

## Extrato de alga no manejo do bolor verde em pós-colheita de citros

### Management of green mold in postharvest citrus with seaweed extract

### Extracto de algas em el manejo del moho verde em poscosecha de cítricos

Recebido: 06/07/2021 | Revisado: 15/07/2021 | Aceito: 20/07/2021 | Publicado: 28/07/2021

**Maria Eduarda Ferreira Naves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5402-7055>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [menaves16@gmail.com](mailto:menaves16@gmail.com)

**Natália Moreira Mafra**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0083-0867>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [natalia.mafra@ifsuldeminas.edu.br](mailto:natalia.mafra@ifsuldeminas.edu.br)

**Dalilla Carvalho Rezende**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5572-4901>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [dalilla.rezende@ifsuldeminas.edu.br](mailto:dalilla.rezende@ifsuldeminas.edu.br)

#### Resumo

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a eficácia de diferentes dosagens de um produto à base de extrato da alga *Ascophyllum nodosum* no manejo do bolor verde em pós-colheita de citros. Utilizou-se as dosagens de 0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup> do produto comercial à base do extrato da alga, como comparativo, um fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis. Foram realizados experimentos *in vitro* para verificar o efeito do produto à base do extrato da alga e seus possíveis mecanismos de ação, por meio das seguintes análises: crescimento micelial, esporulação, perda de eletrólitos e atividade fungicida e/ou fungistática. Em seguida, realizou-se experimento *in vivo* a fim de se avaliar a incidência e severidade do bolor verde nos frutos de laranja 'Valencia' tratados com o produto. Foi observado que as dosagens de 75 e 100 mL L<sup>-1</sup> foram as mais eficazes na redução do crescimento micelial e da produção de conídios do patógeno, sendo constatado um efeito fungistático do produto. Verificou-se que o produto altera a permeabilidade da membrana plasmática do fungo na dosagem de 100 mL L<sup>-1</sup>, podendo ser um possível mecanismo de ação sobre o patógeno, além de ser capaz de reduzir a incidência e a severidade do bolor verde em pós-colheita nos frutos de laranja na dosagem de 75 mL L<sup>-1</sup>. Portanto, conclui-se que o produto à base de extrato da alga *A. nodosum* pode ser incluído ao manejo integrado de doenças em pós-colheita de citros.

**Palavras-chave:** Citricultura; *Penicillium digitatum*; *Ascophyllum nodosum*; Fitopatologia; Controle alternativo.

#### Abstract

This study aimed to evaluate the effectiveness of different dosages of a product based on seaweed extract from *Ascophyllum nodosum* in the management of green mold in citrus postharvest. Dosages of 0; 25; 50; 75 and 100 mL L<sup>-1</sup> were used of the commercial product based on seaweed extract and, as a comparison, a systemic fungicide from the benzimidazole group was used. *In vitro* experiments were carried out to check the effect of the product and its possible mechanisms of action, the following parameters being evaluated: mycelial growth, sporulation, electrolytes leakage and fungicidal and/or fungistatic activity. Then, an *in vivo* experiment was carried out in order to assess the incidence and severity of green mold in 'Valencia' orange fruits. It was observed that the dosages of 75 and 100 mL L<sup>-1</sup> were the most effective in reducing mycelial growth and the production of conidia of the pathogen, with a fungistatic effect of the product based on the seaweed extract. It was found that the product modify the plasma membrane permeability of the fungus at the dosage of 100 mL L<sup>-1</sup>, which may be a possible mechanism of action on the pathogen. In addition to being able to reduce the incidence and severity of green mold in postharvest on orange fruits at dosage of 75 mL L<sup>-1</sup>. Thus, it is concluded that the product based on the *A. nodosum* seaweed extract can be included in the integrated management of diseases in postharvest of citrus.

**Keywords:** Citriculture; *Penicillium digitatum*; *Ascophyllum nodosum*; Phytopathology; Alternativecontrol.

#### Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la efectividad de diferentes dosis de un producto a base de extracto de alga *Ascophyllum nodosum* em el manejo del moho verde em poscosecha de cítricos. Dosis de 0; 25; 50; 75 y 100 mL L<sup>-1</sup> del producto comercial a base de extracto de algas y, a modo de comparación, un fungicida sistêmico del grupo de los benzimidazoles. Se realizaron experimentos *in vitro* para verificar efecto del producto y sus posibles mecanismos de acción, evaluando los siguientes parámetros: crecimiento del micelio, esporulación, pérdida de electrolitos y actividad fungicida y/o fungistática. Luego, se realizó un experimento *in vivo* para evaluar la incidencia y severidade del

moho verde em frutos de laranja 'Valência' tratados com o produto. Se observó que las dosis de 75 y 100 mL L<sup>-1</sup> fueron las más efectivas em la reducción del crecimiento del micelio y la producción de conídios del patógeno, com efecto fungistático del producto a base del extracto del alga *A. nodosum*. Se encontró que el producto aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática del hongo a dosis de 100 mL L<sup>-1</sup>, lo que puede ser un posible mecanismo de acción sobre el patógeno, además de poder reducir la incidencia y severidade del moho verde poscosecha em frutos de laranja a una dosis de 75 mL L<sup>-1</sup>. Por tanto, se concluye que el producto a base del extracto del alga *A. nodosum* puede incluirse em el manejo integrado de las enfermedades poscosecha de los cítricos.

**Palabras clave:** Citricultura; *Penicillium digitatum*; *Ascophyllum nodosum*; Fitopatología; Control alternativo.

## 1. Introdução

A citricultura possui grande importância econômica para o Brasil, sendo este o maior produtor e exportador de laranja do mundo. A produção dos citros na safra 2020/21 foi de 14.610.788 toneladas em um total de 585.065 hectares colhidos (IBGE, 2021).

Apesar de ser uma espécie com alto potencial produtivo, os citros são suscetíveis a várias doenças (Vieira, 2018). Dentre elas destaca-se o bolor verde, sendo a principal doença que acomete os frutos principalmente na etapa de pós-colheita.

As lesões nos frutos causadas pela falta de cuidados durante processos de colheita, transporte e armazenamento são portas de entrada para o fungo *Penicillium digitatum*, que é o agente causal do bolor verde. Durante a infecção, esse patógeno provoca a desintegração dos tecidos do hospedeiro, que associada ao odor característico, tornam os frutos impróprios para consumo (Maro, 2010).

No Brasil, o controle químico ainda é o mais utilizado, sendo os fungicidas do grupo dos benzimidazóis os mais empregados na pós-colheita de citros. Entretanto, o mercado mundial está cada dia mais exigente com relação ao uso de produtos químicos nos alimentos. E ainda, o uso indiscriminado de fungicidas acaba selecionando estirpes do patógeno resistentes a estes (Teixidó et al., 2001).

Por meio do manejo integrado, ferramentas como o controle alternativo tem apresentado resultados relevantes no que tange ao manejo de doenças, visando minimizar os impactos causados pelo uso contínuo de produtos no controle químico, evitar a seleção de patógenos resistentes e em alguns casos reduzir os custos de produção (Barboza et al., 2013).

Algumas estratégias de manejo alternativo de doenças tendem a manter a qualidade dos frutos em pós-colheita, sem alterar os seus valores nutricionais. Dentre os produtos usados como controle alternativo de doenças de plantas, destacam-se os extratos de algas, que além de auxiliar no manejo de doenças ainda influenciam positivamente na produtividade (Carvalho & Castro, 2014). Ademais, embora poucos, é possível encontrar na literatura resultados promissores na utilização do extrato da alga *Ascophyllum nodosum* no manejo de doenças em pós-colheita (Gomes & Serra, 2013; Mafra, et al. 2020; Melo, 2017; Ribeiro; Serra & Araújo, 2016).

Nesse sentido, com o presente trabalho objetivou-se avaliar a eficácia de diferentes dosagens de um produto à base de extrato da alga *A. nodosum* no manejo do bolor verde em pós-colheita de citros.

## 2. Metodologia

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) – Campus Machado. O *P. digitatum* foi isolado a partir de frutos sintomáticos obtidos no comércio de Machado-MG. Após o isolamento do fungo, este foi mantido em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a 25°C, em câmara tipo B.O.D., a fim de propiciar condições para o seu desenvolvimento. Os frutos de laranjeira “Valência” [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram obtidos no pomar do IFSULDEMINAS - Campus Machado.

Utilizou-se um produto comercial à base de extrato da alga *A. nodosum* denominado neste estudo como produto alternativo, por não ser comumente utilizado no controle químico tradicional de doenças de plantas. O produto é uma

formulação SL (Suspensão Líquida) com 100% de concentração de extrato da alga, equivalente a 48% de matéria seca. Para efeito de comparação foi utilizado um produto químico (fungicida) registrado para o controle pós-colheita do bolor verde em citros, sendo um fungicida sistêmico do grupo químico benzimidazol, que possui em sua composição o tiabendazol (2-(thiazol-4-yl) benzimidazole) na concentração de 485 g L<sup>-1</sup> (48,5% m/v).

Os experimentos foram executados em duas etapas, *in vitro* e *in vivo*. Nos experimentos *in vitro*, foi verificado o efeito do produto à base de extrato da alga *A. nodosum* sobre o desenvolvimento do patógeno e um de seus possíveis mecanismos de ação. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento micelial, perda de eletrólitos, esporulação e atividade fungicida e/ou fungistática. Com relação à possibilidade de uso do extrato de alga no manejo do bolor verde em pós-colheita foi realizado um experimento *in vivo* no qual foi avaliada a incidência e severidade da doença nos frutos de laranja 'Valência' tratados com o produto e posteriormente inoculados com o patógeno.

## 2.1 Experimentos *in vitro*

### 2.1.1 Crescimento micelial

Foi realizado um experimento *in vitro* para avaliar o crescimento micelial do *P. digitatum* submetido a diferentes dosagens do produto à base de extrato de alga *A. nodosum* (0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup>) e o fungicida na dose indicada pelo fabricante (10,3 mL L<sup>-1</sup>).

Em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio BDA fundente (batata-dextrose-ágar) esterilizado, separadamente foram pipetadas as diferentes dosagens do extrato de alga e do fungicida e posteriormente vertidos 10 mL para cada placa de Petri de 85 mm de diâmetro.

Após 24 horas foi realizada a raspagem do micélio e conídios oriundos de colônias com sete dias de idade do *P. digitatum* em meio BDA com auxílio de um palito de dente autoclavado. Em seguida a extremidade do palito contendo as estruturas do patógeno foi introduzida no centro da placa de cada tratamento. O material foi mantido em câmara do tipo B.O.D com temperatura ajustada para 25° C (± 2° C) e fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro).

O crescimento micelial foi avaliado diariamente com o auxílio de um paquímetro digital, durante sete dias. As placas foram marcadas com duas linhas perpendiculares, com a finalidade de mensurar o crescimento do diâmetro da colônia, onde foram calculadas as médias diárias por placa.

Com as medições diárias dos sete dias, foi avaliado o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), como proposto por Oliveira (1999):

$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial;

D = Diâmetro médio atual;

D<sub>a</sub> = Diâmetro médio do dia anterior;

N = Número de dias após a inoculação.

O experimento foi instalado em blocos casualizados (DBC), contendo uma placa por parcela, seis tratamentos e oito repetições. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (Scott e Knott, 1974) a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ), empregando-se o software SISVAR (Ferreira, 2019). Além

disso, foi realizada análise de regressão a partir da significância dos tratamentos, a fim de se definir a dose ideal do produto. Os dados foram ajustados à equação polinomial de 3º grau ( $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$ ) e, portanto, a dose ideal do produto foi estimada por meio da equação:

$$Dose\ ideal\ (3^\circ\ grau) = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

### 2.1.2 Esporulação

Em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio BDA fundente esterilizado, separadamente foram pipetadas as diferentes dosagens do extrato de alga *A. nodosum* (0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup>) e a dosagem do fungicida (10,3 mL L<sup>-1</sup>) indicada pelo fabricante. Posteriormente foram vertidos 10 mL para cada placa de Petri de 85 mm de diâmetro e, após 24h foi adicionado um disco (5mm) de meio de cultura contendo micélio do patógeno *P. digitatum* no centro da placa. As placas foram mantidas por cinco dias em câmara tipo B.O.D. com temperatura ajustada para 25° C e fotoperíodo de 12 horas.

Ao final do tempo de incubação, cada placa recebeu 20 mL de água destilada autoclavada e teve as estruturas do patógeno ali presentes delicadamente retiradas com o auxílio de uma alça de Drigalski. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze para a obtenção apenas dos conídios, posteriormente, o número de conídios foi quantificado com o auxílio de câmara de Neubauer em microscópio de luz.

O experimento foi instalado em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), contendo uma placa de Petri por parcela, seis tratamentos e oito repetições. Os dados coletados foram submetidos às análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (Scott e Knott, 1974) a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) empregando-se o software SISVAR (Ferreira, 2019). Além disso, foi realizada análise de regressão a partir da significância dos tratamentos.

### 2.1.3 Perda de eletrólitos

Para avaliação do possível mecanismo de ação do extrato de alga sobre o micélio do patógeno, foi realizado um experimento para mensurar a perda de eletrólitos por parte do *P. digitatum* exposto ao produto à base de extrato de alga.

Em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido BD (batata-dextrose) esterilizado, foram inseridos três discos (5mm) de meio de cultivo contendo micélio oriundos de colônias com 7 dias de idade do *P. digitatum*. O material foi mantido sob agitação constante por cinco dias à 80,4 rpm e temperatura de 25° C ( $\pm 2^\circ$  C).

Após a obtenção do micélio, o mesmo foi filtrado com auxílio de bomba a vácuo, kitassato e papel filtro, pesado em balança analítica e transferido para béqueres de 50 mL. Para verificar o efeito do extrato da alga *A. nodosum* na permeabilidade da membrana plasmática do patógeno, os béqueres contendo o micélio receberam 10 mL de água destilada contendo os tratamentos por um período de 30 min, posteriormente, o micélio do patógeno foi coletado e transferido para copos plásticos (150 mL) contendo 50 mL de solução de sacarose 0,2 M (Rezende et al., 2020a).

Os tratamentos utilizados foram:

- 1) Tratamento com o micélio macerado: micélio do patógeno submetido à maceração com auxílio de bastão de vidro, levando a ruptura física da membrana do mesmo, alterando sua permeabilidade;
- 2) Tratamento com extrato de alga: micélio do patógeno submetido aos tratamentos de extrato de alga nas dosagens 0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup>;
- 3) Tratamento com fungicida: micélio do patógeno submetido ao fungicida na dosagem indicada pelo fabricante (10,3 mL L<sup>-1</sup>).

Foi realizada a leitura da condutividade elétrica das soluções ao longo do tempo (0, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) com auxílio de condutivímetro de bancada, com o objetivo de detectar a perda de eletrólitos por parte do micélio. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{S.g micélio}^{-1}$ .

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos (cinco concentrações de extrato de alga, fungicida benzimidazol e micélio macerado) e quatro repetições, onde cada copo plástico constituiu de uma parcela, totalizando 28 copos. Os dados coletados foram submetidos às análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (Scott e Knott, 1974) a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) empregando-se o software SISVAR (Ferreira, 2019). Além disso, foi calculado o erro padrão da média.

#### 2.1.4 Atividade fungicida e/ou fungistática

O *P. digitatum* foi cultivado em meio de cultura BDA com os tratamentos conforme mencionado no item 2.1.2. Ao final do período de incubação, um disco (5mm) de meio de cultura contendo o patógeno submetido aos tratamentos foi transferido para placas de Petri de 90 mm de diâmetro com apenas meio de cultura BDA e observou-se por três dias o desenvolvimento do fungo (Rezende, 2010).

As avaliações foram feitas visualmente, quando observado o desenvolvimento do patógeno sob o meio de cultivo BDA foi atribuída à característica fungistática e, se não houve desenvolvimento do patógeno, foi atribuída a característica fungicida.

#### 2.2 Experimento *in vivo*

Os frutos de laranja 'Valência' obtidos no pomar do *Campus* foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por três minutos, lavados em água destilada autoclavada e deixados secar em temperatura ambiente por 24 horas (Mafra et al., 2020).

Posteriormente, os frutos foram imersos por 5 minutos em soluções contendo os tratamentos: 0; 25; 50; 75 e 100 mL  $\text{L}^{-1}$  de extrato de alga *A. nodosum* e 10,3 mL  $\text{L}^{-1}$  de fungicida. Após a imersão, os frutos foram submetidos à secagem em temperatura ambiente por 24 horas. Passado o tempo de secagem foram realizados quatro ferimentos (0,8 mm de profundidade) nos frutos em regiões equidistantes com auxílio de agulha histológica e, em seguida, pulverizada suspensão contendo o *P. digitatum* na concentração de  $10^6$  conídios.mL $^{-1}$  até o ponto de escorrimento. Os frutos foram incubados em câmara úmida por 36 horas e posteriormente avaliados quanto à incidência (% de frutos doentes) e severidade (nº de ferimentos com presença dos sintomas provocados pela presença do patógeno) da doença a cada 24h, durante sete dias.

A partir dos resultados alcançados, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), por meio da equação definida por Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Em que  $n$  é o número total de avaliações;  $y_i$  e  $y_{i+1}$  são duas avaliações consecutivas de severidade realizadas nos tempos  $t_i$  e  $t_{i+1}$ , respectivamente.

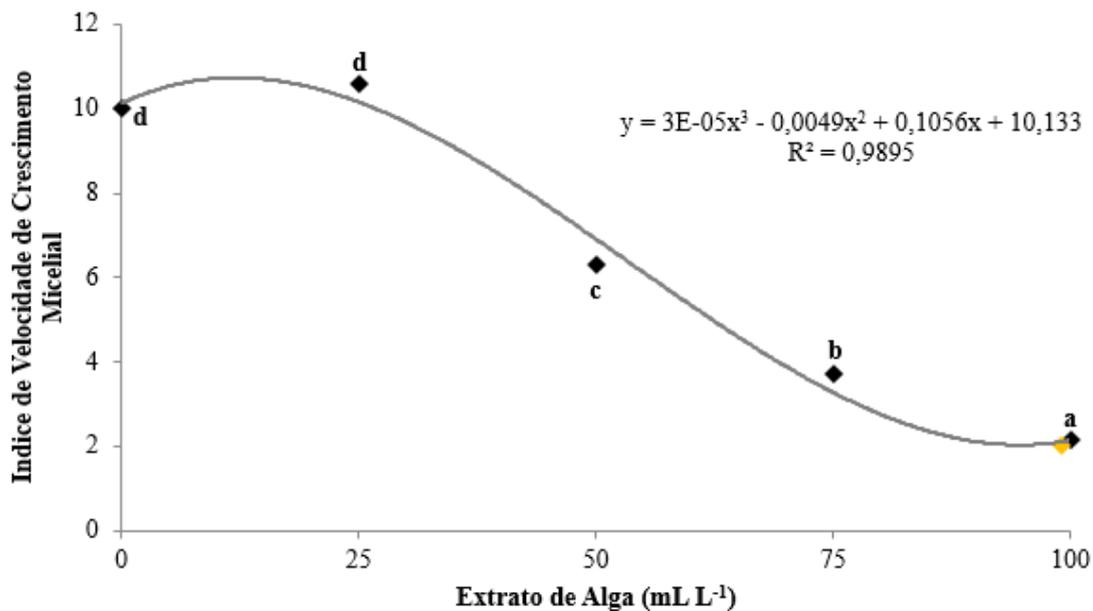
O experimento foi instalado em blocos casualizados (DBC), contendo três frutos por parcela, seis tratamentos e oito repetições. Os dados coletados foram submetidos às análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (Scott e Knott, 1974) a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) empregando-se o software SISVAR (Ferreira, 2019). Além disso, foi calculado o erro padrão da média.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Experimentos *in vitro*

Foi realizada a avaliação da velocidade de crescimento micelial do patógeno sob a adição do produto à base de extrato de alga. Verificou-se que em todos os tratamentos onde houve ou não a adição de produto à base de extrato de alga o fungo *P. digitatum* se desenvolveu, conforme Figura 1. Na concentração de 25 mL L<sup>-1</sup> do extrato de alga, houve aumento na velocidade do crescimento micelial do patógeno em comparação a dose 0 mL L<sup>-1</sup>. As dosagens 75 e 100 mL L<sup>-1</sup> foram as que mais prejudicaram e reduziram a velocidade do crescimento micelial do *P. digitatum* comparado as demais dosagens, porém não foram capazes de inibir totalmente o desenvolvimento do patógeno. Além disso, a partir do cálculo de regressão, foi possível inferir sobre a dose ideal do produto à base do extrato de *A. nodosum*. Dentro das concentrações testadas, a dose de 99,17 mL L<sup>-1</sup> seria capaz de proporcionar o menor crescimento do patógeno.

**Figura 1.** Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Penicillium digitatum* sob adição de produto comercial à base de extrato da alga *Ascophyllum nodosum* nas concentrações de 0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup> após serem avaliados por sete dias de incubação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).



- ◆ Estimativa de dose ideal do produto.

Fonte: Dados originais da pesquisa.

Segundo Pascholati e Dalio (2018), a presença de carbono orgânico, água e minerais no produto, podem proporcionar condições ótimas para o crescimento do fungo. Portanto, dependendo da concentração do extrato da alga *A. nodosum* utilizada, pode haver indução no crescimento de patógenos e favorecimento da esporulação (Melo, 2017), ao invés de efeito inibitório.

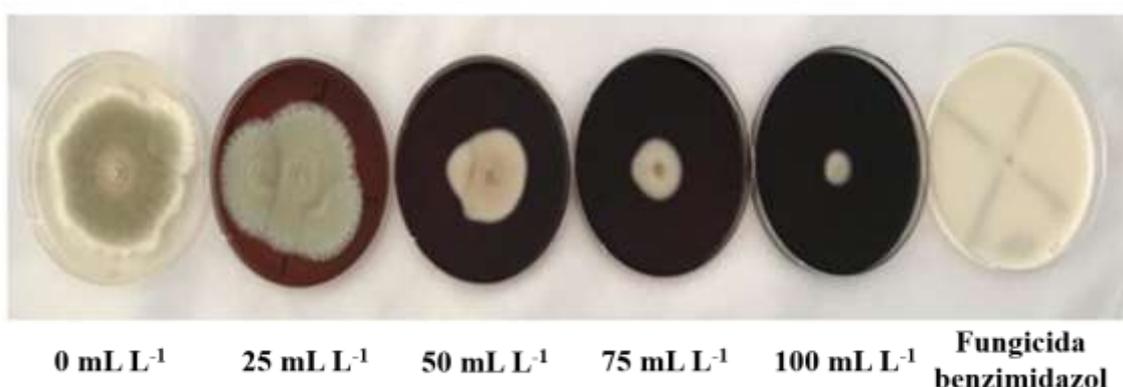
Diferente disso, em trabalho realizado por Santos (2017) foi verificado que a velocidade do crescimento micelial de *P. digitatum* foi totalmente inibida pela adição de 60 e 80 mL L<sup>-1</sup> de produto à base de extrato de alga em meio BDA. Também foram testadas dosagens de 20 e 40 mL L<sup>-1</sup> e estas não foram capazes de inibir a velocidade do crescimento do patógeno.

Quando o produto à base de extrato de alga causa efeito inibitório no crescimento de alguns microrganismos, possivelmente se deve ao fato de que as algas marinhas que compõem a base do produto testado, ficam expostas a condições

ambientais extremas e a inúmeras interações biológicas. Por consequência, são capazes de desenvolver um mecanismo de defesa e produzir substâncias biologicamente ativas como os terpenos e fenóis (Peres et al., 2012).

A partir da Figura 2, é possível observar que o tratamento com adição de 25 mL L<sup>-1</sup> do produto à base de extrato de alga não houve redução do crescimento micelial do patógeno, onde o crescimento do mesmo foi semelhante ao tratamento na dosagem de 0mL L<sup>-1</sup>. Para os demais tratamentos, à medida em que se aumentou a concentração do produto comercial à base de extrato de alga o crescimento do patógeno foi reduzindo. No tratamento com adição de fungicida, o crescimento de *P. digitatum* foi menor em relação ao tratamento 0 mL L<sup>-1</sup>.

**Figura 2.** Influência da adição de diferentes concentrações de produto comercial à base de extrato da alga *Ascophyllum nodosum* e fungicida benzimidazol (10,3 mL L<sup>-1</sup>) em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) no crescimento micelial de *Penicillium digitatum* após sete dias de incubação.



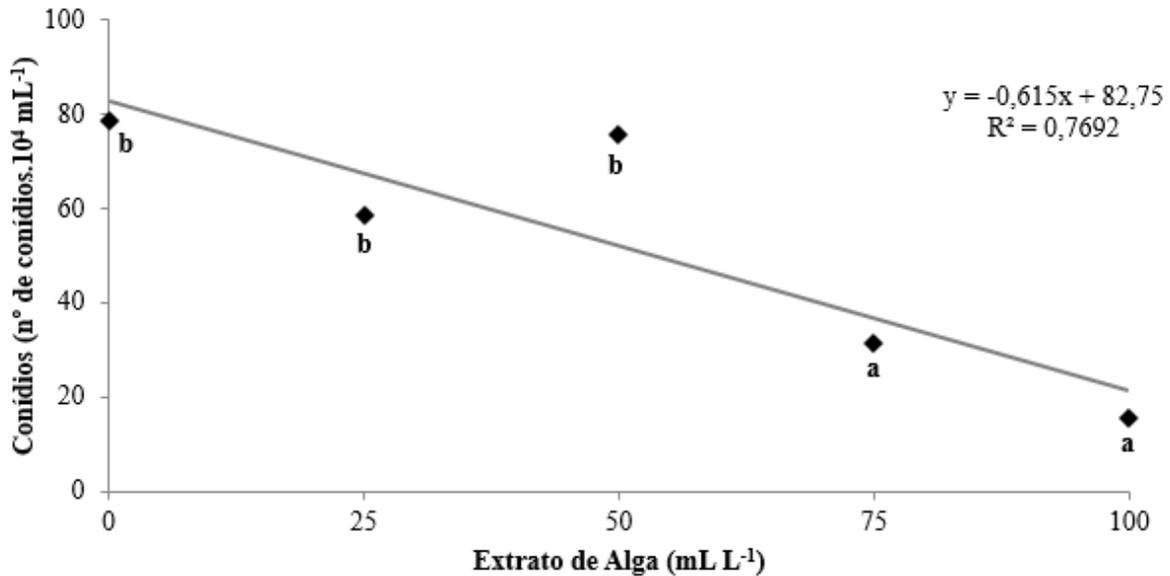
Fonte: Dados originais da pesquisa.

O efeito inibitório do mesmo produto comercial utilizado no presente trabalho foi constatado por Ribeiro, Serra e Araújo (2016). O produto foi capaz de reduzir o diâmetro do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* quando comparado com o tratamento testemunha (0 mL L<sup>-1</sup>), nas dosagens de 40 mL L<sup>-1</sup> e 60 mL L<sup>-1</sup>, sendo esta última, a concentração mais eficaz no que diz respeito a inibição do fitopatógeno. O produto à base de *A. nodosum* também foi utilizado por Araújo (2014), para avaliar seu efeito sob diferentes fitopatógenos importantes para agricultura. Foram obtidos resultados promissores na inibição *in vitro* de *Fusarium pallidoroseum* causador da podridão em sementes, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides* que causam antracnose em banana e em outras diversas frutas, respectivamente. Além disso, foi eficiente principalmente na inibição de *Rhizoctonia solani*, agente causal de podridão radicular em diversas culturas de interesse agrônomico.

Semelhante aos resultados obtidos, em uma pesquisa realizada por Paiva et al. (2020), o extrato de alga foi eficaz na inibição no crescimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer*, agente causal da podridão mole em frutos de morango, quando utilizado na concentração de 40 mL L<sup>-1</sup> do produto.

É possível observar na Figura 3 que o produto à base de extrato de alga foi capaz de reduzir a reprodução de *P. digitatum*, pois diminui a esporulação do fungo nas doses de 75 e 100 mL L<sup>-1</sup>. Os dados referentes à esporulação nas concentrações de 25 e 50 mL L<sup>-1</sup> do produto foram semelhantes estatisticamente ao tratamento controle (0 mL L<sup>-1</sup>). Quando a esporulação do fungo é reduzida, significa que o fitopatógeno teve sua reprodução de alguma forma prejudicada e como consequência menor número de infecções bem sucedidas e menor número de lesões nos frutos ele conseguirá realizar.

**Figura 3.** Produção de conídios por *Penicillium digitatum* após cinco dias de inoculação em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) com adição de produto comercial à base de extrato de alga *Ascophyllum nodosum* nas concentrações de 0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

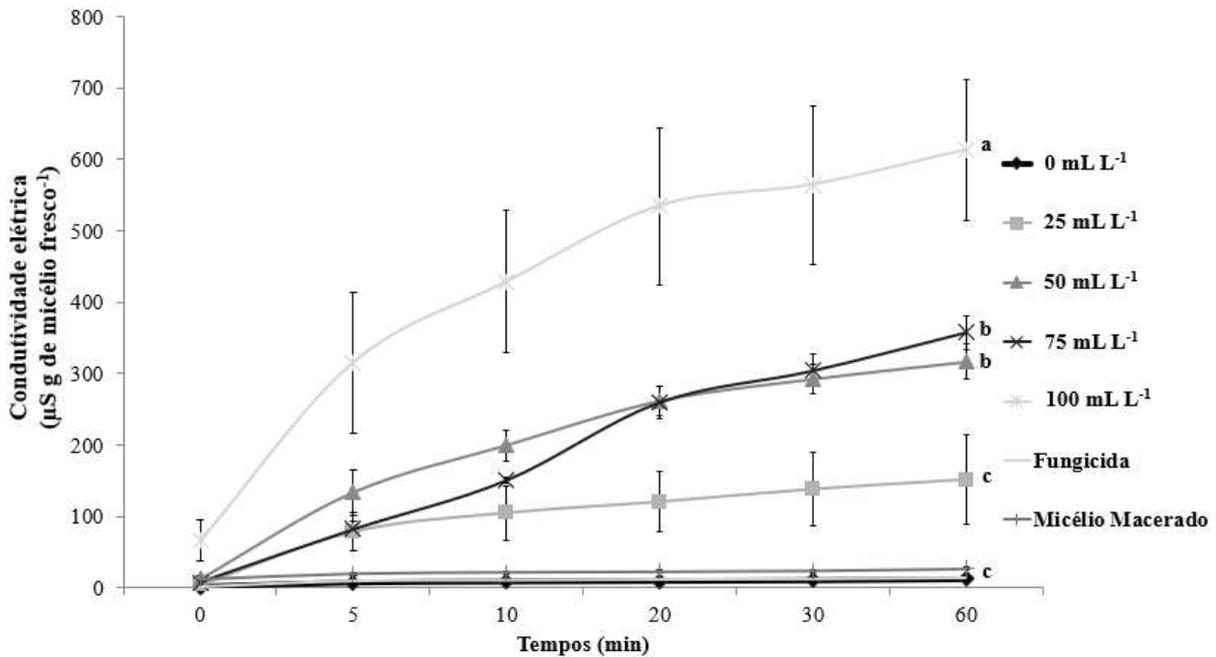


Fonte: Dados originais da pesquisa.

Estas avaliações são importantes para comprovar que produtos menos tóxicos à saúde humana e ao ambiente podem ser aliados em programas de manejo integrado de doenças de plantas. No caso do presente trabalho, por se tratar de manejo de doença pós-colheita, estudos nessa linha de pesquisa são ainda mais relevantes. Isso devido à proposta de redução da frequência e quantidade de defensivos químicos aplicados diretamente nos frutos e muitas vezes sem respeito ao período de carência que irão para a mesa do consumidor.

Com intuito de verificar possíveis mecanismos de ação do extrato de alga no desenvolvimento de *P. digitatum*, foi avaliada a perda de eletrólitos ao longo do tempo por parte do micélio do patógeno na presença dos tratamentos. Houve diferença entre os tratamentos para os valores de condutividade do micélio de *P. digitatum* no tempo 0 e 5 minutos conforme ilustrado na Figura 4. O tratamento com a dosagem de 100 mL L<sup>-1</sup> teve condutividade elétrica média de 66,09 e 315,755  $\mu\text{S.g micélio}^{-1}$  nos tempos de 0 e 5 minutos respectivamente, sendo superior aos demais tratamentos que não tiveram diferença. Isso significa que, quanto maior o tempo de exposição do patógeno ao produto à base de extrato de alga, menor a capacidade seletiva da membrana plasmática das hifas do mesmo.

**Figura 4.** Efeito de diferentes concentrações de produto comercial à base de extrato da alga *Ascophyllum nodosum* e fungicida benzimidazol ( $10,3 \text{ mL L}^{-1}$ ) sobre a perda de eletrólitos do micélio de *Penicillium digitatum* cultivado em meio líquido BD (batata-dextrose) ao longo do tempo. Os dados são expressos em micro-Siemens.g micélio fresco<sup>-1</sup> ( $\mu\text{S.g micélio fresco}^{-1}$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média.



Fonte: Dados originais da pesquisa.

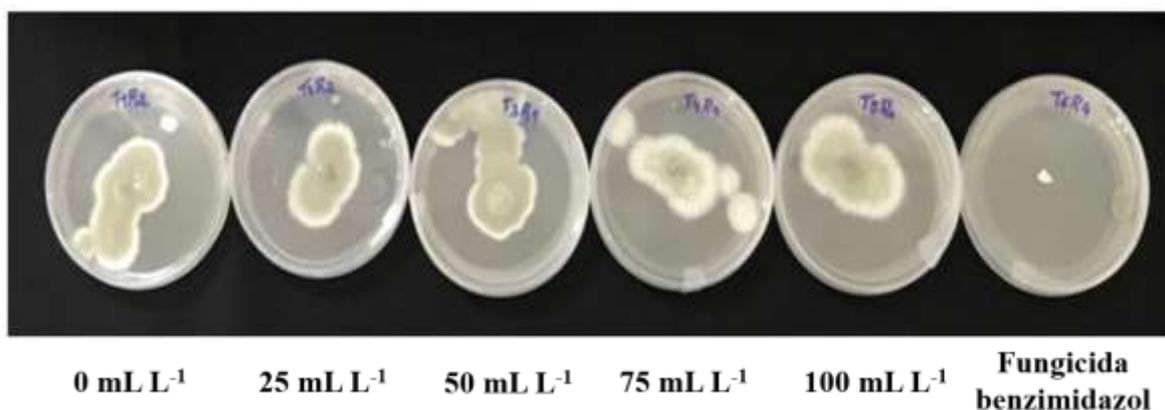
Uma nova avaliação foi realizada após 10 minutos, na qual os tratamentos  $0 \text{ mL L}^{-1}$ , fungicida e micélio macerado tiveram menores valores de condutividade sendo eles de 8,86; 10,55 e 21,91  $\mu\text{S.g micélio}^{-1}$ , respectivamente. Nas seguintes avaliações, aos 20, 30 e 60 minutos, nos tratamentos com adição de  $25 \text{ mL L}^{-1}$  de produto à base de extrato de alga, fungicida e micélio macerado foram observados menores valores de condutividade elétrica em comparação com os demais tratamentos, não havendo diferença entre eles. Em todos os tratamentos, foi possível observar que, com o passar do tempo, a condutividade elétrica da solução contendo o patógeno submetido à crescentes concentrações do produto, aumentou. A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que um dos mecanismos “alvo” do produto utilizado nesse estudo seja o dano à membrana plasmática da hifa do fungo *P. digitatum*. O tratamento com a dosagem de  $100 \text{ mL L}^{-1}$  de produto à base de extrato de alga foi o que teve maiores valores de condutividade elétrica durante todas as avaliações. Portanto, essa dosagem possivelmente interfere na permeabilidade seletiva da membrana plasmática do fungo, uma vez que quanto maior o tempo de exposição a ela, maior foi a condutividade elétrica observada, conforme a Figura 4.

Em pesquisas realizadas com extrato de alga, foi constatado que o mesmo pode interferir na permeabilidade da membrana da hifa do fungo diminuindo a capacidade celulolítica, prejudicando sua morfologia e fisiologia e como consequência reduzindo seu crescimento, de acordo com a concentração utilizada (Melo, 2017). Em trabalho realizado por Rezende et al. (2020b), os autores verificaram que o uso de produto à base de fosfito de potássio, também considerado produto alternativo, foi capaz de alterar a permeabilidade da membrana do oomiceto *P. nicotianae*.

Além dos estudos referentes ao efeito direto do produto à base de extrato de alga sobre o *P. digitatum* realizados, foi avaliado adicionalmente a atividade fungicida e/ou fungistática do mesmo e do fungicida (Figura 5). Nota-se que em todos os tratamentos onde o fungo esteve anteriormente em meio contendo extrato de alga, e que posteriormente foi adicionado em

meio sem a presença do produto, o mesmo se desenvolveu normalmente. Neste caso, é possível inferir que o extrato de alga possui característica fungistática. Por outro lado, no meio onde houve a adição de fungicida, o patógeno não se desenvolveu quando transferido para o meio sem o agrotóxico, comprovando assim, seu efeito fungicida. Essa característica foi evidenciada no experimento *in vivo* no qual o fungicida benzimidazol foi mais eficiente na redução da incidência e severidade causada pelo bolor verde ao longo de todo período de avaliação.

**Figura 5.** Desenvolvimento de *Penicillium digitatum* advindo de cultivo em meio com adição de produto à base de extrato de alga *Ascophyllum nodosum* e fungicida benzimidazol ( $10,3 \text{ mL L}^{-1}$ ) sob o meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar) após 3 dias de inoculação.



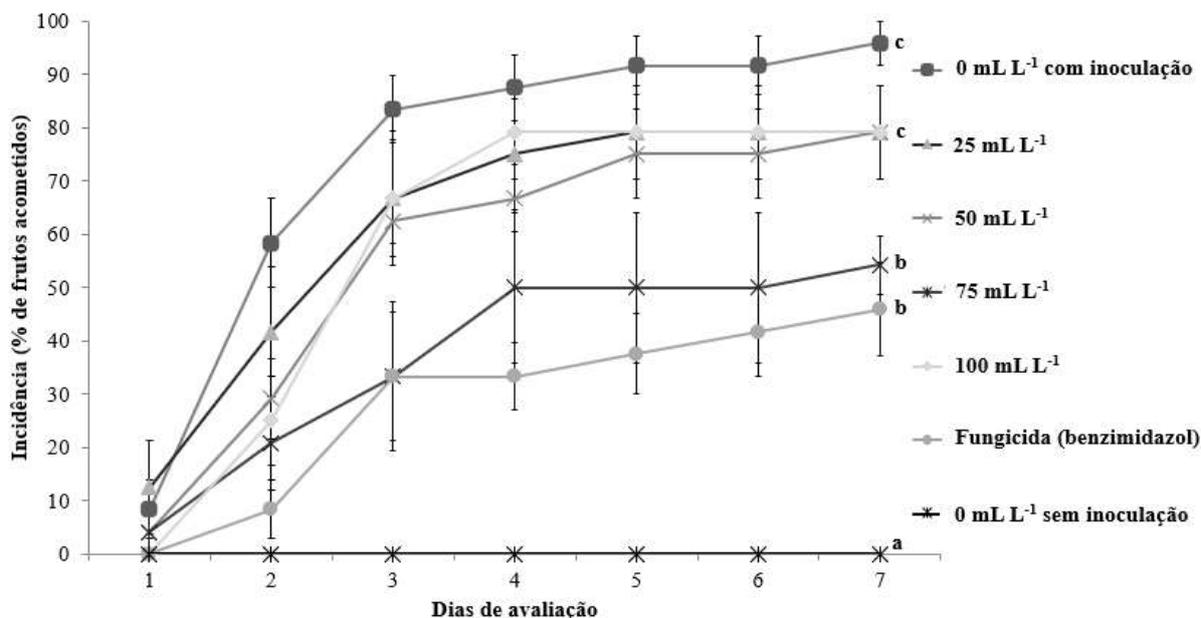
Fonte: Dados originais da pesquisa.

A atividade fungistática causada pelo produto à base de extrato de alga significa que o mesmo não tem efeito letal ao patógeno, pois ainda haviam estruturas de reprodução que possibilitaram o seu desenvolvimento após a adição em meio de cultura. Contudo, o desenvolvimento do patógeno, mesmo que não interrompido completamente, foi reduzido. Nesse sentido, o ciclo das relações patógeno-hospedeiro desse patossistema tende a ser maior e como consequência maiores períodos de incubação e latência da doença. Diante disso, o tempo para o surgimento de lesões no fruto é maior, o que consequentemente aumenta o tempo de prateleira do fruto tratado com o produto alternativo.

### 3.2 Experimento *in vivo*

Foi realizado experimento com laranjas tratadas ou não com o produto à base de extrato de alga e posteriormente inoculadas com o *P. digitatum* para avaliar a eficácia do mesmo no controle preventivo da doença. Verificou-se por meio do experimento *in vivo* que não houve desenvolvimento de doença no grupo de laranjas 'Valência' que não foram inoculadas com o *P. digitatum*, agente causal do bolor verde. As laranjas tratadas com fungicida tiveram menor incidência da doença durante todo o período de avaliação, quando comparadas com os demais tratamentos, porém o mesmo não foi capaz de inibir totalmente o desenvolvimento do bolor verde nos frutos (Figura 6). A partir dos resultados advindos das laranjas tratadas com fungicida é possível inferir que podem existir populações do *P. digitatum* resistentes ao mesmo ou que de alguma forma o agrotóxico vai perdendo sua eficiência ao longo do tempo.

**Figura 6.** Incidência de bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Valência' tratados com produto à base de extrato de alga *Ascophyllum nodosum* em diferentes concentrações e fungicida benzimidazol (10,3 mL L<sup>-1</sup>), mantidos sob temperatura de 25° C e avaliados ao longo de sete dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média.



Fonte: Dados originais da Fonte: Dados originais da pesquisa.

No primeiro dia de avaliação, não houve diferença entre os tratamentos avaliados. Já no segundo dia, as laranjas submetidas às doses de 50, 75 e 100 mL L<sup>-1</sup> do extrato de alga tiveram resultados semelhantes entre si e os tratamentos com dose de 25 mL L<sup>-1</sup> e de 0 mL L<sup>-1</sup> inoculado tiveram maior incidência quando comparados aos demais tratamentos. No terceiro dia de avaliação os frutos com menor incidência da doença foram aqueles tratados com 75 mL L<sup>-1</sup> do produto à base do extrato da alga *A. nodosum*, já nos demais tratamentos não foi verificada diferença significativa os mesmos. No quarto dia de avaliação, nos tratamentos onde foram utilizadas 50 e 75 mL L<sup>-1</sup> do produto alternativo, houve redução da incidência da doença comparado aos demais tratamentos. Do quinto ao sétimo dia a dose de 75 mL L<sup>-1</sup> do produto foi a mais eficaz em reduzir a incidência de bolor verde nos frutos de laranja 'Valência' e foi semelhante estatisticamente ao tratamento com adição de fungicida.

Em trabalho realizado por Vienczet al. (2020), utilizando de uma dosagem bem menor do que as testadas no presente trabalho, verificou que o produto Algamare®, à base de extrato de *A. nodosum* na concentração de 0,4 mL L<sup>-1</sup> foi capaz de reduzir a incidência e a severidade da podridão parda (*Monilinia fructicola*) em ameixas 'Reubennel' com um nível de controle semelhante ao do fungicida iprodione.

Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho realizado por Mafra et al. (2020), onde não houve incidência de bolor verde em frutos de laranja 'Valência' não inoculados com *P. digitatum* e tratados com produto à base de extrato de alga *A. nodosum*. Além disso, os frutos tratados com extrato da alga na dose de 91,5 mL L<sup>-1</sup> tiveram redução de 30% da incidência da doença quando se comparou com o tratamento controle.

Em relação à severidade, observa-se por meio da Tabela 1 que os frutos do tratamento 0 mL L<sup>-1</sup> inoculados tiveram maior número de lesões quando comparados com os frutos submetidos aos demais tratamentos. Os frutos tratados com fungicida e com a dosagem de 75 mL L<sup>-1</sup> de produto à base de extrato de alga tiveram resultados de severidade da doença

semelhantes entre si durante todos os dias de avaliação. Os demais tratamentos tiveram resultados inferiores no que diz respeito à redução do número de lesões por fruto.

**Tabela 1.** Médias do número de lesões de bolor verde (severidade) em frutos de laranja 'Valência' tratados com produto à base de extrato de alga *Ascophyllum nodosum* nas concentrações de 0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup> e fungicida benzimidazol (10,3 mL L<sup>-1</sup>), mantidos sob temperatura de 25° C e avaliados ao longo de sete dias.

Tratamentos	Médias do número de lesões de bolor verde/fruto						
	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia
0 mL L <sup>-1</sup> com Inoculação	0,1 a	0,8 c	1,5 b	1,7 c	2,1 d	2,4 d	3,2 d
25 mL L <sup>-1</sup>	0,1 a	0,4 b	1,1 b	1,4 c	1,6 c	1,6 c	2,3 c
50 mL L <sup>-1</sup>	0,0 a	0,4 b	1,0 b	1,1 c	1,4 c	1,4 c	2,2 c
75 mL L <sup>-1</sup>	0,0 a	0,3 a	0,4 a	0,7 b	0,8 b	0,8 b	1,5 b
100 mL L <sup>-1</sup>	0,0 a	0,3 a	1,0 b	1,4 c	1,5 c	1,5 c	2,1 c
Fungicida Benzimidazol	0,0 a	0,1 a	0,5 a	0,5 b	0,8 b	1,0 b	1,4 b
0mL L <sup>-1</sup> sem Inoculação	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a

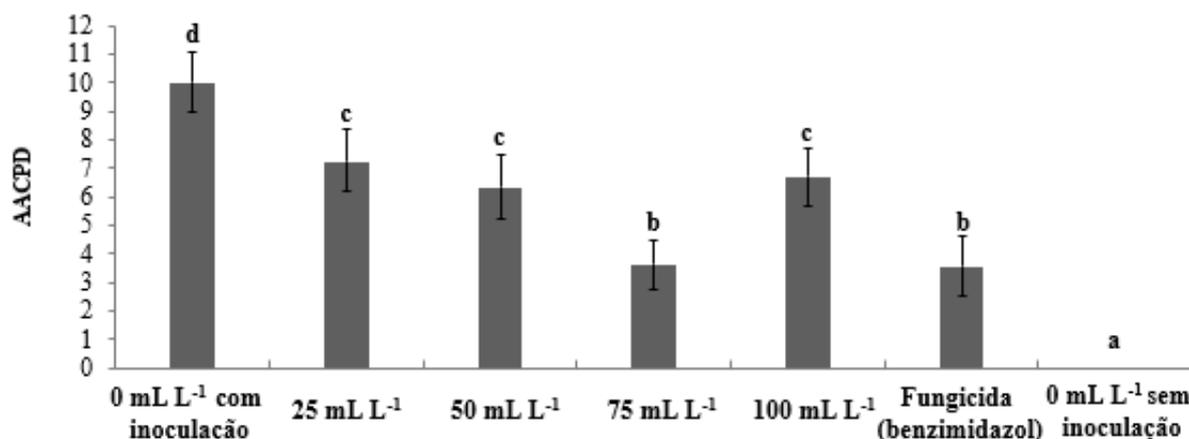
Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Dados originais da pesquisa.

Semelhante a estes resultados, Gomes e Serra (2013), evidenciam que a severidade das lesões causadas por *C. gloeosporioides* foi reduzida quando frutos de pimenta da cultivar 'dedo de moça' (*Capsicum baccatum*) foram imergidos em solução contendo extrato de *A. nodosum*, 48 horas antes da inoculação com o patógeno.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi reduzida nos tratamentos com a utilização de produto à base de extrato de alga, quando comparado com o tratamento 0 mL L<sup>-1</sup> inoculado com o patógeno. Os resultados da AACPD das laranjas submetidas a dose de 75 mL L<sup>-1</sup> foram semelhantes aos resultados em que as mesmas foram tratadas com o fungicida. Nos frutos do tratamento no qual não foi realizada a inoculação, não houve sintomas da doença durante o todo o tempo de avaliação (Figura 7).

**Figura 7.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) bolor verde em frutos de laranja ‘Valência’, tratados com produto à base de extrato de alga *Ascophyllum nodosum* nas concentrações de 0; 25; 50; 75 e 100 mL L<sup>-1</sup> e fungicida benzimidazol (10,3 mL L<sup>-1</sup>), mantidos sob temperatura de 25° C e avaliados ao longo de sete dias. Colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média.



Fonte: Dados originais da pesquisa.

Forneret al. (2013) avaliaram o uso de agentes de biocontrole sob o manejo do bolor verde em pós-colheita de laranjas. Contrário aos resultados obtidos no presente trabalho, o uso desses agentes não controlou a doença e não reduziu a AACPD. Porém, quando o uso de agentes foi associado ao tratamento térmico todos os produtos biológicos tiveram eficiência aumentada no controle da doença.

O uso de produtos alternativos como o extrato de alga *A. nodosum*, assim como no presente trabalho, também proporcionou redução da AACPD do bolor verde quando frutos de laranja ‘Valência’ foram tratados com produto à base do extrato e inoculados com *P. digitatum* (Mafra et al., 2020).

#### 4. Conclusão

Conclui-se que o produto à base de extrato da alga *Ascophyllum nodosum*, nas dosagens de 75 e 100 mL L<sup>-1</sup>, é capaz de reduzir o crescimento micelial e a produção de conídios do fungo *Penicillium digitatum*, sendo assim, foi constatado que o produto possui efeito fungistático. Ademais, o produto possui efeito sobre a permeabilidade da membrana plasmática, na dosagem de 100 mL L<sup>-1</sup>, indicando um possível mecanismo de ação do produto sobre o patógeno.

O extrato da alga *A. nodosum* na dosagem de 75 mL L<sup>-1</sup> é capaz de reduzir a incidência e a severidade do bolor verde em pós-colheita nos frutos de laranja, podendo ser incluído no programa de manejo integrado dessa importante doença em pós-colheita de citros.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Acadian Seaplants pelo fornecimento do produto para a pesquisa, ao Grupo de Estudos Aplicados em Horticultura do IFSULDEMINAS - Campus Machado pelo fornecimento dos frutos de laranja e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) pelo apoio à publicação deste trabalho.

## Referências

- Araújo, J. A. M. (2014). *Nanopartículas, óleos essenciais e extratos vegetais no controle in vitro de fungos fitopatogênicos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, Rio Grande do Norte.
- Barboza, H. T. G., Costa, J. B. N., Soares, A. G., Sarquis, M. I. M., Silva, O. F., Lira, A. F. & Alcântara, I. (2013). Controle de patógenos pós-colheita de mamão (*Caricapapaya L.*) pela utilização das fosforilhidrazonas: um estudo de caso. *Revisão anual de patologia de plantas*, 21, 344-386.
- Carvalho, M. E. A., & Castro, P. R. C. (2014). *Extratos de algas e suas aplicações na agricultura*. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca.
- Ferreira, D. F. (2019). Sisvar: a computeranalysis system to fixed effects Splitsplot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37 (4), 529-535. Obtido em: <http://www.biometria.ufra.br/index.php/BBJ/article/view/450>.
- Forner, C., Bettiol, W., Nascimento, L. M. & Terao, D. (2013). Controle em pós-colheita de *Penicillium digitatum* em laranja-pera com microrganismos e tratamento térmico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35 (1), 23-31.
- Gomes, E. C. & Serra, I. M. R. S. (2013). Eficiência de produtos naturais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em pimenta na pós-colheita. *Summa Phytopathologica*, 39 (4), 290-292.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Obtido em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>.
- Mafrá, M. N., Naves, M. E. F., Rodrigues Jr., J. L. & Rezende, D. C. (2020). Alternative products in the management of green mold in postharvest oranges. *Research, Society and Development*, 9 (10), e9629109330.
- Maro, L. A. C. (2010). *Control of green mold in citrus with alternatives to pesticides*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais.
- Melo, T. A. (2017). *Efeito do extrato da alga marinha Ascophyllum nodosum e do fosfito de potássio na morfofisiologia do fungo Colletotrichum gloeosporioides, na indução de resistência em mangas 'Tommy Atkins' contra a antracnose em características físicas e químicas desses frutos*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo.
- Oliveira, J. A. (1999). *Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativas L.) e pimentão (Capsicumannanum L.)*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras, Minas Gerais.
- Paiva, K. D., Martins, F. A., Santos, T. A., Rezende, D. C., Vilas Boas, B. M. & Xavier-Mis, D. M. (2020). *Ascophyllum Nodosum* seaweed extract as an alternative for control of post-harvest soft rot in strawberries. *Brazilian Journal of Development*, 6 (3), 13532-13543.
- Pascholati, S. F. & Dalio, R. J. D. (2018). Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M. & Bergamin Filho, A. *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos* (pp. 424-450). São Paulo: Agronômica Ceres.
- Peres, J. C. F., Carvalho, L. R., González, E., Berian, L. O. S. & Felício, J. D. (2012). Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. *Ciência e Agrotecnologia*, 36 (3), 294-299.
- Rezende, D. C. (2010). *Efeito de compostos voláteis identificados a partir de Saccharomyces cerevisiae sobre Colletotrichum gloeosporioides e Colletotrichum acutatum e no controle da antracnose em goiaba*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo.
- Rezende, D. C., Brandão, D. F. R., Brand S. C., Blumer, S., Pascholati, S. F. & Mafrá, N. M. (2020a). Fosfito de potássio e suas implicações no controle de *Phytophthora plurivora* em feijão. *Research, Society and Development*, 9 (10), p. e5629108824.
- Rezende, D. C., Brandão, D. F. R., Brand S. C., Blumer, S., Pascholati, S. F. & Mafrá, N. M. (2020b). Mecanismos de ação do fosfito de potássio no crescimento e desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae*, agente causal da gomose em citros. *Research, Society and Development*, 9 (10), p. e5369108822.
- Ribeiro, J. G., Serra, I. M. R. S. & Araújo, M. U. P. (2016). Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. *Summa Phytopathologica*, 42 (2), 160-164.
- Santos, T. A. (2017). *Extrato de alga como controle alternativo do bolor verde em citros*. Monografia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Machado. Machado, Minas Gerais.
- Shaner, G. & Finney, R. R. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slowmildewing in knox wheat. *Phytopathology*, 67 (8), 1052-1056.
- Skott, A. J., Knott, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30, 507-512.
- Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C. & Viñas, I. (2001). Improving control of green and blue molds of oranges by combining Pantoea agglomerans (CPA-2) and sodium bicarbonate. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (7), 685-694.
- Vieira, F. C. F. (2018). *Anatomia e ultraestrutura do processo de infecção de xanthomonas causadoras de doenças em citros*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Jaboticabal, São Paulo.
- Viencz, T., Oliari, I. C. R., Ayub, R. A., Faria, C. M. D. R. & Botelho, R. V. (2020). Postharvest quality and brown rot incidence in plums treated with *Ascophyllum nodosum* extract. *Semina: Ciências Agrárias*, 41 (3), 753-766.