as condições de ambiente são bastante variáveis (El-Ghaouth *et al.*, 2000; Pusey, 1999; Wilson & Pusey, 1985). No presente estudo, o isolado 36 de *C. laurentii* mostrou-se eficiente no controle de podridão ocasionada por *P. expansum* em condições comerciais de armazenamento dos frutos, em câmara fria. Segundo Wilson & Pusey (1985), uma dos percalços na utilização de antagonistas para o biocontrole de doenças é a dificuldade da manutenção das condições do ambiente favorável aos agentes de controle biológico. Como no presente estudo as condições de armazenamento dos frutos são constantes, os problemas apontados por Wilson & Pusey (1985) não foram limitantes à eficiência da levedura no controle da podridão dos frutos por *P. expansum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPM. Associação Brasileira dos Produtores de Maçã. <http://www.abpm.org.br/>. Consulta feita em 10/9/2002.
- BLUM, L.E.B., AMARANTE, C. V. T., PRADO, G., ARIOLI, C. J., GUIMARÃES, L. S. & DEZANET, A. Cultivar, método de inoculação e concentração de inóculo afetando as podridões da maçã por *Penicillium expansum* e *Pezizula malicorticis*. Fitopatologia Brasileira 25:359-360. 2000.
- BONETI, J. I. S., RIBEIRO, L. G. & KATSURAYAMA, Y. Manual de identificação de doenças e pragas da macieira. Florianópolis. EPAGRI. 1999.
- CASTORIA, R., DE CURTIS, F., LIMA, G. & DE CICCIO, V. Beta-1-3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. Postharvest Biology and Technology 12:293-300. 1997.
- EL-GHAOUTH, A., SMILANICK, J.L. & WILSON, C.L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 19:103-110. 2000.
- JANISIEWICZ, W.J. & ROITMAN, J. Biological control of *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology 78:194-198. 1998.
- PUSEY, P.L. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pesticide Science 27:133-140. 1989.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. & CATTANIO, M.E. Controle biológico de *Penicillium expansum* em pós-colheita de maçãs 'Fuji'. Fitopatologia Brasileira 26:445. 2001. (Resumo).
- WILSON, C.L. & PUSEY, P. L. Potential for biological control of postharvest plant disease. Plant Disease 69:375-378. 1985.