

Quitosana no controle de *Penicillium* sp na pós-colheita de maçãs

Chitosan for control of *Penicillium* sp in post-harvest of apples

BOTELHO, Renato Vasconcelos 1, MAIA, Aline José 2, RICKLI, Edinei Hartmann 3, LEITE, Carla Daiane 2, FARIA, Cacilda Márcia Duarte Rios 1

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro, Guarapuava/PR - Brasil, rbotelho@unicentro.br, criosfaria@hotmail.com; ² Eng. Agr., Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro, Guarapuava/PR - Brasil, alymaia2005@yahoo.com.br, cdaianeleite@hotmail.com; ³ Programa de Extensão Universidade Sem Fronteiras, SETI-PR. Curitiba/PR - Brasil, edih2rickli@yahoo.com.br.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial da quitosana no controle de podridões pós-colheita em maçãs. Um experimento *in vitro* avaliou o efeito das concentrações de 0, 10, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹ de quitosana (Fishfertil®, 20 g L⁻¹ de quitosana) no crescimento micelial do fungo *Penicillium* sp.. Em outro ensaio, maçãs das cultivares Princesa e Castel Gala foram mergulhadas em soluções contendo as concentrações de 0, 10, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹ de quitosana e inoculados após 24 horas com um isolado de *Penicillium* sp. Avaliações de incidência e severidade da doença foram realizadas aos 2, 4 e 6 dias após inoculação. No experimento *in vitro*, a quitosana apresentou efeito fungistático, reduzindo linearmente o diâmetro das colônias de *Penicillium* sp. Os tratamentos pós-colheita com quitosana reduziram a incidência de podridões em maçãs a partir da concentração de 10 mg L⁻¹. No entanto, não houve efeito dos tratamentos no diâmetro das lesões.

PALAVRAS-CHAVE: podridões, incidência, severidade, produção orgânica.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the potential of chitosan on the control of post-harvest decays in apples. A trial *in vitro* evaluated the effects of the followed concentrations of chitosan: 0, 10, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹ (Fishfertil®, 20 g L⁻¹ of chitosan) on the mycelial growth of a fungus isolate of *Penicillium* sp.. In another experiment, apples of the cultivars Princesa and Castel Gala were dipped by 10 seconds in solutions containing the following concentrations of chitosan: 10, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹; and inoculated 24 hours later with the *Penicillium* sp. isolate. Evaluations of incidence and severity of the disease were carried out at 2, 4 or 6 days after inoculation. In the *in vitro* trial, chitosan showed a fungistatic effect, linearly decreasing the diameter of *Penicillium* colonies. The post-harvest treatments with chitosan decreased the incidence of apple decays starting at the concentration of 10 mg L⁻¹. Nevertheless, there was not effect of the treatments on the lesion diameters.

KEY WORDS: diseases, incidence, severity, agroecology.

Correspondências para: rbotelho@unicentro.br

Aceito para publicação em 31/07/2010

Introdução

A incidência de podridões causadas por *Penicillium* spp. em maçãs durante o armazenamento causa perdas qualitativas e quantitativas, podendo ocorrer a contaminação ainda no campo ou durante o manejo pós-colheita (BRACKMANN et al., 2005). Segundo Valdebenito-Sanhueza (1991), as perdas causadas por estas podridões podem alcançar 30% das frutas armazenadas. Amiri & Bombeix (2005) isolaram de maçãs com podridões espécies deste patógeno e verificaram infecções através das lenticelas ou por lesões na epiderme dos frutos. Para o controle dessas podridões são eficientes os tratamentos em pós-colheita com fungicidas (COSTA & VEIGA, 1996), assim como também com os fosfitos de potássio adicionados de cloreto de cálcio (BRACKMANN, 2005). Contudo, devido aos riscos de resíduos pelo uso de agrotóxicos, outras formas de controle de doenças fúngicas necessitam ser avaliadas.

Visando a busca de controles alternativos de fungos fitopatogênicos, um dos produtos que vem sendo pesquisado é a quitosana, um polímero policatiônico β -1,4 ligado à D-glucosamina definido como um diacetilato de quitina, sendo um polissacarídeo natural extraído da casca ou exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo, lagosta e de plantas como as algas marinhas. Oh et al. (1998) sugeriram que a quitosana tem um duplo efeito na interação patógeno-hospedeiro, ou seja, a atividade antifúngica e a ativação das respostas de defesa da planta. Além disso, segundo Bhaskara Reddy (2000), no caso de podridões pós-colheita, a quitosana pode formar um filme na superfície dos frutos, retardando a sua senescência, aumentando sua resistência a infecções fúngicas.

Bautista-Baños et al. (2003) verificaram em testes *in vitro* efeito fungicida da quitosana a 2 e 3% sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, assim como o controle da antracnose em frutos de mamão quando tratados com 1,5% de quitosana.

Resultados positivos com o uso de quitosana também foram reportados para o controle de *Botritis cinerea* em uvas (AIT BARKA, 2004) e morangos (BHASKARA REDDY, 2000) e *Puccinia arachidis* em amendoim (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da quitosana no crescimento micelial e no controle de podridões pós-colheita por *Penicillium* sp.

Material e métodos

Controle *in vitro* do fungo *Penicillium* sp.

Um experimento *in vitro* foi conduzido com um isolado do fungo *Penicillium* sp., estudando-se o efeito das concentrações de 0,10, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹ de quitosana. Para os tratamentos se utilizou o produto comercial Fishfertil® (Fishfétil fertilizantes Ltda, Mogi Mirim-SP), contendo 20 g L⁻¹ de quitosana. O produto foi adicionado ao meio de cultura BDA fundido (temperatura aproximada de 45°C), obtendo-se as concentrações acima mencionadas. O meio de cultura, nas diferentes concentrações do produto, foi vertido em placas de Petri, utilizando-se 15mL por placa.

No centro de cada placa foi disposto um disco com 5mm de diâmetro, retirado de culturas com crescimento ativo do isolado de *Penicillium* sp., os quais foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) sob condições controladas (27±2°C e fotoperíodo de 12 horas), durante seis dias. Nesse período, foi mensurado o diâmetro médio das colônias aos 2, 4 e 6 DAI (dias após inoculação).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x3 (tratamentos x DAI), com quatro repetições e uma placa de Petri por unidade amostral. Os resultados foram submetidos à análise de variância, estudando-se

a interação dos fatores e regressão polinomial.

Controle de podridões pós-colheita de maçãs causadas por *Penicillium* sp.

Para este ensaio foram utilizadas maçãs das cultivares Princesa e Castel Gala provenientes do Pomar Experimental da Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), em Guarapuava-PR. Os frutos foram colhidos em 21/01/2008 e armazenados em câmara fria a 4°C por 15 dias. Após este período, realizou-se a desinfecção dos frutos em hipoclorito de sódio 0,1% por 60" e em álcool por 30", com posterior enxágue em água destilada e secagem ao ar (ALFENAS & MAFRA, 2007).

Posteriormente, os frutos foram mergulhados por dez segundos em soluções contendo as concentrações de 10, 20, 40, 80 e 160 mg L⁻¹ de quitosana, utilizando-se o produto Fishfertil®. Depois de 24 horas dos tratamentos, os frutos foram inoculados com *Penicillium* sp.. Para isso, foram feitos ferimentos em dois pontos

equidistantes na região equatorial dos frutos, com 2 mm de profundidade, com o auxílio de uma agulha esterilizada. Após o ferimento, os frutos foram inoculados por aspersão de suspensão de esporos do fungo na concentração de 10⁶ esporos mL⁻¹.

Em seguida os frutos foram secos sob ventilação forçada. A cada 24 horas registrou-se a temperatura máxima e mínima (Figura 1) e realizou-se a avaliação da evolução das lesões, através da medição do seu diâmetro com auxílio de um paquímetro digital, aos 2, 4 e 6 dias após inoculação (DAI). Foram determinadas duas variáveis: incidência (porcentagem de inoculações com lesões) e severidade (diâmetro médio das lesões desenvolvidas).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x6x3 (cultivares x tratamentos x DAI) com cinco repetições de cinco frutos. Os resultados foram submetidos à análise de variância, estudando-se a interação entre os fatores e regressão polinomial.

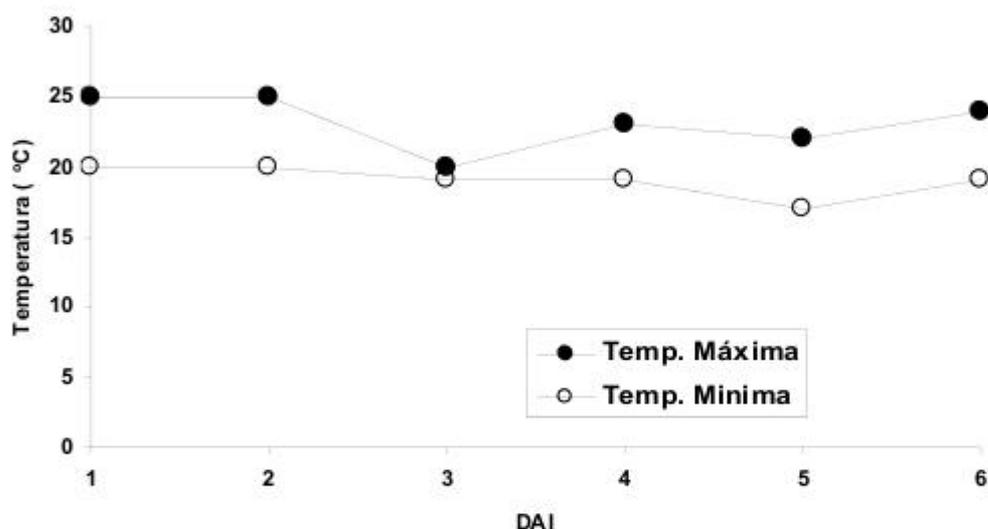


FIGURA 1 - Temperaturas mínimas e máximas diárias durante o período de avaliação de podridões causadas por *Penicillium* sp. em maçãs (Guarapuava-PR, 2008).

Resultados e discussão

Controle *in vitro* do fungo *Penicillium* sp.

Neste experimento, verificou-se redução linear do crescimento micelial do fungo *Penicillium* sp. com o aumento das doses de quitosana em todas as avaliações realizadas (Figura 2). Na última avaliação, aos 6 DAI, a redução do crescimento para a maior dose do produto foi de 34,2%, onde o diâmetro médio da colônia da testemunha foi de 64,8 mm e de 42,6 mm na concentração de 160 mg L⁻¹ de quitosana. De forma semelhante, Ait Barka (2004) constataram 44% de inibição de crescimento radial do fungo *Botrytis cinerea*

isolado de uvas cv. Merlot, utilizando-se de produto a base de quitosana. Estes mesmos autores também relataram mudanças morfológicas marcantes e alterações estruturais severas das células do fungo causadas pelo produto.

Bautista-Baños et al. (2003) verificaram inibição total do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de frutos de mamão quando tratado com 2 a 3% de quitosana. Estes autores também constaram redução na esporulação de *C. gloeosporioides* e marcantes alterações morfológicas dos conídios formados em meio de cultura acrescido de quitosana.

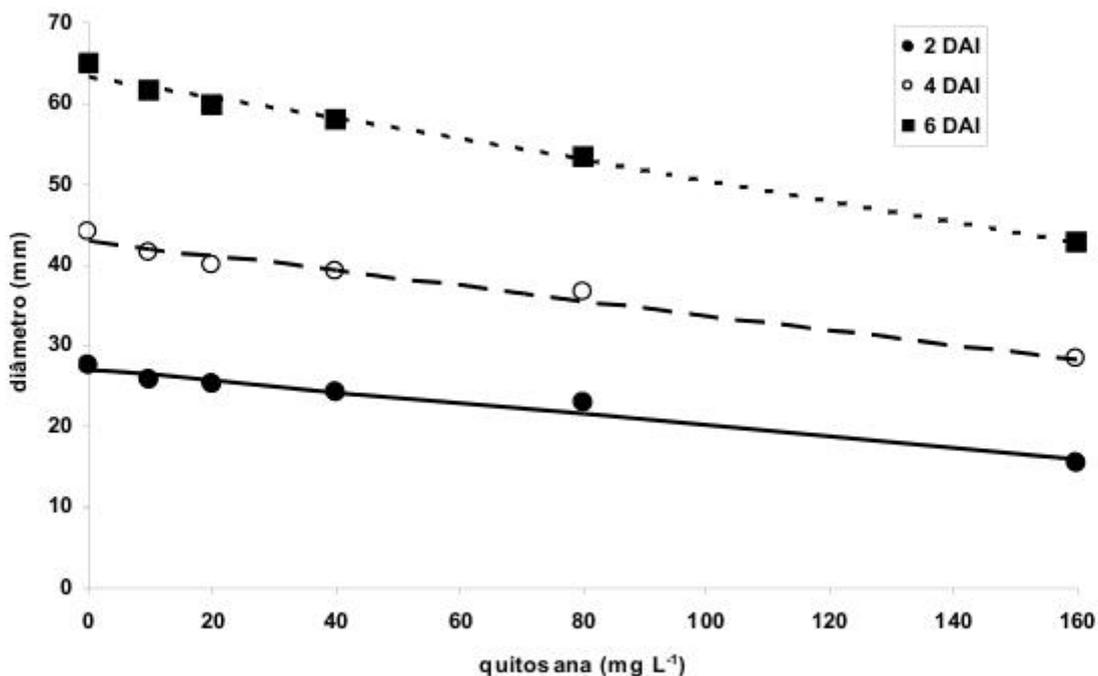


FIGURA 2 – Crescimento micelial (mm) *in vitro* do fungo *Penicillium* sp. em meio de cultura com diferentes concentrações de quitosana (Guarapuava-PR, 2008). (2 DAI: $y=27,0620-0,0688x$, $r^2=96,8^{**}$; 4 DAI: $y=42,8992-0,0906x$, $r^2=97,6\%^{**}$; 6 DAI: $y=63,3988-0,1300x$, $r^2=98,8\%^{*}$)

Controle de podridões pós-colheita de maçãs causadas por *Penicillium* sp.

Até o 2º DAI não apareceram sintomas de podridões em maçãs cv. Princesa. No entanto, houve efeito linear e quadrático das concentrações de quitosana sobre a incidência de *Penicillium* sp., aos 4 e 6 DAI, respectivamente (Figura 3A), demonstrando um efeito inibidor no desenvolvimento deste fungo em maçãs. Em relação às maçãs cv. Castel Gala, a quitosana também teve efeito na redução da incidência de podridões, sendo que houve significância para regressão quadrática em função das doses de quitosana em todas as avaliações realizadas. Aos 6 DAI, a incidência de podridões foi de 61,3% no tratamento testemunha e de apenas 14,0% no tratamento com 10 mg L⁻¹ de quitosana (Figura 3B). A quitosana reduziu a incidência, mas não interferiu na severidade da doença, após a infecção do fungo *Penicillium* sp. (Tabela 1).

Para ambas as cultivares de maçãs, ficou

evidente que a incidência de *Penicillium* sp. apresentou redução acentuada a partir da concentração de 40 mg L⁻¹ de quitosana, com valores similares aos obtidos para as concentrações de 80 e 160 mg L⁻¹ (Figuras 3A e 3B). De acordo com Benhamou (1996) a aplicação de uma solução de quitosana pode sensibilizar a planta a responder mais rapidamente ao ataque de patógenos pelo estímulo da produção de quitinase e glucanase. Além disso, a quitosana pode formar um filme semi-permeável sobre os tecidos vegetais, retardando a senescência de frutos e reduzindo a ocorrência de podridões (EL GHAOUTH et al., 2000).

Segundo Bautista-Baños et al. (2003) a quitosana apresentou um efeito protetor em frutos de mamão contra o ataque de *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo possível que o filme de quitosana sobre os frutos tenha servido como uma barreira à penetração do tubo germinativo do

Tabela 1. Diâmetro médio das lesões (mm) por *Penicillium* spp. em maçãs tratadas com diferentes doses de quitosana, seis dias após inoculação (Guarapuava-PR, 2008).

Doses Quitosana (mg L ⁻¹)	Maçãs 'Castel Gala'	'Maçãs Princesa'
	Diâmetro (mm)	Diâmetro (mm)
0	31,0 n.s. ¹	31,4 n.s.
10	32,8	31,4
20	32,5	31,5
40	20,0	31,6
80	26,0	31,9
160	31,1	32,4
C.V. (%)	34,6	29,4
Prob.>Fc	0,3146	0,9700

¹ n.s. = não significativo

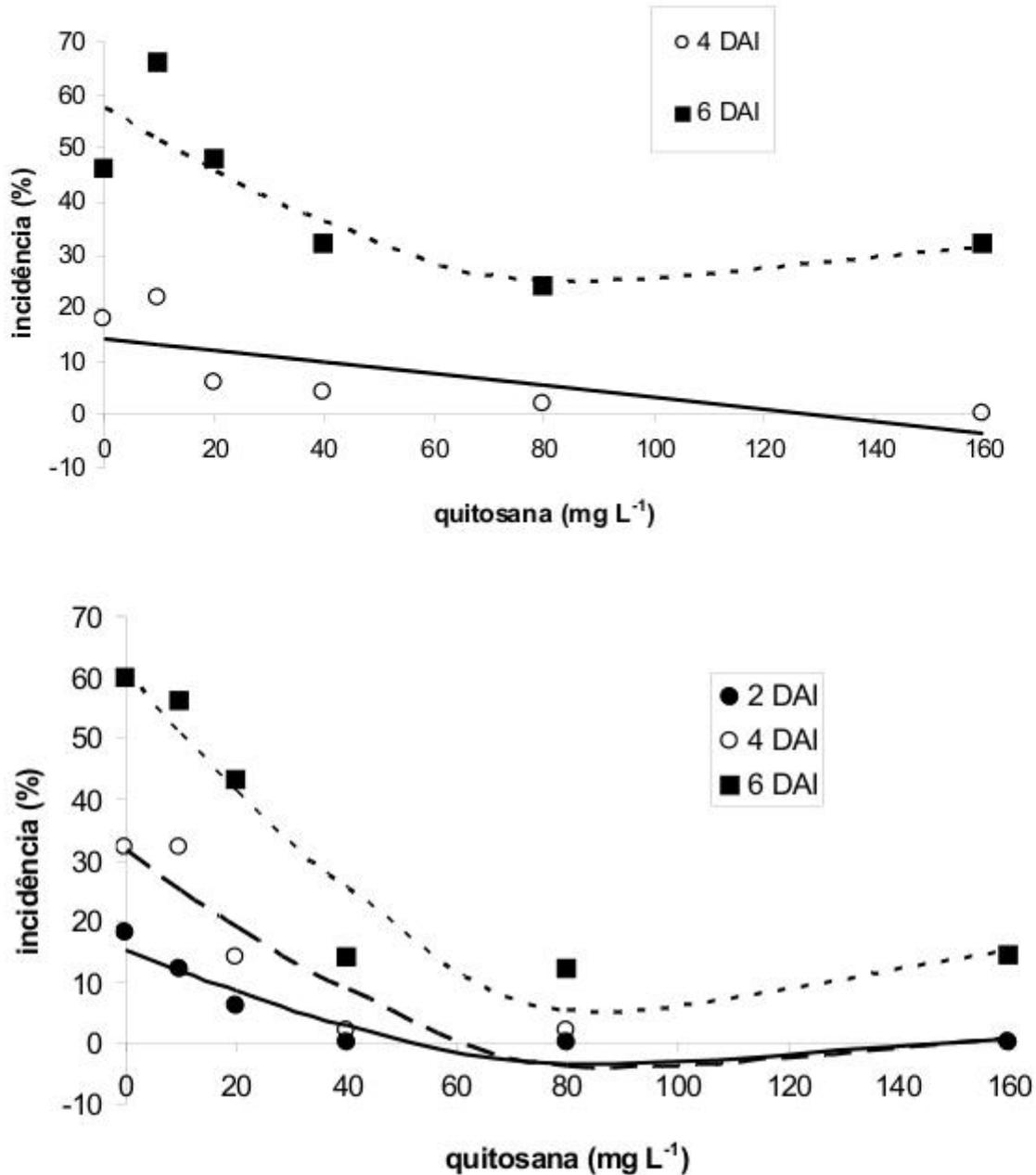


FIGURA 3 – Incidência (%) de podridões em frutos inoculados com o fungo *Penicillium* sp. e tratados com diferentes concentrações de quitosana em maçãs **A-**) cv. Princesa (4 DAI: $y= 14,4571-0,1121x$, $r^2=54,9\%^{**}$; 6 DAI: $y=57,6812 -0,6533x+0,0031x^2$, $r^2=67,5\%^*$) e **B-**) cv. Castela Gala (2 DAI: $y= 15,3562-0,3768x+0,0018x^2$, $r^2=87,8\%^{**}$; 4 DAI: $y=31,7375-0,6961x+0,0031x^2$, $r^2= 86,2\%^{**}$; 6 DAI: $y=61,3237-1,1055x+0,0051x^2$, $r^2=91,9\%^{**}$).

fungo, embora outros mecanismos possam estar envolvidos. Bashkara Reddy et al. (2000) reportaram resultados semelhantes quando realizaram aplicações de quitosana em morangos antes da inoculação artificial.

Pelos resultados apresentados, constatou-se que a quitosana apresentou efeito no controle de podridões pós-colheita em maçãs causadas por *Penicillium*, podendo ser uma boa alternativa para prevenção destas doenças em sistemas sustentáveis de produção, evitando-se assim os riscos inerentes do uso de agrotóxicos.

Conclusões

1. A quitosana na formulação testada neste experimento apresentou efeito fungistático sobre *Penicillium* sp. em teste *in vitro*.

2. Tratamentos pós-colheita com quitosana a partir da concentração de 40 mg L⁻¹ reduziram a incidência de podridões em maçãs 'Castel Gala' causadas pelo fungo *Penicillium* sp.

3. Não houve efeito da quitosana na severidade da doença em frutos infectados.

Referências bibliográficas

- ALFENAS, A.C.; MAFRA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV. 2007. 382p.
- AIT BARKA, E. et al. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Report**, Heidelberg, v.22, n.8, p.608-614, 2004.Ltd.
- AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments consequences for decay development. **Plant Pathology**, Hoboken, v.54, n.1, p.74–81, 2005.
- BAUTISTA-BANOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, Oxford, v.22, n.9, p.1087–1092, 2003.
- BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defense pathways. **Trends Plant Science**, v.7, p.233-240, 1996.
- BEN-SHALOM, N. et al.. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants

by means of chitosan. **Crop Protection**, v.22, n.2, p.285–290, 2003.

BHASKARA REDDY, M.V. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Oxford, v.20, n.1, p.39–51, 2000.

BRACKMANN, A. et al. Controle de podridão pós-colheita de *Penicillium* spp., em maçã 'Fuji' com fosfitos e fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.2, p.251-254, 2005.

COSTA, I.F.D.; VEIGA, P. Inibição do desenvolvimento de *Penicillium expansum* (Link) Thom. por fungicidas, *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.3, p. 357-360, 1996.

EL GHAOUTH, A. et al. 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**, Oxford, v.19, n.1, p.103-110, 2000.

OH, S.K. et al. Development of integrated pest management techniques using biomass for organic farming (I). Suppression of late blight and fusarium wilt of tomato by chitosan involving both antifungal and plant activating activities. **Korean Journal of Plant Pathology**, Swon, v.14, n.4, p.278–285, 1998.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. **Desinfecção da água e das câmaras frigoríficas para diminuição do inoculo de *Penicillium expansum***. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1991. 16p. (Boletim de Pesquisa)