

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE EM PÓS-COLHEITA DE BOLOR VERDE EM LARANJA
PÊRA COM MICRORGANISMOS E TRATAMENTO TÉRMICO**

CASSIANO FORNER

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE EM PÓS-COLHEITA DE BOLOR VERDE EM LARANJA
PÊRA COM MICRORGANISMOS E TRATAMENTO TÉRMICO**

CASSIANO FORNER

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Fevereiro– 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F727c Forner, Cassiano, 1985-
Controle em pós-colheita de bolor verde em laranja pêra com microrganismos e tratamento térmico / Cassiano Forner.
- Botucatu : [s.n.], 2012
xi, 58 f. : il., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012

Orientador: Wagner Bettiol
Inclui bibliografia

1. Cítricos - Doenças e pragas - Controle. 2. Laranja - Doenças e pragas - Controle. 3. Mofo (Botânica) - Controle. 4. Pragas agrícolas - Controle biológico.
I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CONTROLE EM PÓS-COLHEITA DE BOLOR VERDE EM LARANJA
PÊRA COM MICRORGANISMOS E TRATAMENTO TÈRMICO"

ALUNO: CASSIANO FORNER

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER BETTIOL

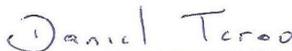
APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. WAGNER BETTIOL



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



DR. DANIEL TERAO

Data da Realização: 24 de Fevereiro de 2012.

DEDICO

Aos meus pais Luiz Forner e Marisa Pavan Forner, pela confiança, apoio e incentivo em todos os momentos.

À minha irmã Talita Forner, pelos momentos de alegria e companheirismo que passamos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força em todos os momentos desta conquista.

Ao Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, paciência, momentos de descontração e partilha de conhecimento oferecido ao longo do estágio e do mestrado.

Ao orientador de graduação Dr. Idalmir dos Santos, por auxiliar e estimular a realização do mestrado.

Aos amigos Alex Marcelo Menegazzo, Max William Pellegrini e Alan Roger Badin, pelos conselhos, força e momentos de descontração.

Agradeço aos meus avós: Armindo, Miraci, Catarina, Raimundo (*in memoriam*), tios: Nilza, Guido, Nelvi, Amarildo, Rosane, Teresinha, Maximino, Alécio, Aclécio, Renata, Carlos, Benildo, Soeli, Jurema, Moacir, Marcílio, Luiza, Claudete, Nilton, Loidir, Nair, Junice, Domingos, Décia, Alcides; Primos: Max, Lucas, Daniel, Bruna, Eduardo, Igor, Rodrigo, Amanda, Gabriela, Gustavo, Maristela, Roni, Talise Mírian, Leuri, Patrícia, Fernando, Sandro, Samuel, Adriane, Renan, Tiago, Alesane, Camila, Nicholas, Erick, Anthony, Henrique, Gabriela, Nathalia, Alan, Derli, Marisa, André e Ana Alice, pelo apoio em seguir em frente.

À UNESP/FCA, por permitir a realização do curso.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Meio Ambiente, por disponibilizar a infraestrutura na condução dos experimentos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas: Antonio Carlos Maringoni, Edson Luis Furtado, Silvia Renata Siciliano Wilcken, Carlos Gilberto Raetano, Renate Krause Sakate, Marcelo Agenor Pavan, Carlos Frederico Wilcken, Adriana Zanin Kronka, Raquel Ghini e Wagner Bettiol, pelo aprendizado e estímulo.

Aos amigos de convívio, em especial, Regiane Iost (Figura), Michelli de Souza Santos (Indinha), José Abrahão Haddad Galvão, Zayame Vegette Pinto, Alexandre Visconti, Rodrigo Estevam de Oliveira Mac Leod, Carlos Eduardo Oliveira da Silva, Juliano César Silva, Muricy Moraes, Raquel Temperani, Leonardo José da Silva, Daniel Hinz, Fernanda Ribeiro de Andrade Oliveira, Vanessa Nessner Kavamura, Leandro Tomio, Maria Fernanda Nobre, Daniel Silveira, Andiale Pinto dos Santos, Luciana Ávila, Juliana Ferrari de

Almeida Nogueira, Luana Piermann, Luiz Alexandre Sereda, Suikinai Nobre Santos, Lúcio Bertoldo Costa, Jaime Pieroni Júnior, Livia Mendes, Maria Augusta de Camargo Ferraz, Fábio Luiz Soares Júnior, Natália Carvalhaes de Oliveira, Osvaldo Luis Ferreira Júnior, Elinalva Maciel Paulo, Liliana Patrícia Vital de Mattos, Elida Barbosa Corrêa, Rodrigo e Natália Taketani, Danielle Cardoso, Gabriela Grangueli Gonçalves, Vínicius Carneiro, Regiane Medice, Rafael Eduardo Silva, Wallace Rafael de Souza, Jussara, Vanessa Bernardes, Thaís Benassi, Miriam Fumiko Fujinawa, Jéssica Oliveira, Mirian Lobo Sáber, Giulia Almeida Veiga Milan, Carla Aragão Almeida, Fabiana Perniconi de Souza, Laura Umbelina Santi, Thiago Teixeira Julião, Andressa Brida, Patrícia Leite, Marcelo Soman, Lucivane Gonçalves, Adriana Terumi Itako, Thiago Luis Martins Fanela, Paula Leite dos Santos, Luiz Eduardo da Rocha Pannuti, Tatiane Mituti, Felipe Renzi, Bernardo Tomchinsky, Diogo Sayama, Hiro Cheng, Fifi, Jaqueline, Rafael Ferraz, Pedro Spada Breno Gomes, Anderson, Adriano Ferraz, a todos os colegas de graduação em Agronomia da UTFPR, em especial Benhur Azzolini, Maicon Lucini, Lucas Cieslik, Anderson Signorini, Giovani Dinon, Josemar Nesi, Rafael Talheimer, Luis Carlos Plucinski Filho, Renan Mosquen, Felipe Grisa, Emerson Trogello, Tacyani Cristina, Eduardo Pagliosa e Laurês Cieslik, amigos de Marmeleiro, Francisco Beltrão e Pato Branco.

Aos pesquisadores do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Lenice Magali do Nascimento e Fernando Azevedo.

Aos estagiários e técnicos do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” e amigos da cidade de Araras: Luriany Pompeo Ferraz, Jaqueline Moreira, Fernanda Conceição Oliveira, Mônica Cristina Risso de Brito, Paulo Cilas Nascimento de Brito, Gabriel Giovanni, Aline Caroline da Silva, Valéria Xavier Paula Garcia, Danilo Eduardo Cursi, Ronald Otto, Ricardo Molinari, Rafael Dreux, Thomaz, Gustavo Pinto, Eduardo Andrade, Diego Collato, Marco Aurélio Bonin Favero, Renato Primon Freitas, Bruno Milan e Cebo.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental: João Luiz da Silva, Rosely dos Santos Nascimento, Elke Dias Simone Vilela, Márcia Maria Parma, Anamaria Ferreira Mayer Dentzien e Tatiana Alvez Rigamonte Fernandes, pela ajuda.

Aos pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, em especial à Dra. Raquel Ghini e Dr. Daniel Terao, pela ajuda.

Aos companheiros de treino de Muay thai, do grupo Muzenza de capoeira e da Equipe Conexão Jiu-Jitsu, Mestre Cristiano Cecon, o Mestre Marcelo Silva, Alex Marcelo Menegazzo (Banana), Jair Gomes da Rosa (Negão), Deividly Gardel (Amendoim), Volnei Felipeto (Presuntinho), Tiago Leopoldo (Mandíbula), Arthur Menegazzo e Anderson Henrique Pacheco (*in memoriam*) que ajudaram a superar os problemas e apoiaram em toda a caminhada do curso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Controle de <i>Penicillium digitatum</i> em pós-colheita.....	9
2.2. Controle biológico em pós-colheita	11
2.3. <i>Bacillus</i> sp. como agente de biocontrole em pós-colheita.....	15
2.4. Associação de métodos no controle de doenças em pós-colheita de frutos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Controle de <i>Penicillium digitatum</i> com agentes de biocontrole e tratamento térmico seguido de armazenamento a temperatura de 10°C	20
3.2. Avaliação da qualidade dos frutos	21
3.3. Controle de <i>Penicillium digitatum</i> com agentes de biocontrole e tratamento térmico em armazenamento a temperatura de 20°C	22
3.4. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Controle de <i>Penicillium digitatum</i> em pós-colheita de frutos de laranja com agentes de biocontrole e tratamento térmico seguido de armazenamento a temperatura de 10°C	24
4.2. Incidência natural de doenças em pós-colheita de laranjas Pêra após tratamento térmico e com agentes de biocontrole	26
4.3. Análises físico-químicas dos frutos	27
4.3.1. Acidez titulável.....	27
4.3.2. Sólidos solúveis totais (°Brix)	28
4.3.3. Ratio e rendimento de suco	29
4.3.4. Firmeza da polpa.....	31
4.3.5. Perda de peso.....	33

4.4. Controle de <i>Penicillium digitatum</i> com agentes de biocontrole e tratamento térmico em armazenamento a temperatura de 20 °C	38
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum*, em laranja Pêra. Primeira repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C..... 25
- Tabela 2. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Segunda repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C. 25
- Tabela 3. Incidência natural de podridões de pós-colheita em laranjas Pêra submetidas ao tratamento térmico associado a agentes de biocontrole. Primeira repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C..... 26
- Tabela 4. Incidência natural de podridões de pós-colheita em laranjas Pêra submetidas ao tratamento térmico associado a agentes de biocontrole. Segunda repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C..... 27
- Tabela 5. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na acidez dos frutos de laranja Pêra. Primeiro experimento..... 28
- Tabela 6. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na acidez dos frutos de laranja Pêra. Segundo experimento..... 28
- Tabela 7. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole nos sólidos solúveis totais dos frutos de laranjas Pêra. Primeiro experimento..... 29
- Tabela 8. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no sólidos solúveis totais dos frutos de laranjas Pêra. Segundo experimento..... 29
- Tabela 9. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no Ratio dos frutos de laranjas Pêra. Primeiro experimento. 30
- Tabela 10. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no Ratio dos frutos de laranjas Pêra. Segundo experimento. 30

Tabela 11. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no rendimento de suco dos frutos de laranjas Pêra. Primeiro experimento.	31
Tabela 12. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no rendimento de suco dos frutos de laranjas Pêra. Segundo experimento.	31
Tabela 13. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na firmeza da polpa de frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento.	32
Tabela 14. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na firmeza da polpa de frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.	32
Tabela 15. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na perda de peso dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.	33
Tabela 16. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor L* dos frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento.	34
Tabela 17. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor L* dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.	34
Tabela 18. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor C* dos frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento.	35
Tabela 19. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor C* dos frutos de laranja Pêra. Segundo experimento (14 dias de armazenamento).....	36
Tabela 20. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor C* dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento. (28 dias de armazenamento).	36
Tabela 21. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor h° dos frutos de laranja Pêra. Primeiro experimento (14 dias de armazenamento).....	37
Tabela 22. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor h° dos frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento (28 dias de armazenamento).	37
Tabela 23. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor h° dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.	38

Tabela 24. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Primeiro experimento. 39

Tabela 25. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Segundo experimento. 39

Tabela 26. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole (tratados após o resfriamento dos frutos), sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Primeiro experimento. 40

Tabela 27. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole (tratados após o resfriamento dos frutos), sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Segundo experimento. 41

CONTROLE EM PÓS-COLHEITA DE BOLOR VERDE EM LARANJA PÊRA COM MICRORGANISMOS E TRATAMENTO TÉRMICO. Botucatu, 2012. 58p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Autor: CASSIANO FORNER

Orientador: Wagner Bettiol

RESUMO

O bolor verde, causado por *Penicillium digitatum*, é a principal doença em pós-colheita dos citros, responsável por grandes perdas no transporte, armazenamento e comercialização. Devido às exigências do mercado consumidor por alimentos sem a presença de resíduos de agrotóxicos, há necessidade de desenvolver tecnologias para atender a essa demanda. Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar o controle do bolor verde, em laranjas Pêra, com agentes de biocontrole (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Sporidiobolus pararoseus*), associados ou não ao tratamento térmico. Os frutos submetidos a esses tratamentos foram armazenados, por 28 dias, em temperatura de 10 °C e UR 90%±5 ou por oito dias a 20 °C e UR 90%±5. As avaliações foram iniciadas quatro dias após a inoculação do patógeno, pela medição do diâmetro das lesões nos pontos de inoculação do patógeno. As medições foram realizadas diariamente, por sete dias, quando os frutos foram armazenados a 10 °C, ou por cinco dias quando armazenados a 20 °C. Após a avaliação foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e com esses dados realizadas as análises estatísticas para comparação de médias. As análises de qualidade dos frutos (acidez titulável, sólidos solúveis, ratio, rendimento de suco, firmeza da polpa, coloração da casca e perda de peso), além da incidência natural de doenças em pós-colheita dos frutos armazenados a 10° C, foram avaliadas após 14 e 28 dias. De um modo geral, o tratamento térmico reduziu a AACPD nos frutos. Por outro lado, os agentes de biocontrole não controlaram a doença, mostrando que os organismos testados não apresentaram atividade curativa contra o bolor verde. O tratamento

térmico também reduziu a incidência natural de doenças em pós-colheita de laranja Pêra, em um dos ensaios. De maneira geral, os agentes de biocontrole e o tratamento térmico não alteraram a qualidade dos frutos.

Palavras-chaves: Bolor verde; controle biológico; controle físico, citros.

POSTHARVEST CONTROL OF GREEN MOLD IN PÊRA ORANGE WITH MICROORGANISMS AND HEAT TREATMENT. Botucatu, 2012. 58p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Author: CASSIANO FORNER

Adviser: Wagner Bettiol

SUMMARY

The green mold, caused by *Penicillium digitatum*, is the main disease in postharvest of citrus, responsible for major losses during transportation, storage and marketing. Due to the demands of the consumer market for food without the presence of pesticide residues, there is a need to develop technologies to meet this demand. Thus, the study focused on evaluating the control of green mold in Pêra oranges with biocontrol agents (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Sporidiobolus pararoseus*), associated or not with heat treatment. Fruits submitted to these treatments were stored for twenty eight days at temperature of 10 °C and RH 90%±5 or for eight day at 20 °C and 90%±5. Assessments were initiated four days after pathogen inoculation, by measuring the diameter of the lesions in sections of pathogen inoculation. Measurements were performed daily, for seven days, when fruits were stored at 10 °C, or five days when stored at 20 °C. After the assessment, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated and, with these data, statistical analyzes to means comparison were performed. The analysis of fruit quality (acidity, soluble solids, ratio, juice, pulp firmness, peel color and weight loss), besides the natural incidence of disease in postharvest fruit stored at 10 °C, were assessed after fourteen and twenty eight days. In general, the heat treatment reduced the AUDPC in the fruit. In general, biocontrol agents did not control the disease, showing that the organisms tested did not present curative activity against the green mold. The heat treatment also reduced the incidence of natural postharvest disease in Pêra oranges,

in one trial. In general, the biocontrol agents and heat treatment did not change the fruit quality.

Keywords: Green mold; biological control; physical control; citrus.

1. INTRODUÇÃO

A laranja é uma importante cultura para o Brasil, principalmente para o estado de São Paulo, maior produtor do país, sendo que parte da produção é destinada ao consumo *in natura*. Durante todas as fases de cultivo, até a chegada do fruto ao consumidor, diversas doenças podem causar perdas. Em especial, as doenças em pós-colheita são responsáveis por perdas durante o transporte, beneficiamento e armazenamento. Essas perdas devem ser evitadas ao máximo, pois foram vencidos todos os desafios de produção.

Doenças em pós-colheita podem provocar até 50% de perdas (LADANIYA, 2008), além de reduzirem a quantidade de frutos comerciáveis, afetam a qualidade dos frutos. Os bolores são as principais doenças de pós-colheita dos citros, em particular o bolor verde, causado por *Penicillium digitatum* que é um frequente patógeno de pós-colheita de citros no Brasil (FEICHTENBERGER et al., 2005) e considerado o principal patógeno em pós-colheita de citros (LARANJEIRA et al., 2005). O patógeno inicia a infecção por meio de ferimentos dos frutos e rapidamente causa sintomas de podridão mole, destruindo o fruto em poucos dias.

O controle do bolor verde é basicamente realizado pela utilização de fungicidas, porém a exigência dos consumidores por produtos livres de resíduos de pesticidas, aliada a ocorrência de resistência de *P. digitatum* aos fungicidas recomendados, estimula o desenvolvimento de outros métodos de controle da doença.

Dentre as alternativas, pode-se lançar mão de métodos físicos, como o tratamento térmico, e métodos biológicos. No entanto, para aumentar a eficiência de ambos os métodos de controle, é possível a aplicação da associação de métodos de controle. Como exemplo, a integração do tratamento com água quente e agentes de biocontrole.

O emprego do tratamento térmico em pós-colheita, não necessita de produtos químicos, pode inibir diretamente o patógeno ou mesmo ativar a resistência dos frutos. Por sua vez, os agentes de biocontrole podem ser eficientes no controle de doenças em pós-colheita, por serem inseridos em condições controladas que favorecem seu desenvolvimento e ocupação dos sítios de infecção. Em especial, o gênero *Bacillus* leva vantagem por formar endósporos que favorecem sua sobrevivência, além de facilitar a manipulação, formulação, bem como suportar relativamente longos períodos de armazenamento mantendo sua eficiência. Estas são características desejáveis para agentes de biocontrole. Ambos os métodos, se eficientes, permitem alcançar o desejado zero de resíduos nos alimentos.

O objetivo do estudo foi analisar os efeitos da associação de tratamento físico (tratamento térmico por imersão em água quente) e biológico, com *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Sporidiobolus pararoseus*, no controle de *P. digitatum* em frutos de laranja Pêra, bem como na qualidade dos frutos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A produção de laranja no Brasil, na safra 2011, foi estimada em 19.707.602 toneladas, em aproximadamente 780.384 ha cultivados (BRASIL, 2011). Diversas doenças podem comprometer a produtividade em várias fases da cultura. Especificamente, doenças em pós-colheita reduzem a quantidade de frutos comercializáveis bem como a qualidade (AGRIOS, 2005). As doenças em pós-colheita dos citros podem provocar, aproximadamente, 50% de perdas (LADANIYA, 2008).

Em pós-colheita de citros, os bolores são as mais importantes doenças e podem ser causados por três espécies do gênero *Penicillium*. Esses fitopatógenos causam danos, tanto nos frutos em pomares (final da maturação), quanto em pós-colheita (FEICHTENBERGER et al., 2005). No último caso, ocorrem os principais problemas, atingindo até 90% de podridões no transporte, armazenamento e mercado (AGRIOS, 2005).

Dentre as espécies de *Penicillium* causadoras de bolores em frutos cítricos, *P. digitatum* (bolor verde) é a mais frequente nas regiões produtoras do Brasil (FEICHTENBERGER et al., 2005), e considerada a principal doença em pós-colheita de citros (LARANJEIRA et al., 2005). Em frutos cítricos das cultivares de laranja Pêra, Lima e tangor Murcott, o bolor verde foi a doença mais comum na CEAGESP (FISCHER, LOURENÇO e AMORIM, 2008) e em diferentes fases de beneficiamento em “packinghouse” (FISCHER et al., 2007).

Fischer, Lourenço e Amorim (2008) também quantificaram isolados fúngicos no ambiente atacadista de São Paulo, observando que a maior parte (64,1%) pertence ao gênero *Penicillium*, dos quais 13,4% pertencentes a *P. digitatum*.

O processo infeccioso do patógeno dá-se pela enorme quantidade de esporos que produz, principalmente em “packinghouse”. A porta de entrada do patógeno são os fermentos dos frutos (LARANJEIRA et al., 2005). A disseminação também pode ocorrer pelo contato de frutos infectados com frutos sadios (BARMORE e BROWN, 1982). A máxima germinação de esporos e crescimento de *P. digitatum*, em meio ágar, soro de laranja (OSA), ocorre a 25 °C e atividade de água a 0,995. No entanto, esporos são capazes de germinar e crescer em temperaturas de 4 a 30 °C (PLAZA et al., 2003).

Compostos voláteis liberados pela casca de frutos cítricos lesionados estimulam a germinação de esporos e o crescimento do tubo germinativo de *P. digitatum*. Os principais compostos estimuladores são limoneno (principal), mirceno, α -pineno e β -pineno (DROBY et al., 2008; DROBY et al., 2010). Estes monoterpenos, em especial o limoneno, agem como sinalizadores no reconhecimento do hospedeiro por *P. digitatum* e *P. italicum* (DROBY et al., 2008).

A redução do pH em lesões influencia na patogenicidade de *Penicillium* spp.. Esse patógeno, causando bolor em laranja cultivar Naval, reduz o pH dos frutos. Observa-se acúmulo de ácido cítrico e glucônico em frutos com sintomas de bolor, supostamente responsáveis pela redução do pH. *P. expansum* e *P. digitatum*, em meio de cultura, produziram ácido cítrico e reduziram o pH do meio, mas não produziram ácido glucônico (PRUSKY et al., 2004).

Prusky et al. (2004) sugerem que a redução do pH em frutos por *Penicillium* spp. possibilita o aumento da patogenicidade, por meio da ativação de genes específicos, como o *pepg1* que codifica a enzima endopolygalacturonase (acúmulo em pH entre 3,5 e 5,0). Porém, Macarisin et al. (2007) e Droby et al. (2010) afirmam que apenas a redução do pH não aumenta a virulência do fitopatógeno, mas sim quando associada com a supressão de H₂O₂. Os ácidos oxálico, cítrico e ascórbico diminuem o pH e suprimem a produção de H₂O₂ em citros, aumentando a patogenicidade de *P. digitatum* e *P. expansum* (não patogênico ao hospedeiro). No entanto, o tampão KCl-HCl apenas reduziu o pH, estimulou a produção de H₂O₂ e não reduziu a patogenicidade.

Assim, *P. digitatum* é capaz de suprimir as reações oxidativas em frutos cítricos em estádios iniciais do desenvolvimento da infecção e comprometer a defesa dos frutos (MACARISIN et al., 2007; DROBY et al., 2010).

Os agentes causais dos bolores produzem enzimas degradadoras da lamela média do hospedeiro, causando podridões moles (FEICHTENBERGER et al., 2005). No caso de *P. digitatum*, o sintoma de podridão mole rapidamente aumenta de tamanho e inicia a formação de micélio branco sobre as lesões. Seguidamente produz esporos de coloração verdes (LARANJEIRA et al., 2005).

2.1. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita

Para o controle de *Penicillium* spp. em pós-colheita de citros, normalmente, lança-se mão de fungicidas, que prolongam o armazenamento dos frutos e reduzem o desenvolvimento do patógeno (TORRES et al., 2008). O tratamento de laranjas Salustiana com azoxystrobin, fludioxinil ou pyrimethanil controlou medianamente o bolor verde. Quando os frutos foram tratados com imazalil ou a mistura de imazalil com um dos três fungicidas o controle aumentou consideravelmente. A aplicação de meia dose de imazalil ou imazalil com um dos três fungicidas associados ao tratamento térmico a 50 °C (30 ou 60 segundos) aumentou o controle (SCHIRRA et al., 2010).

Em teste *in vitro*, o fungicida tiabendazol (420 mg kg⁻¹ e 840 mg kg⁻¹) inibiu em 100% *P. digitatum*. Os fungicidas pyrimethanil e trifloxystrobin apresentaram mais de 80% de inibição, enquanto que o tratamento com bicarbonato de sódio inibiu apenas 2,6% (NIETO-ANGEL, AGUILAR-PEREZ e LARA-VIVEROS, 2009).

O amplo uso de fungicidas, contínuo e em alguns casos desordenados, gera resíduos nos frutos e permite a seleção de isolados resistentes (TORRES et al., 2008). Na Califórnia, onde grande parte das estirpes de *P. digitatum*, obtidos em “packinghouse”, foi resistente a imazalil, tiabendazol e ortofenilfenato de sódio, ainda houve resistência simultânea a dois ou três fungicidas (KINAY et al., 2007). De 26 isolados de *P. digitatum*, coletados do campo e “packinghouse” no Uruguai, 50% esporularam limões tratados com 1.500 mg L⁻¹ de imazalil. Todos os isolados que esporularam foram originados de “packinghouse”, sendo que 81% dos isolados foram resistentes (PÉREZ et al., 2011).

Na Califórnia, segundo Kinay et al. (2007), não foram encontrados isolados resistentes a imazalil, tiabendazol e ortofenilfenato de sódio no campo, onde estes fungicidas não são utilizados. Porém, foi encontrada resistência a pirimetanil, sendo provável o desenvolvimento de resistência em tratamento no “packinghouse” para este produto.

Os isolados resistentes a fungicidas normalmente apresentam crescimento mais lento e menor capacidade competitiva, quando comparado aos sensíveis. Porém, alguns isolados mostram persistência por longos períodos, indicando que no futuro poderá ocorrer seleção da capacidade adaptativa, competitiva e persistência da resistência (KINAY et al., 2007).

Uma estratégia para resolver esses problemas é a integração de produtos biológicos e químicos para reduzir a ampla aplicação de fungicidas (LUCON et al., 2010). A combinação de antagonistas e fungicidas sintéticos proporciona uma proteção integrada e com menores riscos de desenvolvimento de resistência a fungicidas (ARRAS, SCHERM e MIGHELI, 2002).

A integração de *Pichia guilliermondii* (5A) com baixas doses de tiabendazole ou imazalil, reduziu as podridões em pós-colheita de citros, em especial a causada por *P. digitatum* (ARRAS, SCHERM e MIGHELI, 2002). Ainda, podem ser integrados métodos físicos ao químico, como o tratamento com água quente (56 °C por 2 min.) e baixas doses de imazalil (500 mg kg⁻¹) que controlam *P. digitatum* (PUAWONGPHAT, NIAMJANG e SANGCHOTE, 2008).

O tratamento térmico, antes do armazenamento, é uma alternativa para o controle de pós-colheita de frutos. Esse método não necessita de produtos químicos, inibe diretamente o crescimento do fitopatógeno e ativa os mecanismos de resistência do fruto (EL-GHAOUTH et al., 2002).

Conídios de *P. digitatum* tem menor viabilidade em temperaturas altas com elevada umidade relativa. Conídios submetidos a, aproximadamente, cinco horas em temperaturas de 50 °C e UR de 95% apresentaram 99% de mortalidade para isolados resistentes ou sensíveis a fungicidas. Assim, o tratamento de algumas áreas de “packinghouse” pela desinfestação térmica de 1 a 2 dias, a 50 °C em UR de 75% seria uma adequada medida de sanitização (SMILANICK e MANSOUR, 2007).

O controle de *P. digitatum* com imersão em água quente varia com a temperatura e o tempo do tratamento. Conforme observado em frutas mandora (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), onde a combinação com maior temperatura e tempo de exposição reduziu a incidência da doença (temperaturas de 56, 59, 62 e 65 °C por 1, 2 e 3 minutos). Os tratamentos promoveram ação fungistática, pois com o passar do tempo de armazenamento ocorreu o aumento da incidência da doença (KYRIACOU, 2011). O tratamento térmico (56, 59 e 60 °C), por lavagem rápida (20 segundos), com simultânea escovação de toranjas Star Ruby, reduziu a incidência de *P. digitatum* em mais de 80%. Nesses tratamentos os frutos foram desinfestados, ainda a cera epicuticular é redistribuída selando rachaduras que são portas de entrada para o patógeno (PORAT et al., 2000a).

O controle de *P. digitatum* e *P. italicum* em tangerinas foi obtido por até sete dias após a inoculação, com o tratamento de cura (temperatura de 33 °C por 65 h ou 40 °C por 24 h) associado com o desverdeamento (5-10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de etileno). O controle foi atingido em tangerinas colhidas precoce ou tardiamente. No tratamento de 40 °C por 24 h na colheita tardia, também controlou *Geotrichum candidum* (PLAZA et al., 2004a).

Produtos biocompatíveis também podem ser usados no controle de *P. digitatum*, entre eles: bicarbonato de sódio, ácido bórico, carbonato de sódio metabissulfito de sódio e as misturas de carbonato de sódio + ácido bórico, bicarbonato de sódio + ácido bórico, carbonato de sódio + carbonato de potássio, carbonato de sódio + sorbato de potássio e bicarbonato de sódio + carbonato de sódio (FRANCO e BETTIOL, 2002).

Em laranjas feridas e inoculadas com *P. digitatum* e *P. italicum*, os óleos essenciais de cinamomo e timo (50 ml L⁻¹) reduziram a doença. Os óleos de tomilho e orégano, quando misturados na cera, não exerceram efeito no controle dos bolores, além do timo causar danos nos frutos nos níveis requeridos para controle (PLAZA et al., 2004b).

2.2. Controle biológico em pós-colheita

O emprego de agentes de biocontrole no manejo de doenças em pós-colheita demonstra ser o método mais apropriado para substituir os produtos químicos (SHARMA, SINGH e SINGH, 2009). Por exemplo, *Candida sake* (CPA-1) reduziu o desenvolvimento e lesões causadas por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus*

nigricans em frutos de maçã. O antagonista reduziu o tamanho das lesões tanto em baixa temperatura como em temperatura ambiente (VIÑAS et al., 1998). O mesmo isolado reduziu lesões de *P. expansum* em maçã em sete condições de atmosfera controlada em temperatura de 1 °C. Maior redução ocorreu em atmosfera de 3% de O₂ e 6% de CO₂ (USALL et al., 2000). Possivelmente, o mecanismo de ação é por competição de nutriente e espaço (VIÑAS et al., 1998). *Candida famata* (F35) controla o bolor verde, competindo por espaço e nutrientes e produzindo enzimas líticas (ARRAS, 1996).

A população do antagonista no fruto é relevante no controle biológico. Lucon et al. (2010) enfatiza que, para a eficiência do controle biológico, é importante o antagonista colonizar a superfície do fruto e persistir nele. Segundo Touré et al. (2004), a aplicação de endósporos de *Bacillus subtilis* (GA1), em lesões de frutos de maçã 24 h antes da inoculação com fitopatógeno, deve ser 200 vezes maior que o número de conídios de *Botrytis cinerea* para reduzir a doença.

A aplicação de *Pantoea agglomerans* (CPA-2) a 4×10^7 ou 2×10^8 UFC mL⁻¹, em laranja Valencia, com ferimentos, não diferenciaram no controle de *P. digitatum* e *P. italicum* (1×10^5 conídios mL⁻¹). Porém, a maior concentração do antagonista exerceu maior controle quando a concentração dos fitopatógenos inoculados foi de 1×10^6 conídios mL⁻¹. *P. agglomerans* cresceu e ocupou ferimentos de laranja tanto a 20 °C como em 3 °C (TEIXIDÓ et al., 2001). A população de *C. sake* (CPA-1) aumentou rapidamente nos primeiros dias após a inoculação, tanto em armazenamento a 20 °C como a 1 °C, diminuindo lentamente com o tempo. Após 150 dias a 1 °C, a população foi 2,6 vezes maior que a população inicial. A hipótese é que o microrganismo proteja os frutos de maçã por competição de nutriente e espaço (VIÑAS et al., 1998).

O melhor controle de *P. expansum* por *Pichia anomala* (K), foi quando a população do antagonista na superfície de maçã atingiu 1×10^4 UFC cm⁻², resultante da aplicação de uma suspensão na ordem de 1×10^8 UFC mL⁻¹. A maior umidade na superfície do fruto influencia a população da levedura, melhorando o crescimento da levedura e favorecendo o controle de *P. expansum* (LAHLALI et al., 2009).

Após inoculação com *P. digitatum*, limões foram tratados com o antagonista *P. agglomerans* (CPA-2), o qual reduziu a infecção dos frutos em mais de 80%. O antagonista (2×10^8 UFC mL⁻¹) controlou a doença, quando aplicado até 15 h após a

inoculação do fitopatógeno (10^6 conídios mL^{-1}), em frutos armazenados a 20 °C por sete dias ou a 10 °C por 3 semanas. Maior controle foi obtido quando tratado 6 h antes da inoculação do fitopatógeno. Quando os frutos foram inoculados com a menor concentração de *P. digitatum* e tratados 24 h após com o antagonista, também ocorreu redução na incidência da doença (PLAZA et al., 2004c). A mesma bactéria, quando aplicada 2 h após a inoculação de *P. digitatum*, exerceu efeito curativo nos frutos, reduzindo a incidência da doença (USALL et al., 2008). Resultado semelhante foi observado por Teixidó et al. (2001) em que *P. agglomerans* (CPA-2) reduziu tanto o bolor verde como o azul em frutos armazenados a 20 °C, por até 14 dias, e o bolor verde em frutos armazenados a 3 °C durante 60 dias.

O tratamento com *Saccharomycopsis schoenii* (UWO-PS 80-91), imediatamente após a inoculação de *P. digitatum* em laranjas, proporcionou redução de 34,6 a 86,8% da severidade da doença. O antagonista apresentou ação predatória (PIMENTA et al., 2008).

A indução de resistência pode ocorrer pela aplicação de antagonistas. As leveduras *Metschnikowia fructicola* (277) e *Candida oleophila* (182) aumentaram a produção de H_2O_2 em maçã e limão no local do ferimento onde ocorreu a inoculação. Ambas elevam os níveis de O_2^- na superfície de frutos. A produção de O_2^- pode alterar o equilíbrio da redox ativando resistência no hospedeiro. *Metschnikowia fructicola*, no ferimento onde foi inoculado, foi tolerante ao H_2O_2 , fator importante para um agente de biocontrole (MACARISIN et al., 2010).

Compostos produzidos por microrganismos são alternativas para o controle de *Penicillium*. A proteína “killer” panomycocin (exo- β -1,3-glucanase), produzida por *Pichia anomala* (NCYC 434), inibe o crescimento de *P. digitatum* e *P. italicum* *in vitro*, sendo que 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu completamente o crescimento e a germinação de esporos dos fitopatógenos. Em limões inoculados com *P. digitatum* e *P. italicum*, a panomycocin (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) controlou 100% de ambos os fitopatógenos até 5-7 dias após o tratamento (IZGU, KEPEKCI e IZGU, 2011). Essa atividade “killer” já foi observada em controle biológico, com a levedura *Torulaspora globosa*, que produz compostos que deformam hifas de *Colletotrichum sublineolum*. Porém, a deformação não é letal ou irreversível, mas podem afetar a penetração da hifa no hospedeiro (ROSA et al., 2010).

Compostos voláteis produzidos por *Streptomyces globisporus* JK-1 são fungistáticos ao micélio de *P. italicum* e fungicidas aos conídios. Houve redução da incidência natural de podridões em frutos de tangerina Shatang, fumigados com 120 g L⁻¹ dos compostos voláteis do agente de biocontrole cultivado em sementes de trigo. Também ocorreu inibição do bolor azul em frutos inoculados artificialmente. Dos 41 compostos voláteis orgânicos identificados, três apresentaram ação contra *P. italicum*, entre eles: dissulfeto de dimetila, trissulfeto de dimetilo e acetofenona (LI et al., 2010). *Saccharomyces cerevisiae* (CR-1, PE-2, K-1, CAT-1, BG-1 e KD-1) produzem compostos voláteis que inibem o crescimento de *Guignardia citricarpa* em laboratório. O efeito é fungistático. Em testes complementares com o isolado CR-1 mostraram que a inibição ocorre quando o meio batata-ágar foi suplementado com fontes de carbono: glicose, sacarose e maltose, porém não com galactose. Os compostos voláteis identificados foram: acetato de etilo, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, feniletil álcool e etilo, em maior quantidade, além de um composto não identificado. Uma mistura dos compostos identificados inibiu o fitopatógeno (FIALHO et al., 2010).

Isolados de *Pseudomonas* spp. (P39, P40 e P41) reduziram a incidência de *P. digitatum* em laranjas. Possivelmente, um dos mecanismos de ação é a produção de metabólitos antifúngicos (ZAMANI et al., 2008). *Verticillium lecanii*, em condições de laboratório, cessa o crescimento e altera a morfologia das hifas de *P. digitatum*, antes mesmo do contato entre os microrganismos, indicando que o antagonismo ocorre por antibiose (BENHAMOU e BRODEUR, 2000). Além disso, o antagonista induz a resistência em frutos de limões contra *P. digitatum* (BENHAMOU, 2004).

A aplicação de antagonistas na pré-colheita possibilita o controle de doenças em pós-colheita. No entanto, conforme Lahlali et al. (2009), no controle de *P. expansum* em maçã com o antagonista *Pichia anomala* (K), os resultados podem ser inconsistentes, devido à variação climática, como chuvas pesadas e variações de temperatura. Assim, os autores enfatizam a necessidade de uma formulação que permita proteção aos antagonistas contra condições climáticas desfavoráveis e mantenha a população a níveis suficientes para controlar a doença.

Outros fatores podem afetar a eficiência dos agentes de biocontrole. *Candida oleophila* (Aspire®) é afetada negativamente pelo óleo da casca de laranjas. Possivelmente, o óleo liberado em lesões maiores é absorvido rapidamente pela grande

quantidade de tecido interglandular danificado, enquanto danos menores em glândulas de óleo, o óleo é liberado e permanece na vesícula afetando o biocontrolador (BROWN, DAVIS e CHAMBERS, 2000).

2.3. *Bacillus* sp. como agente de biocontrole em pós-colheita

Bactérias são desejáveis agentes de biocontrole, pois são relativamente de fácil manipulação, normalmente estáveis, de rápida geração e agressivos colonizadores. Em especial *Bacillus* spp. leva vantagem por formar endósporos que suportam condições ambientes adversas (WARRIOR, KONDURU e VASUDEVAN, 2002). Estirpes de *Bacillus* spp. podem apresentar diferentes mecanismos de ação sobre o fitopatógeno.

Bacillus spp., em condições de laboratório, podem antagonizar diferentes fitopatógenos habitantes do solo, foliares ou de pós-colheita (TOURÉ et al., 2004). A exemplo, nove estirpes de *Bacillus* spp., selecionadas a partir de isolamento do solo, apresentaram atividade antifúngica contra *P. digitatum* e seus compostos antifúngicos foram estáveis quando autoclavados. Sete isolados produziram compostos orgânicos voláteis que inibiram em mais de 40% o crescimento do patógeno e a formação de conídios, porém, de forma reversível (LEELASUPHAKUL, HEMMANEE e CHUENCHITT, 2008).

Em laranja Valencia, os isolados *B. subtilis* (PPCB001) e *Bacillus amyloliquefaciens* (PPCB004), associados às embalagens de atmosfera modificada, reduziram a incidência de *Penicillium crustosum*. Um dos mecanismos de ação foi a produção de compostos voláteis, principalmente cetona, 3-hidroxi-2-butanona. Os compostos voláteis de *B. subtilis* causaram anomalias nos conidióforos, enquanto que os voláteis de *B. amyloliquefaciens* causaram a perda da estrutura do conidióforo do fitopatógeno. Os compostos voláteis de ambos antagonistas reduziram a produção de conídios do patógeno (ARREBOLA, SIVAKUMAR e KORSTEN, 2010). *B. amyloliquefaciens* (PPCB004) também produz lipopeptídeos capazes de inibir patógenos *in vitro* e em frutos cítricos (*Alternaria citri*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *P. crustosum*). A iturina A foi o principal lipopeptídeo relacionado ao controle (ARREBOLA, JACOBS e KORSTEN, 2010). O mesmo isolado reduziu a incidência e a severidade de doenças de pós-colheita causadas por *Phomopsis caricae-papayae* e *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão, quando aplicado sozinho ou

com o inibidor de etileno 1-metil ciclopropeno (OSMAN, SIVAKUMAR e KORSTEN, 2011) e ainda exerceu efeito protetor em pêssego, reduzindo a incidência e severidade de *B. cinerea*, *P. expansum* e *Rhizopus stolonifer* (ARREBOLA et al., 2010).

Em frutos de maçã, foram detectadas maiores quantidades de fengicinas produzidas por *B. subtilis* (GA1), sendo associado com o controle de *B. cinerea*, possivelmente, reduzindo a germinação do conídio ou o comprimento do tubo germinativo (TOURÉ et al., 2004). De maneira similar, células vegetativas de *B. subtilis* (M4) também reduziram *B. cinerea* em maçã, em tratamento 24 h antes da inoculação com o patógeno. A redução atingiu mais de 70% em até 15 dias após a inoculação. O controle também foi atribuído a fengicinas, que foram detectadas nos frutos, sendo estimulada em mais de duas vezes a sua produção, quando o patógeno está presente (ONGENA et al., 2005). Surfactina foi produzida por *B. subtilis* (GA1) na fase exponencial, enquanto que iturinas e fengicinas foram produzidas na fase estacionária (TOURÉ et al., 2004).

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* (HD-1), obtido dos produtos comerciais Dipel® WP e Dimy Pel®, e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-567) reduziram o número de picnídios por lesão de *Phyllosticta citricarpa*. Também reduziram o número de lesões por fruto de *Guignardia citricarpa*, exceto o produto comercial Dipel®. Os isolados apresentaram antibiose e a produção de compostos voláteis com ação fungistática (LUCON et al., 2010).

2.4. Associação de métodos no controle de doenças em pós-colheita de frutos

As combinações de métodos de controle podem melhorar o controle de doenças em pós-colheita de frutos. Em maçãs tratadas com duas leveduras (*Metschnikowia pulcherrima* isolado FMB024H-2 e *Cryptococcus laurentii* isolado ST4-E14) e bicarbonato de sódio, e armazenadas em atmosfera controlada (1,5 kPa O₂, 2,0 kPa CO₂) a 1 °C por 5,5 meses, apresentaram controle de *P. expansum* (JANISIEWICZ et al., 2008). A mistura de polifenóis com *Candida ernobii* aumentou o controle de *Diplodia natalensis* em citros. Polifenóis a 1%, além de apresentar efeito inibitório na germinação de esporos e crescimento micelial de *D. natalensis in vivo*, aumentou a população de *C. ernobii* nas lesões dos frutos (LIU et al., 2010).

A associação do tratamento de aspersão e escovação com água a 60 °C, por 20 segundos, seguido do tratamento com *Candida* sp., reduziu a doença causada por *P. expansum* em frutos de pêssigo e nectarina. Porém, a associação só foi eficiente quando aplicado 24 h após inoculação do patógeno comparado ao tratamento imediatamente após a inoculação (KARABULUT et al., 2002).

A combinação com o tratamento de cura (33 °C por 65 h) melhorou a ação de *P. agglomerans* (CPA-2) no controle de *P. digitatum* em limões. O tratamento dos frutos com o antagonista, seguido do tratamento de cura e o armazenamento por três semanas a 10 °C e por sete dias a 20 °C, simulando a vida de prateleira, possibilitou o controle total de *P. digitatum* (PLAZA et al., 2004c). O tratamento com *Candida oleophila* (Aspire®), seguido da incubação por dois dias em 30 °C, antes do armazenamento em 21 °C, aumentou o controle de *P. digitatum* em laranjas em um de dois ensaios. O controle deve-se a cicatrização das lesões, maior crescimento do agente de biocontrole e crescimento reduzido do patógeno nessa temperatura (BROWN, DAVIS e CHAMBERS, 2000).

A combinação com bicarbonato de sódio (2%) melhorou a ação de *P. agglomerans* (CPA-2) contra *P. italicum* em frutos armazenados a 3 °C e *P. digitatum* a 20 °C. Contra *P. digitatum* a 3 °C, tanto o bicarbonato de sódio, quanto a combinação, eliminaram quase totalmente a doença (TEIXIDÓ et al., 2001).

O controle dos bolores azul e verde com o tratamento laranja Valência e Shamouthi com *B. subtilis* (F1, L2 ou L2-5), associado com 1% de bicarbonato de sódio, por 5 minutos, ou tratamento térmico a 45 °C, por 2 minutos, foi potencializado, comparado a cada tratamento individualmente. O bicarbonato de sódio e o tratamento térmico, possivelmente reduzem o crescimento do patógeno e possibilita uma vantagem para o agente de biocontrole (OBAGWU e KORSTEN, 2003). *Pseudomonas* spp. (P39, P40 e P41) têm aumento do controle de *P. digitatum* quando combinadas a bicarbonato de sódio (3%) a 45 °C (ZAMANI et al., 2008).

No entanto, a aplicação de *P. agglomerans* (CPA-2), duas horas após o tratamento de 3% de carbonato de sódio ou bicarbonato de sódio em citros, não melhorou o controle do bolor verde por esses produtos de forma curativa, em frutos feridos e inoculados com o patógeno 24 h antes do tratamento, ou protegendo os ferimentos da reinoculação. Porém, após o tratamento, quando foram realizados novos ferimentos no fruto tanto o

carbonato, quanto o bicarbonato de sódio reduziram a doença, e a aplicação de *P. agglomerans* (CPA-2) antes da inoculação com o patógeno melhorou o efeito protetor de novos ferimentos (USALL et al., 2008). O carbonato de sódio a 2% reduziu a população de *P. agglomerans* após mistura em solução por 30 minutos, enquanto o bicarbonato de sódio não (TEIXIDÓ et al., 2001).

Associação de *B. amyloliquefaciens* (PPB004) e óleo essencial de citronela apresentaram sinergismo no controle de *B. cinerea*, *P. expansum* e *Rhizopus stolonifer*, *in vitro* e em pêssago (ARREBOLA et al., 2010). A combinação de saponina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com *B. amyloliquefaciens* (HF-01) aumentou o controle de *P. digitatum*, *P. italicum* e *Geotrichum candidum* em tangerinas (HAO et al., 2011). Segundo esses autores, a saponina não alterou a população bacteriana e aumentou a formação de biofilme.

Mais de dois métodos podem ser associados. A integração do tratamento térmico (45 °C por 5 minutos), *B. licheniformis*, 25% da dose recomendada de prochloraz e cera, aumentaram a eficiência no controle de antracnose e podridão peduncular em manga (GOVENDER, KORSTEN e SIVAKUMAR, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de laranjas, cultivar Pêra, sem tratamento com fungicidas, foram adquiridos no “packinghouse” da empresa Alfa Citrus, Engenheiro Coelho – SP. Esses frutos foram lavados e desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio.

Penicillium digitatum foi isolado de laranjas Pêra obtidas de um supermercado de Jaguariúna – SP. O patógeno foi multiplicado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubado por 10 dias a 24 ± 1 °C. Antes da instalação do experimento, foi realizado teste de patogenicidade do isolado em frutos de laranja Pêra.

Nos ensaios foram utilizados os agentes de biocontrole *Bacillus subtilis* (CHR HANSEN), *Bacillus licheniformis* (CHR HANSEN) e *Bacillus subtilis* (QST 713 - Serenade®) e o fungicida imazalil.

O trabalho foi composto por 10 tratamentos, em blocos casualizados, sendo combinado em esquema fatorial 2 x 5 (aplicação ou não do tratamento térmico associado aos cinco tratamentos): 1) Testemunha tratada com água, 2) Fungicida imazalil (100 g do i.a. 100 L de água), 3) *Bacillus subtilis* (3×10^8 UFC mL⁻¹), 4) *Bacillus licheniformis* (3×10^8 UFC mL⁻¹), 5) *Bacillus subtilis* (Serenade® - 1×10^6 UFC mL⁻¹), 6) Testemunha com tratamento térmico, 7) Fungicida imazalil + tratamento térmico, 8) *Bacillus subtilis* (3×10^8 UFC mL⁻¹) + tratamento térmico, 9) *Bacillus licheniformis* (3×10^8 UFC mL⁻¹) + tratamento térmico; e 10) *Bacillus subtilis* (Serenade® - 1×10^6 UFC mL⁻¹) + tratamento térmico. Em cada tratamento, os frutos foram imersos por 2 minutos na suspensão de agentes de biocontrole,

suspensão do fungicida ou água destilada. Nos tratamentos com os agentes de biocontrole + tratamento térmico, os frutos foram imersos por 2 minutos em água a 52 °C em um banho com circulação, contendo os biocontroladores. Imediatamente após, os frutos foram imersos em água em temperatura ambiente, também por 2 minutos, objetivando prevenir injúrias nos frutos pela elevada temperatura. No tratamento com fungicida + tratamento térmico, inicialmente foi realizado o tratamento térmico, resfriamento e, posteriormente, a imersão dos frutos por 2 minutos em solução com fungicida. Quando realizado apenas o tratamento térmico, os frutos foram tratados termicamente e então resfriados em água em temperatura ambiente.

Após o tratamento frutos foram secos em temperatura ambiente e armazenados por 28 dias em temperatura de 10 °C e umidade relativa de 90%±5.

3.1. Controle de *Penicillium digitatum* com agentes de biocontrole e tratamento térmico seguido de armazenamento a temperatura de 10°C

Foram usados 54 frutos por tratamento, constituindo três repetições de 18 frutos. A inoculação foi efetuada pelo ferimento na região equatorial do fruto, com auxílio de um prego em 3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, em dois pontos equidistantes. Inoculou-se em cada lesão 10 µL de uma suspensão de 1×10^6 conídios mL⁻¹ de *P. digitatum*, permanecendo os frutos em repouso, por aproximadamente uma hora, para que a suspensão fosse absorvida. Em seguida, os frutos foram tratados, de acordo com cada tratamento, conforme descrito anteriormente, secos em temperatura ambiente e armazenados em temperatura de 10 °C e umidade relativa de 90%±5.

As avaliações fitopatológicas foram realizadas diariamente, a partir do 4º dia após inoculação, durante sete dias. Avaliações de severidade dos frutos foram realizadas pelas medições dos diâmetros das lesões causadas por *P. digitatum*, com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados foram convertidos em severidade pelo cálculo da porcentagem do comprimento do fruto lesionado.

Com os dados obtidos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) pela fórmula proposta por Shaner & Finney (1977): $\Sigma [(Y_{i+1} +$

$Y_i)/2] [X_{i+1} - X_i]$; em que Y_i é o diâmetro da lesão no tempo X_i , e Y_{i+1} é o diâmetro da lesão em X_{i+1} . O tempo foi definido em dias, sendo o valor inicial (X_i) o valor da primeira avaliação.

O experimento foi repetido duas vezes, utilizando o mesmo lote de laranjas.

3.2. Avaliação da qualidade dos frutos

Nas análises físico-químicas, os frutos (três repetições de 72 frutos por tratamento) foram tratados, conforme descrito, sem serem inoculados, e armazenados em caixas de papelão por 28 dias em temperatura de 10 °C e umidade relativa de 90%±5. Em cada análise oito frutos por tratamento foram coletados e analisados destrutivamente. Análises de cada tratamento foram realizadas no 14° e 28° dia de armazenamento. Uma análise foi realizada no momento de chegada dos frutos, oito frutos foram coletados e analisados, a fim de representar todo o lote.

Para avaliar a firmeza da polpa, foi retirada uma parcela da casca, até atingir o albedo, em dois pontos de três frutos. Com auxílio de um penetrômetro, foi testada a resistência de penetração do fruto. Na análise de cor da casca, foi utilizado o colorímetro Minolta CR310 Data Processor DP301, analisando três pontos de cada um dos cinco frutos. Os mesmos cinco frutos foram pesados e o suco de cada fruto foi extraído, pesado e calculado o rendimento. Do suco extraído avaliou-se o total de sólidos solúveis (°Brix) com um refratômetro. Vinte e cinco mililitros de suco foram dispensados em 100 mL de água destilada para avaliação da acidez, por meio da titulação com NaOH 0,3125 N até o ponto de viragem, utilizando o indicador fenolftaleína. Os experimentos foram repetidos duas vezes, utilizando dois diferentes lotes de frutos.

As avaliações de incidência natural de doenças em pós-colheita foram realizadas nos 56 frutos armazenados restantes de cada tratamento das análises físico-químicas. Foi avaliada a porcentagem total de frutos com podridões, após 28 dias de armazenamento.

A avaliação de perda de peso dos frutos, foi realizada com três repetições de 10 frutos tratados e armazenados conforme descrito. Os frutos pesados imediatamente após secagem, no 14° e 28° dia de armazenamento. Foi calculada a

porcentagem de peso perdido em cada avaliação comparado a primeira pesagem. Este ensaio foi repetido uma vez.

3.3. Controle de *Penicillium digitatum* com agentes de biocontrole e tratamento térmico em armazenamento a temperatura de 20°C

O trabalho foi composto por 12 tratamentos, em blocos casualizados, sendo combinado em esquema fatorial 2 x 6, sendo realizado ou não do tratamento térmico associado a utilizando os seguintes tratamentos: 1) Testemunha tratada com água, 2) Fungicida tiabendazol, 3) *Bacillus subtilis* ($1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), 4) *Bacillus licheniformis* ($1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), 5) *Bacillus subtilis* – Serenade® (1×10^6 UFC mL⁻¹), 6) *Sporidiobolus pararoseus* (1×10^8 células mL⁻¹), 7) Testemunha com tratamento térmico, 8) Fungicida tiabendazol + tratamento térmico, 9) *Bacillus subtilis* ($1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) + tratamento térmico, 10) *Bacillus licheniformis* ($1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) + tratamento térmico, 11) *Bacillus subtilis* – Serenade® (1×10^6 UFC mL⁻¹) + tratamento térmico, e 12) *Sporidiobolus pararoseus* (1×10^8 células mL⁻¹) + tratamento térmico.

O experimento seguiu a mesma metodologia de inoculação de *P. digitatum*, já descrita. No entanto, foram utilizados para cada tratamento três repetições de cinco frutos, sendo os tratamentos realizados duas horas após a inoculação. O tratamento seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente, com exceção do fungicida que foi utilizada outro produto (tiabendazol – 485 g i.a. 100 L⁻¹), e para o tratamento com o agente de biocontrole *Sporidiobolus pararoseus*, onde os frutos foram tratados através da agitação por 30 segundos na suspensão contendo o agente de biocontrole (MATTOS, 2010). No tratamento *Sporidiobolus pararoseus* + tratamento térmico, os frutos foram imersos na água a 52 °C por 2 minutos, resfriados e depois agitados por 30 segundos na suspensão contendo a levedura.

Os frutos foram incubados a 20 °C e UR de 90%. Após três dias avaliou-se, por um período de cinco dias, o diâmetro das lesões. As avaliações e obtenção da AACPD seguiram a metodologia já descrita. O ensaio foi repetido duas vezes, com dois lotes diferentes de frutos. No segundo lote os frutos estavam em estágio avançado de maturação.

Com a hipótese de que a lavagem de resfriamento, após o tratamento térmico associado com os isolados de *Bacillus*, pudesse remover o tratamento, mais dois

ensaios foram realizados, usando o mesmo delineamento e tratamentos, exceto pela exclusão do tratamento com *Sporidiobolus pararoseus* e *S. pararoseus* + tratamento térmico. Porém, nesses ensaios, todos os tratamentos utilizando o tratamento térmico, os frutos foram tratados com a água quente a 52 °C por 2 minutos, seguindo o resfriamento por 2 minutos, e só então realizado a imersão dos frutos em suspensão contendo os agentes de biocontrole ou o fungicida tiabendazol. Para os dois ensaios utilizou-se o mesmo lote de frutos, em estágio avançado de maturação, sendo armazenados a 20 °C e UR de 90%. Após três dias, com o surgimento dos sintomas, iniciaram as avaliações conforme já descritas por um período de cinco dias.

3.4. Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, considerando blocos em esquema fatorial (2x5 ou 2X6).

4. RESULTADOS

4.1. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de frutos de laranja com agentes de biocontrole e tratamento térmico seguido de armazenamento a temperatura de 10°C

Nos dois experimentos conduzidos ocorreu diferença significativa e interação entre os fatores. Entretanto, na repetição do experimento houve diferentes resultados. No primeiro experimento a AACPD foi reduzida pelo tratamento térmico, exceto no tratamento com imazalil, que controlou efetivamente a doença com ou sem a associação. No segundo ensaio, o tratamento térmico reduziu a doença apenas na testemunha (Tabela 1 e 2).

Na primeira repetição do experimento, os agentes de biocontrole reduziram a AACPD nos frutos. O produto comercial Serenade® apresentou melhor resultado entre os produtos aplicados, seguido de *B. subtilis* e *B. licheniformis* com menor redução da AACPD. Quando associado com o tratamento térmico, todos os produtos biológicos tiveram ação melhorada, entre os tratamentos o *B. licheniformis* e Serenade® foram os que apresentaram melhor controle.

Tabela 1. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum*, em laranja Pêra. Primeira repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C.

Tratamento	AACPD	
	Com Tratamento Térmico	Sem Tratamento Térmico
Testemunha	279,36 aD	344,88 bE
Imazalil	0,38 aA	0 aA
<i>Bacillus subtilis</i>	197,78 aC	234,23 bC
<i>Bacillus licheniformis</i>	161,59 aB	273,01 bD
<i>Bacillus subtilis</i> - Serenade	174,37 aBC	202,79 bB
CV (%)	6,134	

Médias seguidas da mesma letra minúscula (linha) e maiúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Na segunda repetição do ensaio, os agentes de biocontrole não exerceram controle, tanto quando aplicado isolado ou associado ao tratamento térmico. Apenas o tratamento com imazalil reduziu consistentemente a AACPD nos dois ensaios.

Tabela 2. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Segunda repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C.

Tratamento	AACPD	
	Com Tratamento Térmico	Sem Tratamento Térmico
Testemunha	135,33 aB	242,67 bB
Imazalil	4,83 aA	6,18 aA
<i>Bacillus subtilis</i>	354,80 aD	370,26 aD
<i>Bacillus licheniformis</i>	347,29 aD	326,92 aC
<i>Bacillus subtilis</i> - Serenade	294,97 aC	322,84 aC
CV (%)	7,15	

Médias seguidas da mesma letra minúscula (linha) e maiúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

4.2. Incidência natural de doenças em pós-colheita de laranjas Pêra após tratamento térmico e com agentes de biocontrole

No primeiro ensaio, os resultados mostram interação entre os fatores, onde todas as associações com o tratamento térmico, exceto a associação com fungicida, reduziram a incidência das doenças em pós-colheita comparado a não realização do tratamento térmico. Porém, quando não foi aplicado o tratamento térmico, apenas o tratamento com fungicida reduziu a doença (Tabela 3).

Tabela 3. Incidência natural de podridões de pós-colheita em laranjas Pêra submetidas ao tratamento térmico associado a agentes de biocontrole. Primeira repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C.

Tratamento	Incidência (%)	
	Com Tratamento Térmico	Sem Tratamento Térmico
Testemunha	5,35 aA	19,64 bB
Imazalil	1,19 aA	0,59 aA
<i>Bacillus subtilis</i>	5,95 aA	28,57 bB
<i>Bacillus licheniformis</i>	1,78 aA	19,64 bB
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	1,78 aA	23,81 bB
CV (%)	35,82	

Médias seguidas da mesma letra minúscula (linha) e maiúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade). Dados transformados por arcsen $(x/100)^{-2}$.

No segundo ensaio, também ocorreu interação entre os fatores, os tratamentos com agentes de biocontrole sem o tratamento térmico, apresentaram maior incidência comparado a associação com o tratamento térmico. No entanto, os agentes de biocontrole associados ao tratamento térmico não diferenciaram do tratamento em que apenas foi utilizado o tratamento térmico, neste caso apenas o imazalil associado ao tratamento térmico reduziu a incidência das doenças. Quando não aplicado o tratamento térmico nenhum tratamento diferiu da testemunha, porém o imazalil apresentou reduzida incidência das doenças quando comparado aos agentes de biocontrole. (Tabela 4).

Tabela 4. Incidência natural de podridões de pós-colheita em laranjas Pêra submetidas ao tratamento térmico associado a agentes de biocontrole. Segunda repetição do ensaio em armazenamento dos frutos a 10 °C.

Tratamento	Incidência (%)	
	Com Tratamento Térmico	Sem Tratamento Térmico
Testemunha	7,14 aB	9,52 aAB
Imazalil	0 aA	1,78 aA
<i>Bacillus subtilis</i>	10,11 aB	20,83 bBC
<i>Bacillus licheniformis</i>	5,95 aAB	20,23 bBC
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	2,97 aAB	23,80 bC
CV (%)	25,99	

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade). Dados transformados por $\arcsen(x/100)^{-2}$

4.3. Análises físico-químicas dos frutos

Os frutos apresentaram as seguintes características no recebimento: Para o primeiro lote: acidez = 0,742 g 100 mL⁻¹; sólidos solúveis = 8,82 °Brix; ratio = 11,91; rendimento de suco = 58,21%; L* = 71,01; C* = 59,40; h° = 93,08; resistência a penetração = 6,12 N; Para o segundo lote: acidez = 0,83 g 100 mL⁻¹; sólidos solúveis = 7,9 °Brix; ratio = 9,57; rendimento de suco = 60,1%; L* = 59,44; C* = 52,51; h° = 108,07; resistência a penetração = 11,45 N.

4.3.1. Acidez titulável

Os agentes de biocontrole não apresentaram interação com o tratamento térmico. Nenhum tratamento diferiu da testemunha nos dois ensaios. Apesar que, no primeiro ensaio, em 14 dias de armazenamento, o tratamento com *B. licheniformis* apresentou maior acidez que o imazalil, diferença que desapareceu após o 28 dias de armazenamento. No segundo experimento, o tratamento com *B. licheniformis* apresentou maior acidez que *B. subtilis* após 28 dias de armazenamento. Inicialmente o tratamento térmico apresentou maior acidez. Entretanto, após 28 dias essa diferença não foi significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na acidez dos frutos de laranja Pêra. Primeiro experimento.

Tratamento	Acidez (g 100 mL ⁻¹)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	0,745 ab	0,757 a
Imazalil	0,727 b	0,761 a
<i>Bacillus subtilis</i>	0,768 ab	0,760 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,885 a	0,876 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	0,843 ab	0,755 a
Com tratamento térmico	0,793 a	0,783 a
Sem tratamento térmico	0,794 a	0,781 a
CV (%)	10,326	9,890

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 6. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na acidez dos frutos de laranja Pêra. Segundo experimento.

Tratamento	Acidez (g 100 mL ⁻¹)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	0,841 a	0,747 ab
Imazalil	0,719 a	0,724 ab
<i>Bacillus subtilis</i>	0,714 a	0,627 b
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,761 a	0,801 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	0,782 a	0,753 ab
Com tratamento térmico	0,802 a	0,742 a
Sem tratamento térmico	0,725 b	0,718 a
CV (%)	12,903	11,141

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

4.3.2. Sólidos solúveis totais (°Brix)

Na primeira repetição do ensaio, não houve diferença entre os tratamentos nas duas avaliações realizadas (Tabela 7). Na segunda repetição do experimento, após 14 dias de armazenamento ocorreram diferenças, onde *B. subtilis* apresentou menor sólidos solúveis totais que a testemunha. Os frutos submetidos ao tratamento térmico

apresentaram maior sólidos solúveis totais. No entanto, após 28 dias de armazenamento não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 7. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole nos sólidos solúveis totais dos frutos de laranjas Pêra. Primeiro experimento.

Tratamento	Sólidos solúveis totais (°Brix)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	8,817 a	8,917 a
Imazalil	8,333 a	8,667 a
<i>Bacillus subtilis</i>	8,733 a	8,400 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	8,967 a	9,300 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	9,100 a	8,817 a
Com tratamento térmico	8,680 a	8,767 a
Sem tratamento térmico	8,900 a	8,873 a
CV (%)	5,757	6,297

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 8. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no sólidos solúveis totais dos frutos de laranjas Pêra. Segundo experimento.

Tratamento	Sólidos solúveis totais (°Brix)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	7,733 a	7,712 a
Imazalil	7,467 ab	7,600 a
<i>Bacillus subtilis</i>	7,183 b	7,183 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,417 ab	7,767 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	7,417 ab	7,633 a
Com tratamento térmico	7,600 a	7,593 a
Sem tratamento térmico	7,287 b	7,567 a
CV (%)	3,621	4,992

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

4.3.3. Ratio e rendimento de suco

A ratio (sólidos solúveis/acidez) é um parâmetro que indica a maturação do fruto. Na primeira repetição do experimento não houve diferença entre os

tratamentos em ambas as avaliações (Tabela 9). Na segunda repetição do ensaio, após 28 dias de armazenamento, ocorreu diferença entre os frutos tratados com *B. subtilis* (maior ratio) e *B. licheniformis*, porém nenhum tratamento diferiu da testemunha (Tabela 10).

O rendimento de suco não foi afetado pelos agentes de biocontrole ou pelo tratamento térmico (Tabela 11 e 12).

Tabela 9. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no Ratio dos frutos de laranjas Pêra. Primeiro experimento.

Tratamento	Ratio	
	14 dias	28 dias
Testemunha	11,883 a	11,767 a
Imazalil	11,517 a	11,400 a
<i>Bacillus subtilis</i>	11,450 a	11,050 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	10,183 a	10,667 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	10,900 a	11,750 a
Com tratamento térmico	11,080 a	11,253 a
Sem tratamento térmico	11,293 a	11,400 a
CV (%)	9,684	7,913

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 10. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no Ratio dos frutos de laranjas Pêra. Segundo experimento.

Tratamento	Ratio	
	14 dias	28 dias
Testemunha	9,467 a	10,400 ab
Imazalil	10,650 a	10,550 ab
<i>Bacillus subtilis</i>	10,133 a	11,533 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	9,800 a	9,767 b
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	9,517 a	10,367 ab
Com tratamento térmico	9,613 a	10,393 a
Sem tratamento térmico	10,213 a	10,653 a
CV (%)	10,962	8,550

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 11. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no rendimento de suco dos frutos de laranjas Pêra. Primeiro experimento.

Tratamento	Rendimento de suco (%)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	55,117 a	59,850 a
Imazalil	57,633 a	60,000 a
<i>Bacillus subtilis</i>	52,867 a	58,617 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	48,983 a	58,117 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	52,533 a	61,050 a
Com tratamento térmico	55,213 a	59,073 a
Sem tratamento térmico	51,64 a	59,980 a
CV (%)	16,974	3,774

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 12. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no rendimento de suco dos frutos de laranjas Pêra. Segundo experimento.

Tratamentos	Rendimento de suco (%)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	52,000 a	52,117 a
Imazalil	53,967 a	53,983 a
<i>Bacillus subtilis</i>	52,050 a	51,300 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	53,200 a	52,217 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	53,667 a	53,467 a
Com tratamento térmico	53,120 a	52,513 a
Sem tratamento térmico	52,833 a	52,720 a
CV (%)	3,091	3,387

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

4.3.4. Firmeza da polpa

Os resultados mostram-se inconsistentes, quanto à firmeza dos frutos. Na primeira repetição do experimento, após 14 dias de armazenamento, os frutos tratados termicamente apresentaram maior firmeza que os não tratados. No entanto, após 28 dias, não houve diferença (Tabela 13). Diferentemente, na segunda repetição do experimento não ocorreram diferenças com ou sem o tratamento térmico (Tabela 14).

Tabela 13. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na firmeza da polpa de frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento.

Tratamento	Firmeza da polpa (Resistência a penetração - N)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	7,592 ab	5,397 b
Imazalil	6,804 ab	9,193 a
<i>Bacillus subtilis</i>	4,781 b	6,011 ab
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,907 a	8,379 ab
<i>Bacillus subtilis</i> - Serenade	7,114 ab	6,321 ab
Com tratamento térmico	7,776 a	7,322 a
Sem tratamento térmico	5,903 b	6,799 a
CV (%)	25,907	30,082

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

No primeiro experimento, depois de 14 dias de armazenamento, nenhum agente de biocontrole e o imazalil diferenciaram da testemunha, apesar do *B. licheniformis* mostrar maior resistência à penetração da polpa que *B. subtilis*. No entanto, após 28 dias de armazenamento, o tratamento com Imazalil diferenciou do tratamento testemunha, apresentando maior firmeza da polpa (Tabela 13).

Tabela 14. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na firmeza da polpa de frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.

Tratamento	Firmeza da polpa (Resistência a penetração - N)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	10,829 ab	8,447 a
Imazalil	7,754 ab	10,176 a
<i>Bacillus subtilis</i>	6,432 b	9,314 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	9,797 ab	8,008 a
<i>Bacillus subtilis</i> - Serenade	11,928 a	9,926 a
Com tratamento térmico	10,229 a	9,435 a
Sem tratamento térmico	8,466 a	8,914 a
CV (%)	33,387	29,346

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Já na segunda repetição do ensaio, nenhum tratamento diferenciou da testemunha. Porém, após 14 dias de armazenamento o tratamento com *B. subtilis* - Serenade, apresentou maior firmeza da polpa que o *B. subtilis*, diferença que desapareceu após 28 dias de armazenamento (Tabela 14).

4.3.5. Perda de peso

Quatorze dias após o tratamento e armazenamento em câmara fria, houve diferença entre os tratamentos. O tratamento testemunha teve maior perda de peso, enquanto que os frutos tratados com imazalil e *B. subtilis* apresentaram menor perda. Os frutos tratados termicamente apresentaram maior perda de peso comparado ao não tratamento, após 14 dias de armazenamento. No entanto, após 28 dias de armazenamento, os tratamentos apresentaram perda de peso similar (Tabela 15).

Tabela 15. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole na perda de peso dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.

Tratamento	Perda de peso (%)	
	14 dias	28 dias
Testemunha	2,171 c	4,691 a
Imazalil	1,737 a	3,703 a
<i>Bacillus subtilis</i>	1,635 a	3,278 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	1,812 ab	4,056 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	1,997 bc	4,017 a
Com tratamento térmico	1,969 b	3,747 a
Sem tratamento térmico	1,771 a	4,150 a
CV (%)	7,39	23,34

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

4.3.6. Coloração da casca dos frutos [L* (luminosidade), C* (croma) e h° (ângulo Hue) ângulo de tonalidade]

Na primeira repetição do experimento, o valor L*, que indica a luminosidade dos frutos, não diferiu entre os tratamentos. Apenas o tratamento térmico

apresentou maior valor na avaliação após 14 dias de armazenamento, mas não diferiu após 28 dias de armazenamento (Tabela 16). Na segunda repetição do ensaio, diferenças entre os tratamentos ocorreram após 28 dias de armazenamento, onde o tratamento com imazalil apresentou maior L*. O tratamento térmico também apresentou maior valor L* (Tabela 17).

Tabela 16. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor L* dos frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento.

Tratamento	L*	
	14 dias	28 dias
Testemunha	72,242 a	71,448 a
Imazalil	73,590 a	73,337 a
<i>Bacillus subtilis</i>	72,183 a	71,327 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	72,543 a	72,010 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	72,082 a	72,382 a
Com tratamento térmico	72,999 a	72,211 a
Sem tratamento térmico	72,051 b	71,990 a
CV (%)	1,356	1,672

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 17. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor L* dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.

Tratamento	L*	
	14 dias	28 dias
Testemunha	68,037 a	70,667 b
Imazalil	69,045 a	72,988 a
<i>Bacillus subtilis</i>	68,528 a	70,580 b
<i>Bacillus licheniformis</i>	68,848 a	71,110 b
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	69,310 a	70,863 b
Com tratamento térmico	69,169 a	71,603 a
Sem tratamento térmico	68,338 a	70,881 b
CV (%)	2,990	1,246

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

C* é o parâmetro que indica a cromaticidade do fruto. Na primeira repetição do experimento, os frutos tratados termicamente, após 14 dias de armazenamento

apresentaram maior valor de C*, mas após 28 dias de armazenamento não foi observada diferença. Após 28 dias de armazenamento, os frutos tratados com imazalil e *B. licheniformis* apresentaram valor de C* superior ao da testemunha (Tabela 18).

Tabela 18. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor C* dos frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento.

Tratamento	C*	
	14 dias	28 dias
Testemunha	63,582 a	66,022 c
Imazalil	66,490 a	69,857 a
<i>Bacillus subtilis</i>	63,299 a	66,175 c
<i>Bacillus licheniformis</i>	65,235 a	68,708 ab
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	64,973 a	66,597 bc
Com tratamento térmico	65,569 a	67,850 a
Sem tratamento térmico	63,823 b	67,093 a
CV (%)	3,296	2,040

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Já na segunda repetição do ensaio, diferenças significativas de cromaticidade ocorreram apenas após 28 dias de armazenamento, onde houve interação entre os fatores. Sendo que os frutos tratados com imazalil + tratamento térmico superaram os frutos da testemunha + tratamento térmico. Nenhum agente de biocontrole diferenciou da testemunha, tanto comparado com ou sem tratamento térmico. Os frutos da testemunha sem tratamento térmico apresentaram maior valor de C* que a testemunha com tratamento térmico. Os frutos tratados com *B. subtilis* - Serenade + Tratamento térmico apresentaram o valor C* superior quando comparado ao tratamento com apenas o *B. subtilis* - Serenade (Tabela 20).

Tabela 19. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor C* dos frutos de laranja Pêra. Segundo experimento (14 dias de armazenamento).

Tratamento	C*
Testemunha	59,822 a
Imazalil	61,285 a
<i>Bacillus subtilis</i>	60,670 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	61,565 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	61,518 a
Com tratamento térmico	61,523 a
Sem tratamento térmico	60,421 a
CV (%)	4,272

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 20. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor C* dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento. (28 dias de armazenamento).

Tratamento	C*	
	Com TT	SEM TT
Testemunha	69,057 bB	71,887 aAB
Imazalil	73,303 aA	73,703 aA
<i>Bacillus subtilis</i>	70,323 aAB	69,423 aB
<i>Bacillus licheniformis</i>	72,000 aAB	71,013 aAB
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	71,993 aAB	69,067 bB
CV (%)	1,774	

Médias seguidas da mesma letra minúscula (linha) e maiúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

O valor h° (ângulo Hue) ângulo de tonalidade é um parâmetro que indica a tonalidade do fruto. Na primeira repetição do ensaio ocorreram diferenças apenas após 28 dias de armazenamento, onde ocorreu interação entre os fatores. Os frutos tratados com *B. licheniformis* apresentaram maior valor de h° que os tratados com *B. licheniformis* + tratamento térmico. Os frutos tratados com Serenade + Tratamento térmico apresentaram maior h° que Serenade sem tratamento térmico. Os tratamentos Imazalil + tratamento térmico e Serenade + tratamento térmico apresentaram os frutos com maior h° que o tratamento térmico sozinho. O tratamento Imazalil apresentou maior h° que a testemunha sem tratamento térmico (Tabela 22). Na segunda repetição do ensaio, não houve interação entre os fatores.

Diferenças ocorreram apenas após 28 dias de armazenamento onde frutos tratados com imazalil apresentaram maior valor de h° (Tabela 23).

Tabela 21. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor h° dos frutos de laranja Pêra. Primeiro experimento (14 dias de armazenamento).

Tratamento	h°
Testemunha	86,445 a
Imazalil	87,817 a
<i>Bacillus subtilis</i>	87,320 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	86,188 a
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	86,995 a
Com tratamento térmico	86,352 a
Sem tratamento térmico	87,554 a
CV (%)	2,562

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 22. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor h° dos frutos de laranja Pêra. Primeiro Experimento (28 dias de armazenamento).

Tratamento	h°	
	Com TT	SEM TT
Testemunha	80,567 aBC	80,877 aB
Imazalil	83,993 aA	83,757 aA
<i>Bacillus subtilis</i>	81,437 aB	80,917 aB
<i>Bacillus licheniformis</i>	78,803 bC	80,423 aB
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	83,857 aA	80,800 bB
CV (%)	1,117	

Médias seguidas da mesma letra minúscula (linha) e maiúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Tabela 23. Efeito do tratamento térmico associado a agentes de biocontrole no valor h° dos frutos de laranja Pêra. Segundo Experimento.

Tratamento	h°	
	14 dias	28 dias
Testemunha	90,538 a	76,938 b
Imazalil	92,590 a	82,588 a
<i>Bacillus subtilis</i>	90,780 a	76,695 b
<i>Bacillus licheniformis</i>	89,845 a	76,685 b
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	90,597 a	77,287 b
Com tratamento térmico	91,069 a	78,494 a
Sem tratamento térmico	90,671 a	77,583 a
CV (%)	2,112	1,686

Médias seguidas da mesma letra (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

4.4. Controle de *Penicillium digitatum* com agentes de biocontrole e tratamento térmico em armazenamento a temperatura de 20 °C

No primeiro ensaio, na associação do tratamento térmico e os agentes de biocontrole em temperatura de 20 °C de armazenamento com UR > 90%, o tratamento térmico reduziu a AACPD. Os agentes de biocontrole não reduziram a AACPD. Novamente o fungicida, neste caso o tiabendazol (485 g i.a. 100 L⁻¹), controlou o bolor verde, independentemente da associação com o tratamento térmico (Tabela 24).

Tabela 24. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Primeiro experimento.

Tratamento	AACPD	
	Com Tratamento Térmico	Sem Tratamento Térmico
Testemunha	219,99 aBC	333,67 bB
Tiabendazol	0 aA	0 aA
<i>Bacillus subtilis</i>	265,72 aC	318,75 bB
<i>Bacillus licheniformis</i>	185,92 aB	319,06 bB
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	212,62 aBC	316,02 bB
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	216,07 aBC	304,25 bB
CV (%)	12,97	

Médias seguidas da mesma letra minúscula (linha) e maiúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

Na segunda repetição do ensaio, não houve interação entre os fatores, o tratamento térmico reduziu a AACPD. Entre os tratamentos, apenas o tiabendazol foi efetivo na redução da AACPD, porém também não evitou que ocorresse a doença (Tabela 25).

Tabela 25. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Segundo experimento.

Tratamento	AACPD	
Testemunha	312,54	b
Tiabendazol	93,03	a
<i>Bacillus subtilis</i>	325,19	b
<i>Bacillus licheniformis</i>	342,98	b
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	344,63	b
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	298,85	b
Com Tratamento Térmico	268,60	a
Sem Tratamento Térmico	303,81	b
CV (%)	10,50	

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

No ensaio em que os frutos tratados termicamente foram tratados com os agentes de biocontrole após o resfriamento, observou-se resultados similares. No primeiro ensaio, ocorreu interação, sendo que apenas o tratamento térmico isoladamente e o *Bacillus licheniformis* + Tratamento térmico reduziram a doença quando comparado a não utilização do tratamento térmico. Entre os tratamentos, apenas o fungicida reduziu a AACPD (Tabela 26).

Tabela 26. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole (tratados após o resfriamento dos frutos), sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Primeiro experimento.

Tratamento	AACPD	
	Com Tratamento Térmico	Sem Tratamento Térmico
Testemunha	306,07 aA	363,61 bA
Tiabendazol	184,08 aB	142,59 aB
<i>Bacillus subtilis</i>	334,60 aA	357,15 aA
<i>Bacillus licheniformis</i>	294,73 aA	360,20 bA
<i>Bacillus subtilis</i> - Serenade	329,31 aA	353,90 aA
CV (%)	8,06	

Médias seguidas da mesma letra minúscula (linha) e maiúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

No segundo ensaio não houve interação entre os fatores. O tratamento térmico novamente reduziu a AACPD. Enquanto que entre os tratamentos, apenas o fungicida reduziu a AACPD (Tabela 27).

Tabela 27. Efeito do tratamento térmico, associado a agentes de biocontrole (tratados após o resfriamento dos frutos), sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do Bolor Verde causado por *Penicillium digitatum* em laranja Pêra. Ensaio em armazenamento dos frutos a 20 °C. Segundo experimento.

Tratamento	AACPD	
Testemunha	326,71	b
Tiabendazol	87,61	a
<i>Bacillus subtilis</i>	319,98	b
<i>Bacillus licheniformis</i>	323,95	b
<i>Bacillus subtilis</i> – Serenade	332,33	b
Com Tratamento Térmico	250,35	a
Sem Tratamento Térmico	305,88	b
CV (%)	8,52	

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey ao nível de 5% de probabilidade).

5. DISCUSSÃO

O potencial do tratamento térmico no controle de *P. digitatum* em pós-colheita é reconhecido e os resultados do presente trabalho confirmam a informação, e mostram que o tratamento térmico reduziu a AACPD do bolor verde (Tabela 1, 2, 24, 25, 26 e 27). Nafussi et al. (2001) verificaram que a imersão de limões em água a 52-53 °C por 2 minutos, um ou dois dias após a inoculação, inibiram em 100 e 90%, respectivamente, o bolor verde por até seis dias. De maneira similar, trabalhando com toranja Oroblanco, Rodov et al. (2000) verificaram que o tratamento com água a 52 °C por 2 minutos ou o tratamento de cura (36 °C por 72 h) reduziram a incidência de doenças em pós-colheita, principalmente as causadas por *Penicillium*, após 15 semanas de armazenamento. A redução na incidência de bolor verde, em tangerina Minneola, laranja Shamouti e toranja Star Ruby orgânicas, após a lavagem rápida (20 segundos) com água a 56 °C e escovação simultânea, foi verificada por Porat et al. (2000a). A imersão de tangerinas por 2 minutos em água a 56 °C reduziu em 80% a incidência de *P. digitatum* (PUAWONGPHAT, NIAMJANG e SANGCHOTE, 2008). Esses resultados mostram que o tratamento térmico pode ser utilizado, dentro de uma estratégia, para a redução de resíduos de pesticidas em frutos cítricos e, inclusive obter o desejado resíduo zero de pesticidas em frutos.

Embora o tratamento térmico tenha reduzido o progresso da doença, foi demonstrado no presente trabalho que ele não evitou que a doença ocorresse (Tabela 1, 2, 24, 25, 26 e 27). Similarmente em tangerinas Satsuma, o tratamento térmico a 52 °C, 55 °C e

60 °C por, respectivamente, 120, 60 e 20 segundos, reduziu o desenvolvimento dos bolores verde e azul, armazenados 21 dias a 5 °C e sete dias a 18 °C (HONG, LEE e KIM, 2007). O tratamento térmico não causa a morte total dos conídios de *Penicillium*, pois o tratamento desses a 52-53 °C, por dois minutos, seguidos da inoculação em limões, não preveniu a ocorrência da doença, mas houve um atraso no seu desenvolvimento (NAFUSSI et al., 2001). Porat et al. (2000a) verificaram que os conídios de *P. digitatum* têm a germinação inibida quando submetidos a temperaturas elevadas (59 e 62 °C) por curtos períodos (15 a 20 segundos, respectivamente), mas a 56 °C é apenas reduzida (tratamento por 20 segundos) e atrasada (tratamento de 10 e 15 segundos). Assim, o tratamento térmico não é curativo, mas sim fungistático e não persistente (PALOU et al., 2002). Portanto, a temperatura do tratamento térmico utilizada no presente trabalho não foi suficiente para erradicar o fitopatógeno, mas possivelmente reduziu a pressão inicial de inóculo e retardou o progresso da doença. Esse conhecimento é importante no desenvolvimento de estratégia de controle da doença, indicando a necessidade de associação com outros métodos de controle.

O tratamento térmico com escovação (60 °C por 20 segundos) em nectarinas, 24 h após a inoculação com *P. expansum*, reduziu mais de 50% das unidades formadoras de colônias do patógeno, refletindo em menor incidência da doença nesses frutos quando comparado ao tratamento logo após a inoculação (KARABULUT et al., 2002). Os autores completam que para *Monilinia fructicola*, ambos os tratamentos reduziram a doença, possivelmente pelo fato de apresentar a germinação mais rápida nos ferimentos (2-3 h) do que *P. expansum* (15-24 h). Como a germinação dos esporos e a alongação do tubo germinativo são mais sensíveis do que esporos dormentes ao tratamento térmico (FALLIK e LURIE, 2007), possivelmente, no presente estudo, o tratamento térmico uma hora após a inoculação, não causou grande efeito erradicante nos conídios, permitindo a ocorrência da doença.

A AACPD pode ter sido reduzida pela indução de resistência nos frutos. Segundo Nafussi et al. (2001), frutos de limão, feridos e inoculados, apresentaram um aumento do depósito de lignina no sítio de inoculação. Esse aumento foi maior quando os frutos foram tratados com água a 53 °C, atingindo 200% do valor inicial após uma semana. Adicionalmente, frutos tratados com o banho térmico, dois dias após a inoculação com *P. digitatum*, apresentaram aumento de escoparina e escopoletina. A quantidade de escoparina no 2º dia foi três vezes superior a necessária para inibir a alongação do tubo germinativo de *P.*

digitatum. Os autores alertam que a síntese de lignina e fitoalexinas somente são estimuladas pelo tratamento térmico se presente ferimentos ou patógeno nos frutos. No presente trabalho não foram realizados estudos sobre a produção de compostos indutores de resistência.

Ballester et al. (2010) verificaram que o fermento seguido de inoculação com *P. digitatum* em laranjas Navelate, 24 horas após a realização do tratamento térmico com ar quente (37 °C por três dias), aumentou a resistência dos frutos contra o bolor verde, após nova inoculação, três dias após o tratamento. Segundo os autores, a indução de resistência deve-se a atividade de fenilalanina amônia-liase (parcialmente responsável pelo aumento de escoparina) e peroxidases solúveis. Ainda, aumentaram a defesa dos frutos β -1,3-glucanase e quitinase isoformas. O tratamento de cura (sem ferir e inocular *P. digitatum* antes do tratamento), não induziu resistência nos frutos contra posterior inoculação do fitopatógeno (BALLESTER et al., 2010). A indução de resistência a *P. digitatum*, em frutos de toranja, tratados e escovados em água a 62 °C por 20 segundos, foi demonstrada por Pavoncello et al. (2001), mas a indução foi temporária e rápida. Os autores completam que em temperatura de 53 °C não houve indução de resistência. Essa resistência pode estar associada à indução de proteínas quitinases e β -1,3-glucanases. Assim, seria importante realizar estudos dessa natureza nos próximos ensaios.

Quanto ao controle do bolor verde por meio dos agentes de biocontrole, é conhecido que a maioria dos agentes de biocontrole em pós-colheita não é erradicante, mas proporcionam proteção dos frutos contra novas infecções. Assim, associar outros métodos de controle ao biológico é necessário para obter sucesso prático de controle da doença. Entretanto, de forma geral, os estudos são desenvolvidos apenas utilizando um dos métodos de controle.

Na literatura são disponíveis diversos trabalhos demonstrando a eficiência de bactérias do gênero *Bacillus* no controle de doenças de pós-colheita. Também para o controle de *Penicillium* essas bactérias apresentam eficiência. Essa eficiência pode ser constatada no trabalho de Hao et al. (2011) que verificaram que o tratamento de tangerina com *Bacillus amyloliquefaciens* (HF-01), pouco antes da inoculação de *P. digitatum* e *P. italicum*, reduziu a incidência das doenças. Além disso, *in vitro*, o antagonista apresentou ação antifúngica contra esses fitopatógenos. Leelasuphakul, Hemmanee e Chuenchitt (2008) também verificaram que o tratamento de frutos cítricos com endósporos de *B. subtilis* 155 ou

seus metabólitos reduziram a incidência, severidade e retardaram o início dos sintomas do bolor verde. O controle só ocorreu quando os frutos foram tratados antes (melhor ação de endósporos) ou junto (melhor ação dos metabólitos secundários) da inoculação com fitopatógeno. Quando tratado 24 h após a inoculação com o fitopatógeno, ocorreu elevada incidência da doença. Segundo os autores, isso se deve aos endósporos necessitarem um período para iniciarem as atividades, enquanto os metabólitos estão prontamente ativos contra *P. digitatum*. Esses resultados estão de acordo com o do presente trabalho, pois todos os produtos utilizados continham endósporo de *Bacillus* (Tabela 1, 2, 24, 25, 26 e 27).

A importância do momento do tratamento com esses organismos pode ser verificada no trabalho de Arrebola, Jacobs e Korsten (2010). Esses autores demonstraram que a aplicação de *B. amyloliquefaciens* (PPCB004) em frutos de laranja (24 h antes ou depois da inoculação com o fitopatógeno) apresentou controle diferenciado, variando com o patógeno. Para *Colletotrichum gloeosporioides* a aplicação após a inoculação apresentou melhor controle. Para *P. crustosum* e *Alternaria citri*, melhor controle foi obtido com a aplicação do antagonista antes da inoculação. Assim, possivelmente no presente trabalho poderia ter ocorrido controle superior se o tratamento com os antagonistas tivesse ocorrido antes da inoculação.

De 10 isolados de leveduras e 10 de *Bacillus*, selecionados para controle de *P. digitatum* em limão, laranja Naval e Valência, todos reduziram a doença em pelo menos uma cultivar, quando aplicados 3 antes da inoculação com *P. digitatum*. Porém quando aplicados três horas após a inoculação não houve redução da doença (ABRAHAM, LAING e BOWER, 2010). Os autores completam que as leveduras, quando aplicadas antes da inoculação do fitopatógeno, ocupam os ferimentos dos frutos e utilizam todo o nutriente liberado, evitando que ocorram estímulos para a germinação dos esporos de *P. digitatum*, isso não ocorre quando aplicado após a inoculação. No presente estudo, pode ter ocorrido algo semelhante, onde os conídios de *P. digitatum* germinaram e ocuparam o sítio de infecção antes dos agentes de biocontrole (Tabela 1, 24, 25, 26 e 27). Uma exceção pode ter ocorrido na primeira repetição do experimento simulando sistema comercial em temperatura de armazenamento de 10 °C, onde os isolados podem ter ocupado parte do sítio de inoculação antes do estímulo da germinação, reduzindo a AACPD (Tabela 2).

É comum a inconsistência de resultados em ensaios com agentes de biocontrole, conforme pode ser verificado nas Tabela 1 e 2 do presente trabalho. Brown, Davis e Chambers (2000) obtiveram controle de *P. digitatum* com *Candida oleophila* (Aspire®) em apenas dois de quatro ensaios, quando o agente de biocontrole e o patógeno foram aplicados simultaneamente em fermentos de laranja. Puawongphat, Niamjang e Sangchote (2008) trabalhando com *Candida utilis* verificaram que o bioagente reduziu em 100% a incidência de *P. digitatum* quando tratados 12-24 h antes da inoculação do patógeno tangerina. Quando os frutos foram tratados 6 h antes ou menos, ou após a inoculação do patógeno, o controle foi reduzido gradualmente. Quando aplicado 24 h antes de *P. digitatum*, *C. famata* elícita a formação de fitoalexinas em grandes quantidades. No entanto, esse modo de ação é limitante, pois a biossíntese é lenta, começando a ter ação fungistática apenas dois dias após o tratamento (ARRAS, 1996). O autor completa que a biossíntese de fitoalexinas é dependente da espécie de fruto cítrico, tamanho do fermento, levedura antagônica, concentração e tempo de inoculação. Assim, diversos fatores podem causar variações nos resultados, como os obtidos no presente estudo.

Embora a maioria dos resultados foi negativo quanto a possível ação curativa dos agentes de biocontrole testados, nosso maior objetivo foi testar a hipótese da integração dos métodos de controle, onde o tratamento térmico supostamente reduziria a fonte de inóculo, permitindo a ocupação do sítio de infecção pelos agentes de biocontrole, principalmente com *Bacillus* que apresenta tolerância a altas temperaturas. Observou-se que apenas na primeira repetição do experimento em temperatura de armazenamento de 10 °C o tratamento térmico aumentou a eficiência dos agentes de biocontrole (Tabela 1). Entretanto, outros autores obtiveram sucesso com essa integração. A redução da incidência do bolor verde e azul foi atingida com a adoção do tratamento térmico (45 °C por 2 minutos) seguido do tratamento com *B. subtilis* (F1, L2 ou L2-5). A associação dos bioagentes com o tratamento térmico atingiu níveis de controle semelhantes ao fungicida (OBAGWU e KORSTEN, 2003). A associação de tratamento térmico (60 °C por 40 segundos) com *B. subtilis* (CPA-8) apresentou sinergismo no controle de *Monilinia laxa* em pêssegos incubados por cinco dias a 20 °C (CASALS et al., 2010).

O potencial aumento da eficiência de *Bacillus* no controle de doenças em pós-colheita, quando associados com o tratamento térmico, pode ser devido ao tratamento

térmico eliminar parte dos conídios enquanto o agente de biocontrole protege o fruto de conídios sobreviventes. Casals et al. (2010) verificaram que o mesmo tratamento não surtiu efeito quando os frutos foram armazenados por 21 dias a 0 °C e, seguidamente submetidos a 20 °C por 5 dias. Segundo eles, possivelmente o *B. subtilis* apresenta baixo crescimento nesta temperatura e não controla a doença, enquanto que *M. laxa* desenvolve-se normalmente. No entanto, Govender, Korsten e Sivakumar (2005), em frutos de manga, recuperaram *B. licheniformis* em tratamento integrado com tratamento térmico (45 °C por 5 minutos), prochloraz e cera, seguido do armazenamento a 10 °C por 21 dias. A população apenas diminuiu quando os frutos foram seguidamente armazenados, em temperatura de 20 °C por sete dias. Hao et al. (2011) obtiveram resultados que a população de *Bacillus amyloliquefaciens* foi elevada tanto em 25 °C (96 horas) quanto a 6 °C (28 dias).

Devido a esses resultados de diferenças entre adaptação de *Bacillus* à temperaturas (CASALS et al., 2010; GOVENDER, KORSTEN e SIVAKUMAR, 2005) e o potencial *P. digitatum* desenvolver-se em temperaturas abaixo de 10 °C (FEICHTENBERGER et al., 2005), foram instalados dois ensaios para testar se a temperatura de 10 °C desfavoreceu os isolados de *Bacillus* testados. Nestes ensaios, o armazenamento dos frutos tratados foram a 20 °C. No entanto, os resultados continuaram mostrando que os agentes de biocontrole não reduziram o progresso da doença, assim a temperatura não foi um fator fundamental na falha do controle da doença (Tabela 24 e 25). Foi observado que no segundo ensaio, os frutos deterioraram mais rapidamente, inclusive o tratamento com fungicida mostrando moderada AACPD, possivelmente pelo motivo dos frutos estarem em estágio de maturação mais avançado, sendo mais suscetíveis ao ataque do patógeno.

Com a hipótese de que o resfriamento dos frutos em água em temperatura ambiente, após o tratamento térmico com agentes de biocontrole, poderia remover os agentes de biocontrole, outros dois ensaios foram realizados, em que os tratamentos com os agentes de biocontrole foram realizados após o resfriamento dos frutos. Os dados mostram que não ocorreu nenhuma melhora no controle da doença (Tabela 26 e 27).

A conclusão é que os agentes de biocontrole testados não exercem controle curativo, após a inoculação do fitopatógeno, mesmo quando associado ao tratamento térmico.

Quando avaliado o controle de podridões de ocorrência natural em pós-colheita, os agentes de biocontrole não exerceram controle, mais uma vez mostrando não serem eficientes no controle curativo contra patógenos já estabelecidos.

Por sua vez, o tratamento térmico apresentou grande redução, tanto sozinho quanto associado aos agentes de biocontrole, mas apenas no primeiro ensaio. Isso evidenciando a maior ação contra patógenos já estabelecidos, do que esporos não germinados. Desse modo, comprova-se que o tratamento térmico é uma excelente ferramenta utilizada no recebimento dos frutos no “packinghouse” a fim de reduzir o potencial de inóculo vindo do campo. O efeito do tratamento térmico nessas condições tem seu potencial no controle de doenças em pós-colheita de citros reconhecido (HONG, LEE e KIM, 2007; OBAGWU e KORSTEN, 2003; PORAT et al., 2000a), principalmente contra *P. digitatum* (NAFUSSI et al., 2001), o principal patógeno detectado causando doença naturalmente no presente experimento. No entanto, no segundo ensaio não foi observada esta redução do tratamento térmico comparado à testemunha (sem qualquer tratamento), porém a testemunha apresentou incidência reduzida no segundo ensaio comparado ao primeiro, possivelmente sendo a causa da não observação de diferenças.

De um modo geral, a qualidade dos frutos, avaliada por diversas características, não foi alterada pelos tratamentos, tanto térmico, quanto biológico (Tabela 5 a 23). Esses resultados estão de acordo com diversos disponíveis na literatura. Porat et al. (2000b) também não verificaram diferenças na acidez e sólidos solúveis totais em frutos de toranja Star Ruby, após tratadas com imersão em água quente (53 °C por 2-3 min.) ou lavagem e escovação em água quente (55 °C e 60 °C por 30 seg.), seguido de armazenamento por seis semanas a 2 °C e uma semana a 20 °C. Também Hong, Lee e Kim (2007) verificaram que o tratamento com água quente a 52°C (2 min), 55 °C (1 min) ou 60 °C (20 seg.) não alterou as propriedades químicas, como pH, sólidos solúveis, acidez, ratio, perda de peso, firmeza, L*, C* e °h da tangerina satsuma.

No presente estudo foi observada uma maior firmeza dos frutos pelo tratamento térmico após 14 dias de armazenamento, no primeiro experimento (Tabela 13). Resultados semelhantes foram observados por Rodov et al. (2000) quando toranjas Oroblanco, acondicionadas em embalagens plásticas ou selados individualmente, após o tratamento térmico a 52 °C por dois minutos apresentaram maior firmeza dos frutos. Segundo os autores,

o tratamento térmico pode inibir enzimas responsáveis pelo amolecimento do fruto ou mesmo elicitando o fortalecimento da parede celular, como exemplo pela lignificação. No entanto, após 28 dias de armazenamento não foi observada diferença da firmeza da polpa. No segundo experimento também não foram observadas diferenças.

6. CONCLUSÕES

1. Os agentes de biocontrole avaliados (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Sporodiobolus pararoseus*) não foram eficazes no controle do bolor verde, independente do tratamento térmico, junto de laranjas Pêra.

2. A qualidade físico-química dos frutos de laranja Pêra não foi afetada pelos tratamentos avaliados.

3. O tratamento térmico reduziu o progresso do bolor verde em frutos de laranja.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A. O.; LAING, M. D.; BOWER, J. P. Isolation and *in vivo* screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. **Biological Control**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 32-38, Apr. 2010.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th. ed. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. 922 p.

ARRAS, G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 191-198, Jul. 1996.

ARRAS, G.; SCHERM, B.; MIGHELI, Q. Improving biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 12, n. 5, p. 547-553, Oct 2002.

ARREBOLA, E.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 386-395, Feb. 2010.

ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; BACIGALUPO, R.; KORSTEN, L. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 369-377, Apr. 2010.

ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. **Biological Control**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 122-128, Apr. 2010.

BALLESTER, A. R.; IZQUIERO, A.; LAFUENTE, M. T.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium*

digitatum in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 31-38, Apr. 2010.

BARMORE, C. R.; BROWN, G. E. Spread of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* during contact between citrus fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 116-120, 1982.

BENHAMOU, N. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 693-705, Jul. 2004.

BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 9, p. 932-943, Sept. 2000.

BRASIL, Ministério do planejamento, orçamento e gestão. Indicadores IBGE - estatística da produção agrícola 2011. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201110.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2011.

BROWN, G. E.; DAVIS, C.; CHAMBERS, M. Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 57-65, Jan. 2000.

CASALS, C. ; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I.; SILVERA, E.; LAMARCA, N.; USALL, J. Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 128, n. 1, p. 51-63, Sept. 2010.

DROBY, S. ; COHEN, L.; RAFAEL, G.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D. The biochemical basis of pathogenicity and host-specificity of *Penicillium digitatum* on citrus. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 877, p. 1663-1673, 2010.

DROBY, S. ; EICK, A.; MACARISIN, D.; COHEN, L.; RAFAEL, G.; STANGE, R.; MCCOLUM, G.; DUDAI, N.; NASSER, A.; WISNIEWSKI, M.; SHAPIRA, R. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 386-396, Sept. 2008.

EL-GHAOUTH, A. ; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; SMILANICK, J. L.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of citrus fruit. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Biological control of crop diseases**. New York: Marcel Dekker, 2002. cap. 13, p. 289-312.

FALLIK, E.; LURIE, S. Thermal control of fungi in the reduction of postharvest decay. In: TANG, J. et al. (Eds.). **Heat treatments for postharvest pest control: theory and practice**. Wallingford: CAB International, 2007. cap. 7, p.162-181.

FEICHTENBERGER, E. BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. ; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agrônomicas Ceres, 2005. v. 2, cap. 28, p. 239-269.

FIALHO, M. B. ; TOFFANO, L.; PEDROSO, M. P.; AUGUSTO, F.; PASCHOLATI, S. F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, n. 5, p. 925-932, May 2010.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 219-226, mai-jun. 2008.

FISCHER, I. H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de "packinghouse". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 4, p. 304-310, jul-ago. 2007.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle de bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 569-572, ago. 2002.

GOVENDER, V.; KORSTEN, L.; SIVAKUMAR, D. Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 57-65, Oct. 2005.

HAO, W. N.; LI, H.; HU, M. Y.; YANG, L.; RIZWAN-UL-HAQ, M. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 316-323, Mar. 2011.

HONG, S. I.; LEE, H. H.; KIM, D. Effects of hot water treatment on the storage stability of satsuma mandarin as a postharvest decay control. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 271-279, Feb. 2007.

IZGU, D. A.; KEPEKCI, R. A.; IZGU, F. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 99, n. 1, p. 85-91, Jan. 2011.

JANISIEWICZ, W. J.; SAFTNER, R. A.; CONWAY, W. S.; YODER, K. S. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists

and sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 374-378, Sept. 2008.

KARABULUT, O. A.; COHEN, L.; WIESS, B.; DAUS, A.; LURIE, S.; DROBY, S. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 103-111, Mar. 2002.

KINAY, P.; MANSOUR, M. F.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 647-656, Apr. 2007.

KYRIACOU, M. C. Influence of a post-harvest hot water treatment on the development of green mould [*Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc.] and on the quality of 'Mandora' fruit [*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 86, n. 4, p. 359-365, 2011.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. San Diego: Elsevier Academic, 2008. 558 p.

LAHLALI, R.; MASSART, S.; DE CLERCQ, D.; SERRHINI, M. N.; CREEMERS, P.; JIJAKLI, M. H. Assessment of *Pichia anomala* (strain K) efficacy against blue mould of apples when applied pre- or post-harvest under laboratory conditions and in orchard trials. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 1, p. 37-45, Jan. 2009.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLLETA FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. cap. 18, p. 509-566.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 113-121, Apr. 2008.

LI, Q. L.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J. B.; LI, G. Q.; HSIANG, T. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 157-165, Nov. 2010.

LIU, H. M.; GUO, J. H.; LIU, P.; CHENG, Y. J.; WANG, B. Q.; LONG, C. A.; DENG, B. X. Inhibitory activity of tea polyphenol and *Candida ernobii* against *Diplodia natalensis* infections. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 3, p. 1066-1072, Mar. 2010.

LUCON, C. M. M.; GUZZO, S. D.; DE JESUS, C. O.; PASCHOLATI, S. F.; DE GOES, A. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 766-772, Jul. 2010.

MACARISIN, D.; COHEN, L.; EICK, A.; RAFAEL, G.; BELAUSOV, E.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 11, p. 1491-1500, Nov. 2007.

MACARISIN, D.; DROBY, S.; BAUCHAN, G.; WISNIEWSKI, M. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 194-202, Dec. 2010.

MATTOS, L. P. V. **Controle de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole.** 2010. 104 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

NAFUSSI, B.; BEN-YEHOSHUA, S.; RODOV, V.; PERETZ, J.; OZER, B. K.; D'HALLEWIN, G. Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 49, n. 1, p. 107-113, Jan. 2001.

NIETO-ANGEL, D.; AGUILAR-PEREZ, L. A.; LARA-VIVEROS, F. M. Effect of three fungicides and sodium bicarbonate for the control of *Penicillium digitatum* *in vitro*. In: AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY ANNUAL MEETING, 2009, Portland. **Abstracts...** Portland: APS, 2009. p. S93.

OBAGWU, J.; KORSTEN, L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 187-194, Apr. 2003.

ONGENA, M.; JACQUES, P.; TOURÉ, Y.; DESTAIN, J.; JABRANE, A.; THONART, P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, n. 1, p. 29-38, Nov. 2005.

OSMAN, M. S.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 173-178, Feb. 2011.

PALOU, L. ; USALL, J.; MUÑOZ, J. A.; SMILANICK, J. L.; VIÑAS, I. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 93-96, Jan. 2002.

PAVONCELLO, D.; LURIE, S.; DROBY, S.; PORAT, R. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, n. 1, p. 17-22, Jan. 2001.

PÉREZ, E. ; BLANCO, O.; BERRETA, C.; DOL, I.; LADO, J. Imazalil concentration for *in vitro* monitoring of imazalil resistant isolates of *Penicillium digitatum* in citrus packinghouses. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 258-262, Jun. 2011.

PIMENTA, R. S.; SILVA, F. L.; SILVA, J. F. M.; MORAIS, P. B.; BRAGA, D. T.; ROSA, C. A.; CORRÊA, A. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 85-90, Jan-Mar. 2008.

PLAZA, P.; SANBRUNO, A.; USALL, J.; LAMARCA, N.; TORRES, R.; PONS, J.; VIÑAS, I. Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 29-37, Oct. 2004a.

PLAZA, P.; TORRES, R.; USALL, J.; LAMARCA, N.; VIÑAS, I. Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 79, n. 6, p. 935-940, Nov. 2004b.

PLAZA, P.; USALL, J.; SMILANICK, J. L.; LAMARCA, N.; VIÑAS, I. Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n. 4, p. 781-786, Apr. 2004c.

PLAZA, P.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 549-554, 2003.

PORAT, R.; DAUS, A.; WEISS, B.; COHEN, L.; FALLIK, E.; DROBY, S. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 151-157, Mar. 2000a.

PORAT, R.; PAVONCELLO, D.; PERETZ, J.; BEN-YEHOSHUA, S.; LURIE, S. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 159-165, Mar. 2000b.

PRUSKY, D.; MCEVOY, J. L.; SAFTNER, R.; CONWAY, W. S.; JONES, R. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 1, p. 44-51, Jan. 2004.

PUAWONGPHAT, B.; NIAMJANG, S.; SANGCHOTE, S. Control of green mold (*Penicillium digitatum*) on tangerine fruit by hot water and imazalil treatment, and with antagonistic yeasts. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 773, p. 39-44, 2008.

RODOV, V.; AGAR, T.; PERETZ, J.; NAFUSSI, B.; KIM, J. J.; BEN-YEHOSHUA, S. Effect of combined application of heat treatments and plastic packaging on keeping quality of

'Oroblanco' fruit (*Citrus grandis* L. x *C. paradisi* Macf.). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 287-294, Nov. 2000.

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, n. 8, p. 1491-1502, Aug. 2010.

SCHIRRA, M.; PALMA, A.; BARBERIS, A.; ANGIONI, A.; GARAU, V. L.; CABRAS, P.; D'AQUINO, S. Postinfection Activity, Residue Levels, and Persistence of Azoxystrobin, Fludioxonil, and Pyrimethanil Applied Alone or in Combination with Heat and Imazalil for Green Mold Control on Inoculated Oranges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 58, n. 6, p. 3661-3666, Mar. 2010.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. Effect of Nitrogen-Fertilization on Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, Dordrecht, v. 50, n. 3, p. 205-221, Sept. 2009.

SMILANICK, J. L.; MANSOUR, M. R. Influence of temperature and humidity on survival of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 8, p. 990-996, Aug. 2007.

TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; PALOU, L.; ASENSIO, A.; NUNES, C.; VIÑAS, I. Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 7, p. 685-694, Sept. 2001.

TORRES, R.; USALL, J.; PLAZA, P.; TEIXIDÓ, N.; ABADIAS, M.; VIÑAS, I. Alternativas al uso de fungicidas de síntesis para el control de podredumbres en cítricos. In: NASCIMENTO, L. M.; DE NEGRI, J. D.; MATTOS JUNIOR, D. (Ed.). **Tópicos em qualidade e pós-colheita de frutas**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2008. cap. 14, p.189-199.

TOURÉ, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, P.; GUIRO, A.; THONART, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 5, p. 1151-1160, 2004.

USALL, J.; SMILANICK, J.; PALOU, L.; DENIS-ARRUE, N.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; VIÑAS, I. Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 1-7, Oct. 2008.

USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; FONS, E.; VIÑAS, I. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 83-92, Jun. 2000.

VIÑAS, I.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; SANCHIS, V. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 9-16, Mar. 1998.

WARRIOR, P.; KONDURU, K.; VASUDEVAN, P. Formulation of biological control agents for pest and disease management. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Biological control of crop diseases**. New York: Marcel Dekker, 2002. cap. 18, p. 421-441.

ZAMANI, M.; TEHRANI, A. S.; AHMADZADEH, M.; BEHBOODI, K.; HOSSEININAVEH, V. Biological control of *Penicillium digitatum* on oranges using *Pseudomonas* spp. either alone or in combination with hot sodium bicarbonate dipping. **Australasian Plant Pathology**, Adelaide, v. 37, n. 6, p. 605-608, 2008.