

Eficácia do controle biológico de mofo cinzento em morangos produzidos em cultivo protegido

Paloma Souza Minuzzo¹, Rosa Maria Valdebenito Sanhueza², André Novais Spadoa³, Vinicius Adão Bartnicki⁴

¹ Graduanda em Agronomia, Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS).
E-mail: paloma.minuzzo.agro@outlook.com

² Engenheira Agrônoma Dra, Pesquisadora, Responsável Técnica de Laboratório, Centro de Pesquisa Proterra (CPPro).
E-mail: rosamaria@proterra.agr.br

³ Graduando em Agronomia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (Uergs).
E-mail: andrespadoagr@hotmail.com

⁴ Engenheiro Agrônomo, Colaborador no Centro de Pesquisa Proterra (CPPro).
E-mail: viniciusbartnicki@gmail.com

Submetido em: 29 set. 2019. Aceito: 04 mar. 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21674/2448-0479.62.120-125>

Resumo

A produção de morangos semi-hidropônicos protegidos é cada vez maior. *Botrytis cinerea* é o patógeno que mais causa danos nesse sistema. Devido a rápida e desuniforme maturação dos frutos é difícil manejar essa doença com fungicidas químicos. Outro patógeno importante na cultura é o *Rhizopus sp*, causador de grandes perdas de produção. O uso de biofungicidas vêm sendo uma alternativa para reduzir a contaminação do meio ambiente, manejar doenças resistentes aos fungicidas e controlar patógenos em cultivos orgânicos. As diferentes estirpes de *Bacillus sp*. apresentam diferentes modos de ação e, então diferentes resultados de controle. Porém, não existem muitos estudos sobre o efeito desses produtos sobre *B. cinerea*. Assim, os objetivos deste trabalho foram comparar duas estirpes de diferentes *Bacillus sp*. de biofungicidas em diferentes concentrações, para o controle de *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e a produção de frutos de morangueiro em sistema semi-hidropônico. Dois experimentos comparativos de *Bacillus subtilis* QST 713 (*B.s.*), produto comercial Serenade®, e *Bacillus amyloliquefaciens* D747 (*B.a.*), produto comercial Eco-shot®, foram comparados junto a aplicações de água. Os experimentos foram em cultivo semi-hidropônico protegido da empresa Italbraz Ltda, localizada em Vacaria-RS. Os resultados obtidos informaram que nas doses 0,8 kg/ha de *B.a.* e 1,6 L/ha de *B.s.*, o *B.a.* foi mais eficiente no controle de *B. cinerea*. Já nas doses de 1,0 kg/ha de *B.a.* e 2,0 L/ha de *B.s.*, somente *B.a.* controla *B. cinerea*. Os produtos *B.a.* e *B.s.* não controlam *R. stolonifer* e não afetam a produção de morangos.

Palavras-chave: *Bacillus*. *Botrytis cinerea*. Cultivo protegido. Morango.

Abstract

Efficacy of biological control of gray mould in strawberries produced in protected environment

The production of protected semi-hydroponic strawberries is increasing. *Botrytis cinerea* is the pathogen that causes the most damage to this system. Due to the rapid and uneven fruit ripening it is difficult to manage this disease with chemical fungicides. And another pathogen also important in culture is *Rhizopus sp*, which causes large yield losses. The use of biofungicides has been an alternative to reduce environmental contamination, manage fungicide resistant diseases and control pathogens in organic crops. The different strains of *Bacillus sp*. present different modes of action and then different control results. However, there are not many studies on the effect of these products on *B. cinerea*. Thus, the objectives of this work were to compare two strains of different *Bacillus sp*. of biofungicides at different concentrations for the control of *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and strawberry fruit production in semi-hydroponic system. Two comparative

experiments of *Bacillus subtilis* QST 713 (B.s.), (Serenade® commercial product), and *Bacillus amyloliquefaciens* D747 (B.a.), (Eco-shot® commercial product), were compared with water applications. The tests were in semi-hydroponic protected cultivation of the company Italbraz Ltda, located in Vacaria-RS. The results show that at doses 0.8 kg/ha of B.a. and 1.6 L/ha of B.s., B.a. It is more efficient in controlling *B. cinerea*. Already at doses of 1.0 kg/ha B.a. and 2.0 L/ha of B.s., only B.a. controls *B. cinerea*. B.a. and B.s. do not control *R. stolonifer* and do not affect strawberry production.

Key words: *Bacillus*. *Botrytis cinerea*. Protected cultivation. Strawberry.

Introdução

O morangueiro é cultivado principalmente em sistema semi-hidropônico. Esse sistema é realizado em ambiente protegido e o plantio é realizado em embalagens (slabs) com substratos de origem vegetal, os quais são colocados em prateleiras e as plantas são conduzidas com fertirrigação. Este sistema possibilita ao produtor obter maior produtividade.

A cultura do morangueiro está sujeita a diversas moléstias causadas por agentes fitopatogênicos, dentre os quais se destaca o *Botrytis cinerea*, causador do Mofo Cinzento, responsável por perdas expressivas em todos os cultivos protegidos (YU; SUTTON, 1997). Os sintomas da podridão de frutos abrangem manchas de aspecto encharcado, deprimidas e descoloridas, que crescem rapidamente. Os frutos infectados em pré ou em pós-colheita tornam-se moles, aquosos e de coloração marrom clara. Ao apodrecerem os tecidos, a epiderme se rompe e sobre ela se desenvolvem as estruturas do fungo. Em condições de campo, o patógeno se desenvolve nos restos culturais e a partir destes iniciam a infecção e colonização dos tecidos verdes por ocasião de condições favoráveis.

Outro patógeno importante na cultura é o *Rhizopus sp*, agente causal da podridão mole. Os principais sintomas dessa doença são os frutos maduros apresentarem um aspecto aquoso, e comumente não surge em frutos imaturos, o que faz com que dificilmente sejam observados à campo (REZENDE; FANCELLI, 1997). Essa podridão pode se disseminar rapidamente através do suco do frutos, que escorre dos infectados para os sadios dentro das embalagens. Os frutos atacados apresentam alterações na cor e na consistência e, após um período de infecção, verifica-se sobre estes um crescimento micelial denso e branco, com presença de esporângios e esporangióforos escuros (TANAKA et al., 1997).

O controle de patógenos no cultivo de morangueiro é feito com uso de práticas culturais, nas quais se inclui o uso de mudas sadias, eliminação frequente de folhas e outros tecidos lesionados, adubação equilibrada e o complemento com a proteção química ou biológica. A preocupação com resíduos químicos nas frutas e a seleção de patógenos resistentes aos fungicidas recomendados estimulou o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de *B. cinerea* nos pequenos frutos, entre os quais se inclui o controle biológico. Antagonistas eficientes como o fungo *Clonostachys rosea* (PENG et al., 1992) e espécies de *Bacillus*, têm seus modos de ação associados principalmente à produção de quitinase, como é o caso de *Bacillus cereus*, e também de antibióticos e/ou indução de resistência que ocorre por outros antagonistas.

A eficiência de controle de *B. cinerea* por *Bacillus subtilis* QST 713 no morangueiro pode variar, dependendo do isolado utilizado. Helbig e Bochow (2001) obtiveram 16 a 40% de controle do Mofo Cinzento com o isolado 25021 de *B. subtilis* QST 713, enquanto que Huang et al. (2001) verificaram controle superior a 70% quando foi utilizado o isolado S1-0210. Avaliações de *B. subtilis* QST 713 (Serenade®) foram relatadas por Valdebenito Sanhueza et al. (2008) e mostraram que, em morangueiros em túneis baixos, *B. cinerea* pode ser controlado pela pulverização semanal a partir do início da floração com calda, contendo 8 mL/L do produto comercial. Nessa condição, o fungicida iprodione controlou o patógeno em 87% e o *B. subtilis* QST 713, em 77%. O antagonismo e a ação de diferentes estirpes de *B. amyloliquefaciens* D 747 a diversos patógenos de fruteiras (*Monilinia fructicola*, *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*) são associados a produção de vários lipopeptídios, competição por nutrientes e por espaço. Estirpes dessas espécies também são promotores de crescimento das plantas (MARI et al. 1996; YAN et al. 2013; HAIDAR et al. 2016).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho visou comparar a eficácia de *B. amyloliquefaciens* (D 747) e *Bacillus subtilis* (QST 713) para o controle de *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e a produção de frutos em morangueiros da cv. Pircinque cultivados em sistema semi-hidropônico. Esse estudo tem como base o fato de que cada estirpe diferente de *Bacillus* pode apresentar diferentes modos de ação no controle biológico e, conseqüentemente, diferentes resultados de controle, além de que não se encontram trabalhos que comparem o controle biológico com *B. subtilis* QST 713 e *Bacillus amyloliquefaciens* D747.

Material e Métodos

Os ensaios foram estabelecidos em ambiente protegido de morangos semi-hidropônicos com plantas de segundo ano da cv. Pircinque, 40 dias após o rebrote, na empresa Italbraz Ltda., em outubro de 2017 (Figura 1). Os experimentos foram realizados em duplicata e tiveram delineamento de blocos casualizados, com seis blocos, sendo cada parcela constituída por quatro 'slabs' contendo oito plantas cada. Em ambos os experimentos, antes do início da pulverização, foram retirados todos os frutos em ponto de colheita presentes nas parcelas, tratando-se somente flores sem sintomas, frutos recém formados e as outras partes das plantas. Além disso, no início de cada experimento as plantas foram limpas através da retirada de folhas secas, estolões e flores doentes.

Os dois experimentos foram realizados com as mesmas parcelas de plantas, variando apenas as doses e época de aplicação.

Experimento 1

Os tratamentos constaram de pulverizações de plantas em início de floração. Os tratamentos foram: *B. amyloliquefaciens* D747, na concentração de 1 g/L ($5,0 \times 10^7$ UFC/L); *Bacillus subtilis* QST 713, na concentração de 2 mL/L ($2,0 \times 10^6$ UFC/L); e a testemunha, com pulverização de água.

As datas das pulverizações foram 19/10, 26/10, 01/11, 08/11, 14/11, 21/11 e 01/12/2017.

Experimento 2

As mesmas parcelas do experimento 1 foram usadas no experimento 2, porém em período diferente. Os tratamentos constaram de: *B. amyloliquefaciens* D747 na dose de 1,2 g/L (6×10^7 UFC/L); *B. subtilis* QST 713, na dose de 2,4 mL/L ($2,4 \times 10^6$ UFC/L); e a testemunha, com pulverização de água. As plantas foram pulverizadas nos dias 6/12, 11/12, 15/12 e 22/12/2017.

As pulverizações foram feitas através de aspersão com pulverizador manual, pulverizando completamente a parte aérea das plantas com 3 L de calda nos seis blocos, no intervalos de 5 a 7 dias.

Para a avaliação dos morangos, foram realizadas colheitas nos dias 8, 16 e 24 de novembro, e dia 6 de dezembro no primeiro ensaio; nos dias 18 e 26 de dezembro, no segundo experimento. Os frutos foram colhidos, pesados e colocados em embalagens compartimentadas, sendo mantidos durante 48h em temperatura de 20°C , $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após esse período, foi realizada a avaliação através da porcentagem de frutos sadios e com podridões, sendo identificadas as podridões de maneira visual, com auxílio de microscopia e isolamento dos patógenos em meio de cultura.

Para a análise, acumularam-se os dados de cada unidade experimental nas diferentes datas de colheita. Os dados em porcentagem foram transformados para arco seno \sqrt{x} . Os dados de produção foi por \sqrt{x} , visando atender os pressupostos da análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) usando-se o programa SASM - Agri (CANTERI *et al.*, 2001).



Fonte: Autores (2017).

Figura 1.

Estufa utilizada para a avaliação de espécies de *Bacillus* para o controle de *Botrytis cinerea*, em morangueiros cv. Pircinque, sob sistema semi-hidropônico.

Resultados e Discussões

Em condições de laboratório, *B. amyloliquefaciens* D747 e *B. subtilis* QST 713 diminuem o crescimento do fungo fitopatogênico *B. cinerea* em concentrações de 10^4 a 10^6 UFC/mL. A maior porcentagem de controle ocorre com o uso de *B. subtilis* QST 713 (SHTERNSHIS et al., 2015), o que se repete com a análise dos resultados obtidos no presente trabalho.

Nos dois experimentos a presença de Mofo Cinzento, causada por *B. cinerea*, e de Podridão Mole, causada por *Rhizopus stolonifer*, foram verificadas. A observação deste último patógeno e a possível dificuldade do seu controle podem ter sido ocasionados devido as plantas utilizadas no experimento serem de segundo ano e, neste caso, os patógenos já poderiam estar estabelecidos nos tecidos da planta antes do início das aplicações.

Na maioria das plantas, a indução da defesa contra doenças e o aumento da imunidade é promovido por *B. amyloliquefaciens* QST 713. No caso da soja, *B. amyloliquefaciens* aumenta a resistência sistêmica de plantas às bactérias causadoras de doenças, e na alface reduz a gravidade da doença causadora de podridão de folha (SIEMERING et al., 2016).

Assim, o uso de *Bacillus* no cultivo de morangueiro pode ativar o sistema de defesa natural das plantas e, dessa forma, reduzir as perdas por podridões de frutos.

Experimento 1

No período deste experimento houveram frequentes registros de temperaturas acima de 20°C e baixa pluviosidade e, por isto, a testemunha apresentou incidência relativamente baixa (24,2%), após 48h de vida de prateleira. Os dados acumulados de todas as datas de colheita (Tabela 1) mostraram que a podridão dos morangos por *B. cinerea* diminuiu em 23,5% pelo efeito da pulverização de *B. amyloliquefaciens* D747, com a dose de 1,0 g/L (0,8 kg/ha). Entretanto, nas parcelas tratadas com *Bacillus subtilis* QST 713 2,0 mL/L (1,6L/ha) a cada 7 dias, a incidência do Mofo Cinzento não apresentou diferença da testemunha (Tabela 1). No período da avaliação, a incidência do Mofo Cinzento foi variável, sendo maior somente na quarta colheita.

A produção de morangos e seu peso médio foi igual estatisticamente nos tratamentos (*B. amyloliquefaciens*: 921,1 g; *B. subtilis*: 1121,8 g; e, testemunha: 1099,4 g/parcela).

Experimento 2

Nesse experimento, a floração foi em menor quantidade que no experimento 1.

As condições para ocorrência do Mofo Cinzento foram mais propícias, pois foi constatado 14,54% a mais na testemunha deste do que no experimento 1 (Tabela 1). Mas, mesmo nestas condições, o aumento da dose dos dois *Bacillus* aumentou a porcentagem de controle exercido pelos mesmos comparados ao experimento 1. Assim, neste experimento, o controle exercido pelo *B. amyloliquefaciens* D747 foi de 53,3% e pelo *B. subtilis* QST 713 foi de 40%.

A incidência do Mofo Cinzento nas plantas tratadas com *B. amyloliquefaciens* D747 foi menor que a ocorrida na testemunha, enquanto o *B. subtilis* QST 713 teve um efeito intermediário entre o *B. amyloliquefaciens* D747 e a testemunha.

A incidência da Podridão Mole (*R. stolonifer*) foi 14% maior neste período, porém não foi detectada redução dos danos pelos biofungicidas (Tabela 1). Não houve efeito dos tratamentos na produção total dos morangueiros (*B. amyloliquefaciens* D747: 308,6 g; *B. subtilis* QST 713: 253,2 g; e testemunha: 387 g/parcela).

O maior controle exercido pelo *B. amyloliquefaciens* D747 sobre *B. cinerea* em morangos pode ser devido a uma característica própria da estirpe, como uma maior adaptação nas condições do ambiente do sistema de produção de morango semi-hidropônico (HAMDACHE et al. 2012), ou a maior concentração de UFC de *B. amyloliquefaciens* D747 (5×10^{10}) que o *B. subtilis* QST 713 (1×10^9) do microorganismo no produto comercial utilizado.

Em um experimento realizado por Remuska e Pria (2007), verificou-se que o uso de *Bacillus thuringiensis* controla o crescimento de colônias de *Sclerotium rolfii*, *Monilinia fructicola*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* e também, no caso deste último patógeno, ele não permite que o fungo forme estruturas de resistência (escleródios). Dessa forma, é possível assumir que o uso de *Bacillus sp.* terá potencial para o controle de diferentes fitopatógenos associados às podridões de frutos.

A aplicação de agentes biológicos em frutos de morangueiro através de aspersão ou imersão com solução antes e durante o armazenamento é um método mais eficiente que quando aplicado antes da colheita (HERNANDEZ et al. 2019). Entretanto, este método deverá ser avaliado ainda nos morangos.

Tabela 1 - Incidência e controle (%) das podridões de morangos tratados por aspersão com *Bacillus subtilis* QST 713 (B.s.) e *Bacillus amyloliquefasciens* D747 (B.a.) durante o período de outubro a dezembro de 2017 (Experimentos 1 e 2).

Tratamentos	Botrytis		Rhizopus	
	Incidência (%)	Controle (%)	Incidência (%)	Controle (%)
Experimento 1				
B.a. 1,0 g/L	18,05 b ¹	23,55	2,7 a	40,0
B.s. 2,0 mL/L	23,40 a	3,31	5,2 a	0,0
Testemunha	24,20 a	-	4,5 a	-
CV (%)	6,77	-	21,71	-
Experimento 2				
B.a. 1,2 g/L	18,19 a	53,29	17,91 NS	-
B.s. 2,4 mL/L	23,34 ab	40,06	22,12	-
Testemunha	38,94 b	-	18,45	-
CV (%)	26,8	-	22,54	-

¹Médias de 6 repetições, cada uma constituída por 32 plantas. Dados seguidos pela mesma letra na linha, dentro do mesmo experimento, não diferem entre si. Médias comparadas pelo teste Tukey, ($p < 0,05$). NS: Não significativo. Fonte: Autores (2019).

Considerações Finais

A estirpe *Bacillus amyloliquefasciens* D747 é mais eficaz na dose de 1,0 g/L que *Bacillus subtilis* QST 713 na dose de 2,0 mL/L no controle de *Botrytis cinerea* em morangos da cv. Pircinque, cultivados em sistema semi-hidropônico.

O aumento da dose de *Bacillus amyloliquefasciens* D747 reduz a incidência de *Botrytis cinerea* comparado à testemunha.

Os biofungicidas das estirpes *Bacillus subtilis* QST 713 e *Bacillus amyloliquefasciens* D747 não controlam a podridão por *Rhizopus*, nem afetam a produção de morangos em sistema semi-hidropônico.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da empresa Proterra Engenharia Agrônômica Ltda. e da empresa Italbraz Ltda.

Referências

- CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.
- CARMONA-HERNANDEZ, S.; REYES-PÉREZ, J. J.; CHIQUITO-CONTRERAS, R. G.; RINCON-ENRIQUEZ, G.; CERDAN-CABRERA, C. R.; HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. Biocontrole de doenças fúngicas pós-colheita de frutas Antagonistas bacterianos: uma revisão. **Agronomy**, v.9, 2019.
- Haidar, R., FERMAUD, M., CALVO-GARRIDO, C., ROUDET, J., DESCHAMPS, A. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. **Phytopathologia Mediterranea** v.55, n.3, p.301 – 322, 2016.
- HAMDACHE, A., EZZIYANI, M., BADOUC LAMARTI, Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefasciens* isolates. **African Journal of Biotechnology** v.11, p. 2210-2217, 2012.
- HELBIG, J.; BOCHOW, H. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawberry. **Plant disease and protection**, v.108, n.6, p. 445-559, 2001.
- HUANG, C.J.; WANG, T.K.; CHUNG, S.C.; CHEN, C.Y. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. **Biochemistry and molecular biology**, v.38, n. 1, p.82-88, 2005.

- MARI, M., BRUNELLI, M., FOLCHI, A. Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**. v.15, n. 8, p. 699-705, 1996.
- PENG, G.; SUTTON, J.C.; KEVAN, P.G. Effectiveness of honeybees for applying the biocontrol agent *Clonostachys rosea* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of plant pathology**, v.14, p. 114-119, 1992.
- REMUSKA, A. C.; DALLA PRIA, M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatógenos. **UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, v.13, n. 3, p. 31-36, 2007.
- REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres. 1997. v.486-496.
- SHTERNISH, M. V.; BELYAEV, A. A.; SHPATOVA, T. V.; LELYAK, A. A. Influence of *Bacillus* spp. on Strawberry Gray – Mold Causing Agent and Host Plant Resistance to Disease. **Contemporary Problems of Ecology**, v.8, p.390-396, 2015.
- SIEMERING, G.; RUARK, M.; GEVENS, A. The value of *Bacillus amyloliquefaciens* for crop production. **University of Wisconsin-Extension**, 2016.
- TANAKA, M. A. S.; BETTI, J. A.; KIMATI, H. Doenças em Morangueiro. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. p. 556- 571.
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; PIT, B.; SPOLTI, P. Controle de podridões de maçãs e de morangos com *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* no Rio Grande do Sul, **Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**. 2008.
- LI-RONG HAN, YUANYUAN ZHANG, XUECHI FU, XINYI CHEN, LIXIA ZHANG, RUHONG MEI, QI WANG. Biological Control of Apple Ring Rot on Fruit by *Bacillus amyloliquefaciens* 9001. **Plant Pathol J**. v.29, p.168–173, 2013.
- YU, H.; SUTTON, J.C. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.19, p.237-336, 1997.