

USO DE ELICITORES NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE *Monilinia fructicola* EM PÊSSEGOS 'CHIMARRITA' ARMAZENADO

Raquel Carlos Fernandes¹, Scheila Ronconi Da Rolt², Juliana Vignali Alves Amaral³, Cristiano André Steffens⁴, Cassandro V.T. do Amarante⁵, Sérgio Miguel Mazaro⁶, Mycheli Preuss da Cruz⁷, Amanda M. F. Drehmer Vieira⁸, Bruno Pansera Espíndola⁹

¹Instituto Federal Catarinense/raaquel-carlos@hotmail.com

²Instituto Federal Catarinense/scheiladarolt@hotmail.com

³Instituto Federal Catarinense/julianavignaliaves@gmail.com

⁴Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/cristiano.steffens@udesc.br

⁵Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/amarante.cav@gmail.com

⁶Universidade Tecnológica Federal do Paraná/sergio@utfpr.edu.br

⁷Universidade Tecnológica Federal do Paraná/mychelipreuss@outlook.com

⁸Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/ amanda.drehmer@udesc.br

⁹Instituto Federal Catarinense/bruno.pansera@ifc.edu.br

Resumo: A podridão parda, causada pelo fungo *Monilinia fructicola* é uma das doenças de maior importância na cultura do pessegueiro no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar as substâncias acibenzolar-S-metil (ASM), mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Bacillus subtilis* (Bs) e quitosana (Qt) na indução de resistência, incidência e severidade da doença causada por *Monilinia fructicola* e no desenvolvimento in vitro do patógeno. O experimento in vivo foi realizado em um pomar comercial no município de Pinto Bandeira/RS, com aplicações pré-colheita de ASM (30 e 60 mg L⁻¹), *S. cerevisiae* (1 e 2 mL L⁻¹), *B. subtilis* (10 mL L⁻¹) e de quitosana (10 g L⁻¹) iniciando as aplicações 30 dias antes da colheita, intercalando as quatro pulverizações em uma semana, e in vitro, utilizando-se os mesmos tratamentos vertidos em meio de cultura BDA. Os tratamentos com *S. cerevisiae*, *B. subtilis*, quitosana e ASM (60 mg L⁻¹), in vivo, apresentaram menores índices de AACPD demonstrando menor desenvolvimento da doença nos frutos com inoculação sem fermento e com inoculação natural. No experimento in vitro, não houve crescimento micelial nos tratamentos de *B. subtilis*, quitosana mais ácido acético e quitosana mais ácido acético e NaOH.

Palavras-Chave: *Prunus persica*, pós-colheita, controle alternativo.

1 INTRODUÇÃO

O pêssigo no Brasil é atacado por diversos patógenos que comprometem a produção e lucratividade para o produtor rural. Entre as doenças de maior importância está a podridão parda, causada pelo fungo *Monilinia fructicola*.

A manifestação da doença no fruto é visualizada durante o período de maturação, quando aparecem pequenas lesões de cor parda que se tornam marrons com a colonização dos tecidos. Com o tempo, os frutos ficam totalmente cobertos de esporos do fungo, contribuindo para novas infecções no pomar (GARRIDO; SÔNEGO, 2003).

Atualmente, não há cultivares resistentes à podridão parda e o controle da doença deve ser realizado visando o saneamento correto dos pomares de produção. Os tratamentos alternativos aos fungicidas podem ser uma importante alternativa para os produtores, considerando-se que a preocupação com a contaminação ambiental é cada vez mais discutida nas formas de produção agrícola. Entretanto, os trabalhos relacionados ao controle de doenças fúngicas ainda são na maioria realizados com produtos químicos

convencionais, e é a forma de controle mais comum aplicada em pomares comerciais (MIO; GARRIDO; UENO, 2014).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a indução de resistência, incidência e severidade de *Monilinia fructicola* em pêssegos ‘Chimarrita’ utilizando as substâncias acibenzolar-S-metil, mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e quitosana.

2 METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido com pêssegos cultivar “Chimarrita”, na safra de 2016, em um pomar instalado em Pinto Bandeira, Rio Grande do Sul. Os tratamentos constaram de pulverizações pré-colheita com os produtos acibenzolar-S-metil, produto comercial Bion® 500 WG (Syngenta, Basel, Suíça) em doses de 30 e 60 mg de ingrediente ativo por litro, mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, do produto AgroMos® (Alltech, Lexington, EUA) nas doses de 1 e 2 mL L⁻¹, *Bacillus subtilis*, nome comercial Serenade® (BASF, Ludwigshafen, Alemanha) na concentração de 10 mL L⁻¹, quitosana na concentração de 10g L⁻¹ e água e surfactante não-iônico copolímero poliéster-polimetil siloxano Break Thru® (Evonik, São Paulo, Brasil) como tratamento controle, na dose de 0,5 mL L⁻¹. As aplicações iniciaram um mês antes da colheita, com 1.000 L ha⁻¹ de volume de calda, para atingir o molhamento completo das folhas. Ao total, foram feitas quatro aplicações, com intervalos de uma semana entre as pulverizações.

O delineamento experimental nos tratamentos pré-colheita *in vivo* foi utilizado o de blocos ao acaso, de maneira que cada bloco foi constituído de 3 plantas. Os frutos foram colhidos da região do terço médio da copa e separados em 4 lotes. Os lotes foram separados em lote 1, com 20 frutos para análise de maturação, lote 2, 20 frutos com inoculação de *Monilinia fructicola* sem fermento, lote 3 com 20 frutos com inoculação natural, com análises de maturação após o período de armazenamento e lote 4, de 40 frutos para análises bioquímicas no momento da saída dos frutos da câmara e depois de 6 dias em temperatura ambiente. Com exceção do lote 4, os demais foram mantidos em armazenamento refrigerado por 30 dias (0±0,2 °C, UR 95±2%).

Para a inoculação de *Monilinia fructicola* foram utilizados quadrados de papel filtro de 1cm², que foram emergidos em solução de 10⁶ esporos mL⁻¹ do patógeno e colocados sobre a epiderme dos frutos.

A incidência e severidade dos frutos foram avaliadas diariamente, medindo-se o diâmetro maior e menor das lesões, durante 4 dias após a saída dos frutos da câmara, em condições de 20±2 °C e UR 60±5% para calcular a área abaixo da curva de progresso da

doença (AACPD), obtida a partir da fórmula $AACPDs = \sum [(S_i + S_{i+1})/2 \cdot (T_{i+1} - T_i)]$, onde S_i = severidade da doença, diâmetro médio da lesão iésima observação; S_{i+1} = severidade da doença, diâmetro médio da lesão na avaliação $i + 1$; T_i = tempo em dias da iésima observação; T_{i+1} = dias da avaliação $i + 1$. A S_i foi calculada com a soma dos diâmetros médios das lesões, dividida pelo total de frutos.

Nos frutos sem inoculação, realizou-se as análises de maturação e qualidade no momento da colheita e 30 dias após armazenamento em câmara fria e nos quatro dias seguintes à retirada dos frutos, mantidos em temperatura ambiente. As análises bioquímicas de fenilalaninaamoniólise (FAL), peroxidase (PO), quitinase e glucanase, foram realizadas com a metodologia descrita por Mazaro et al. 2008.

No experimento *in vitro*, utilizou-se os mesmos tratamentos aplicados em pré-colheita seguindo as mesmas concentrações, com delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Os produtos foram vertidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e acondicionados em placas de Petri 50 mm. Nos tratamentos com quitosana e o produto comercial AgroMos®, corrigiu-se o pH do meio para 5,3, valor encontrado antes da adição dos produtos.

Com base no crescimento do diâmetro das colônias nas placas, analisou-se a área abaixo da curva de progresso do fungo (AACPF), que foi medida até que a primeira colônia do tratamento controle atingisse a borda da placa, indicando total crescimento. O teste *in vitro* foi realizado três vezes.

Para os experimentos *in vivo* e *in vitro*, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias Tukey ($p < 0,05$) no software SAS® (Statistical Analysis System, Cary, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos frutos submetidos à inoculação natural estão descritos na Tabela 1.

Os tratamentos *in vivo* de *S. cerevisiae* (Sc), *B. subtilis* (Bs) e quitosana (Qt) dos frutos com inoculação natural apresentaram os menores valores de AACPD nas avaliações de incidência de *M. fructicola* do que o controle.

O uso de *S. cerevisiae* também é descrito por Heling et al. 2017, como vantajoso no controle pós colheita de *Colletotrichum musae* em bananas, atingindo níveis de controle do patógeno de 48%.

Os melhores resultados no controle da severidade e incidência dos frutos inoculados sem fermento foram obtidos nos tratamentos de quitosana (Qt), *B. subtilis* (Bs), *S. cerevisiae* (Sc) em ambas as doses e na maior dose de acibenzolar-S-metil (ASM).

Segundo Lima et al. 2017, o uso da substância de acibenzolar-S-metil pode reduzir a doença de *Xanthomonas campestris* em videiras em até 91,31%, em testes com aplicação 15 dias antes da inoculação do patógeno.

Estudo realizado por Boava et al. 2010 indica que tratamentos em eucalipto realizados com ASM e *S. cerevisiae* para a indução de resistência ao agente causal da ferrugem, *Puccinia psidii*, são eficientes no controle da doença.

Tabela 1 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a incidência de *Monilinia fructicola* em frutos inoculados sem fermento no dia da colheita e com inoculação natural, em pêssegos ‘Chimarrita’ tratados com elicitores em pré-colheita.

Tratamento	<i>Monilinia fructicola</i>		
	(inoculado sem fermento)	(inoculação natural)	
	AACPD		
	severidade	incidência	incidência
Controle	203,8a	263,0a	130,4a
ASM (30 mg L ⁻¹)	164,6a	263,6a	99,8ab
ASM (60 mg L ⁻¹)	34,8b	88,0b	44,6c
Sc (1 mL L ⁻¹)	36,3b	117,8b	58,1bc
Sc (2 mL L ⁻¹)	36,1b	129,6b	74,2bc
Bs (10 mL L ⁻¹)	22,7b	82,0b	55,2bc
Qt (10 g L ⁻¹)	19,9b	93,0b	53,2bc
C.V.(%)	27,9	30,6	27,4

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). ASM: acibenzolar-S-metil, Sc: mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, Bs: *Bacillus subtilis*, Qt: quitosana.

A AACPF para *M. fructicola* no teste *in vitro* está apresentada na Tabela 2.

Os tratamentos de *B. subtilis*, quitosana mais ácido acético, e quitosana mais ácido acético e NaOH obtiveram os melhores resultados, impedindo o crescimento total do fungo nas placas.

Pesquisa realizada por Freddo et al. 2014 também indica um bom resultado do uso da quitosana no controle de fungos patogênicos. De acordo com os autores, a quitosana nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 2% foi capaz de reduzir o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* em teste *in vitro*.

Bacillus subtilis também possui ação fungitóxica para o agente causal da antracnose (*Colletotrichum musae*) em banana testado *in vitro*, reduzindo 74% o crescimento do patógeno (OLIVEIRA; VIANA; MARTINS, 2016).

Os resultados sobre as análises bioquímicas estão descritos na tabela 3.

Tabela 2 – Área abaixo da curva de progresso do fungo (AACPF), com base no crescimento micelial *in vitro*, de *Monilinia fructicola*, com os elicitores vertidos junto ao meio BDA.

Tratamento	<i>M. fructicola</i>
Controle	154,8ab
ASM (30 mg L ⁻¹)	167,3a
ASM (60 mg L ⁻¹)	144,1c
Sc (1 mL L ⁻¹)	147,1bc
Sc (1 mL L ⁻¹) + NaOH	161,6ab
Sc (2 mL L ⁻¹)	88,2e
Sc (2 mL L ⁻¹) + NaOH	114,6d
Bs (10 mL L ⁻¹)	0,0f
Qt (10 g L ⁻¹)	128,9cd
Qt (10 g L ⁻¹) + Ac. Acético	0,0f
Qt (10 g L ⁻¹) + Ac. Acético + NaOH	0,0f
C.V.(%)	12,9

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil, Sc: mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, Bs: *Bacillus subtilis*, Qt: quitosana.

Tabela 3 – Teores de proteínas totais, atividade da enzima peroxidase (PO), da fenilalanina amônia-liase (FAL), da quitinase, teor de açúcares totais e de açúcares redutores em pêssegos 'Chimarrita', armazenados por 30 dias a $0 \pm 0,2$ °C, UR $95 \pm 2\%$, na saída da câmara.

Tratamento	Proteínas Totais (mg g ⁻¹)	Peroxidase (U.E. min ⁻¹)	FAL (U.abs. mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	Quitinase (U.E. mg ⁻¹ proteína)	Açúcares totais (mg g ⁻¹)	Açúcares Redutores (10 ³ mg g ⁻¹)
- - - Saída da câmara - - -						
Controle	0,504d	0,591d	0,017b	0,000b	72,18 ^{ns}	0,112b
ASM(30 mg L ⁻¹)	0,798bc	0,565d	0,012b	0,000b	73,25	0,125b
ASM(60 mg L ⁻¹)	0,723c	2,537c	0,118ab	0,858a	71,13	0,128b
Sc (1 mL L ⁻¹)	0,897ab	1,588c	0,115ab	1,277a	72,09	0,205a
Sc (2 mL L ⁻¹)	1,034a	6,490c	0,109ab	0,975a	75,51	0,212a

Bs (10 mL L ⁻¹)	0,885b	6,571b	0,170a	1,459a	76,99	0,207a
Qt (10 g L ⁻¹)	0,936ab	8,322a	0,178a	1,653a	74,66	0,198a
C.V. (%)	7,6	18,3	24,4	22,8	6,4	11,5

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ^(ns)Diferença entre médias, na coluna, não significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Bs: *Bacillus subtilis*, Qt: quitosana.

O aumento no valores de açúcares redutores nos tratamentos com os indutores pode ser causado pela demanda energética gerada na ativação do metabolismo secundário e pela síntese, acúmulo e ativação de proteínas ligadas à patogênese. Não se observou atividade da enzima quitina no tratamento controle. De acordo com Van-Loon et al. 2006, a atividade desta enzima está associada ao seu poder catalizador da hidrólise dos polímeros de quitina presentes na parede celular dos fungos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os indutores de resistência que apresentaram melhores resultados no experimento *in vivo* foram os tratamentos com *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, quitosana e a maior dose de acibenzolar-S-metil para os frutos que tiveram inoculação de *M. fructicola* sem fermento e aos que tiveram inoculação natural. Na fase *in vitro* do experimentos, os maiores índices de controles foram atingidos com *B. subtilis* e quitosana associada a ácido acético e ácido acético mais NaOH.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UDESC/CAV Lages, SC, pela disponibilidade do laboratório de Pós-colheita e Fitopatologia para o armazenamento dos frutos e utilização dos equipamentos, e à UTFPR Campus Dois Vizinhos no desenvolvimento das análises bioquímicas.

REFERÊNCIAS

- BOAVA, Leonardo Pires et al. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 36, n. 2, p.168-172, Junho 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052010000200012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 jun. 2017.
- FREDDO, Álvaro Rodrigo et al. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 1-4, Jan. 2014.

Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000100001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 jun. 2017.

GARRIDO, Lucas da R.; SÔNEGO, Olavo Roberto. **Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha**. 2003. Disponível em:

<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/doenca.htm>>. Acesso em: 28 jun. 2017.

HELING, Anderson Luis et al. Controle biológico de antracnose em pós-colheita de banana “Maçã” com *Saccharomyces* spp. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 43, n. 1, p. 49-51, Mar. 2017. Disponível em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052017000100049&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 jun. 2017.

LIMA, MERIDIANA ARAUJO GONÇALVES et al. INDUCTION OF RESISTANCE TO *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* IN GRAPEVINE PLANTS. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 39, n. 2, e-669, 2017. Disponível em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452017000200403&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 jun. 2017.

MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; MAY-DE-MIO, L.L.; BIASI L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C.K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

MIO, Louise Larissa May de; GARRIDO, Lucas da Ressurreição; UENO, Bernardo.

DOENCAS DA CULTURA DO PESSEGUEIRO E MÉTODOS DE CONTROLE. In:

RASEIRA, Maria do Carmo Bassols; PEREIRA, José Francisco Martins; CARVALHO,

Flávio Luiz Carpena. **Pessegueiro**. Brasília: Embrapa, 2014. p. 355-418. Disponível em:

<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1011203/1/Pessegueiro355432.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2017.

OLIVEIRA, Erivanda Silva de; VIANA, Francisco Marto Pinto; MARTINS, Marlon Vagner Valentim. Alternativas a fungicidas sintéticos no controle da antracnose da banana.

Summa phytopathol., Botucatu, v. 42, n. 4, p. 340-350, Dez. 2016. Disponível em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052016000400340&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 jun. 2017.

VAN-LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.135-62, 2006.