



ESTUDO DE MECANISMOS USADOS POR LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS CAUSADORES DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA DE FRUTAS

Adriane Maria da **Silva**¹; Monica Pirola **Viecelli**²; Daniel **Terao**³.

Nº 14411

RESUMO: *Muitos produtores ainda utilizam agrotóxicos no tratamento pós-colheita, provocando a contaminação química da fruta e colocando em risco a saúde da população. O controle biológico é um método alternativo que não deixa resíduos tóxicos. O presente trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de ação envolvidos no biocontrole das leveduras: Sporodiobolus pararoseus, Pichia spp, Pichia membranifaciens, Pichia guilliermondii, Sporobolomyces roseus, Debaryomyces hansenii e Rhodotorula mucilagenosa, sobre o crescimento micelial de Penicillium digitatum de citros e de Fusarium pallidoroseum de melão. Nos estudos de voláteis foram usadas placas bipartidas contendo BDA e colocado em um dos lados a suspensão de levedura e no outro, disco de micélio do fungo. Para avaliação da capacidade de inibição ao crescimento foram realizados dois experimentos. No primeiro, espalhou-se em placas contendo o meio BDA a suspensão com um fungo e após a superfície seca foram adicionados discos estéreis de papel de filtro, previamente imersos em suspensão de leveduras. No segundo experimento, depositou-se em uma extremidade da placa um disco de micélio e no outro lado fizeram-se riscos paralelos com a suspensão da levedura, da borda da placa até o centro. Em ambos os testes as placas foram fechadas e mantidas em BOD a 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 h, avaliando-se, diariamente, o crescimento da colônia. Observou-se que, para todas as combinações de fungos e leveduras avaliadas, compostos voláteis não estão envolvidos no biocontrole. Nos estudos sobre antibiose e competição, observou-se que, ao invés do halo de inibição, formou-se, ao redor dos discos embebidos com as leveduras, uma zona de crescimento, que impedia o desenvolvimento dos fungos, diferindo significativamente da testemunha. De maneira similar, os fungos não conseguiram crescer entre os riscos de leveduras e nas proximidades deles, destacando-se a levedura S. roseus. Sugere-se que os principais mecanismos envolvidos no biocontrole das espécies de leveduras avaliadas são: a antibiose e a competição por nutrientes.*

Palavras-chaves: *Controle biológico, laranja, melão, patologia pós-colheita.*

1 Bolsista FAPESP: Graduação em Engenharia Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP; drisilva66@gmail.com

2 Bolsista FAPESP: Graduação em Engenharia Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP; moviecelli@hotmail.com

3 Pesquisador, Embrapa Meio ambiente; daniel.terao@embrapa.br



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT: *Many producers still use pesticides on post-harvest treatment, causing chemical contamination of fruit and endangering the health of the population. Biological control is an alternative method that leaves no toxic residues. The present work aimed to study the mechanisms of action involved in biocontrol of yeasts: *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia membranifaciens* *Pichia* spp, *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* and *Rhodotorula mucilagenosa*, against mycelial growth of *Penicillium digitatum* of citrus and *Fusarium pallidoroseum* of melon. On the study of volatile, split Petri dishes containing PDA medium were used, placing on one side the suspension of yeast and fungus mycelium disc on the other side. About antibiosis and competition were carried out two experiments. In the first one, it was spread on Petri dishes, containing the PDA medium, the suspension of the fungus and after the surface was dried, sterile filter paper disks, previously immersed in the suspension of yeast were added. In the second experiment, it was placed on one side of the Petri dishes a mycelium disk and on the other side, parallel risks with the yeast suspension were done, from the edge of the dish to the center. In both tests, the Petri dishes were sealed and kept in BOD to $25 \pm 2^\circ$ C under photoperiod of 12h, evaluating daily the mycelium growth. It was observed that, for all combinations of fungi and yeasts evaluated, the emission of gases probably was not the mechanism involved in biocontrol. About the studies of antibiosis and competition, it was observed that instead of inhibition halo there was a growing zone of yeasts around the disks soaked with them where the fungi did not developed, differing significantly from the control. Similarly, fungi failed to grow between the risks of yeast and near them, especially the yeast *S. roseus*. It can be suggested that the main mechanisms involved in biocontrol species of evaluated yeasts are antibiosis and competition for nutrients.*

Key words: *biological control, orange, melon, postharvest pathology.*



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera os 40 milhões de toneladas. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas abrange 2,2 milhões de hectares, gera quatro milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de US\$ 11 bilhões (IBRAF, 2012). Especificamente em relação às frutas tropicais, o Brasil tem se destacado como importante produtor, consumidor e exportador, expandindo o agronegócio e buscando adequação ao mercado consumidor.

Há muitas perdas dessas frutas devido principalmente à deficiência no transporte e armazenamento refrigerado dos produtos, manipulação inadequada e tratamentos fitossanitários ineficientes, ocorrendo perdas quantitativas e qualitativas, depreciando as frutas brasileiras nas negociações internacionais (VENTURA, 2007).

A moderna agricultura requer redução no uso de pesticidas na produção de alimentos, havendo uma necessidade crescente de estratégias de controle alternativas (LAPEYREDEBELLAIRE & MOURICHO, 2000).

Microrganismos antagonísticos na pós-colheita podem interferir no ciclo de vida do fitopatógeno. Isso pode ocorrer através de parasitismo, competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas (PUNJA; UTKHEDE, 2003), compostos antibióticos voláteis (STROBEL, 2006) e não voláteis (VINALE et al., 2006)

Pesquisas recentes têm demonstrado a eficácia do controle biológico, através da ação de isolados de *Bacillus subtilis* e de leveduras no controle de doenças fúngicas em pós-colheita (LEELASU-HAKUL et al., 2008; CHANCHAOVIVAT et al., 2007).

O controle biológico tem grande potencial no controle de doenças pós-colheita de frutas, uma vez que parâmetros ambientais, tais como: temperatura e umidade, podem ser rigidamente controlados de modo a favorecer o agente de biocontrole. (WISNIEWSKI et al., 2007)

Dentre os antagonistas destacam-se as leveduras, que fazem parte da flora epifítica das plantas e são ativas competidoras de nutrientes, efetivas como colonizadoras de ferimentos e, em alguns casos, indutoras de resistência do hospedeiro, além de produtoras de enzimas líticas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de inibição de diversas espécies de leveduras em fungos causadores de doenças pós-colheita de laranja e melão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Inibição por compostos voláteis



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Avaliaram-se *in vitro* as leveduras: SB=*Sporodiobolus pararoseus*, L4-1=*Pichia* spp., L21=*Pichia membranifaciens*, L29=*Pichia guilliermondii*, L41=*Sporobolomyces roseus*, L62=*Debaryomyces hansenii* e L17=*Rhodotorula mucilagenosa*. Os fungos estudados foram: *Fusarium pallidroseum* de melão e *Penicillium digitatum* de laranja.

Em placas de poliurestano bipartidas, contendo o meio BDA, espalhou-se em um dos lados, 50 μL da suspensão da ordem de 10^8 células mL^{-1} de uma determinada levedura e em outro lado um disco de micélio do fungo. O controle foi constituído por placas contendo o fitopatógeno na ausência de levedura. As placas foram vedadas e mantidas em BOD a 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 h, sendo utilizadas seis repetições para cada tratamento. A avaliação do crescimento micelial foi feita, quando a testemunha atingiu o bordo da placa, efetuando-se duas medições diametralmente opostas.

2.2 Estudo de mecanismo de controle baseado em antibiose e competição.

Em placas contendo meio BDA, adicionou-se 20 μL da suspensão de 10^5 conídios mL^{-1} do fungo, espalhando-a com um alça de Drigalski, aguardando-se até que a superfície estivesse seca. Em um béquer estéril, contendo a suspensão de cada levedura na concentração de 10^8 células/ mL^{-1} , adicionaram-se discos estéreis de papel de filtro, que permaneceram durante 1 minuto, sendo em seguida retirados e colocados sobre gaze estéril, para se retirar o excesso da suspensão e transferidos para a superfície das placas contendo a suspensão fúngica.

Em outro experimento, em placas contendo meio BDA depositou-se, em um canto da placa, um disco de micélio e no outro lado fez-se riscos longitudinais paralelos, da borda da placa até o centro, com o auxílio de uma alça de platina contendo a suspensão de cada levedura na concentração de 10^8 células mL^{-1} .

Em ambos os experimentos as placas foram mantidas em BOD a 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 h. Aos seis dias de incubação, mediu-se o crescimento micelial do fungo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Inibição por compostos voláteis

Observou-se que a emissão de voláteis, provavelmente, não é o responsável pela inibição ao crescimento fúngico, uma vez que não houve diferença significativa do crescimento micelial em relação às testemunhas nos testes realizados com fungos de melão e laranja (Figura 1).

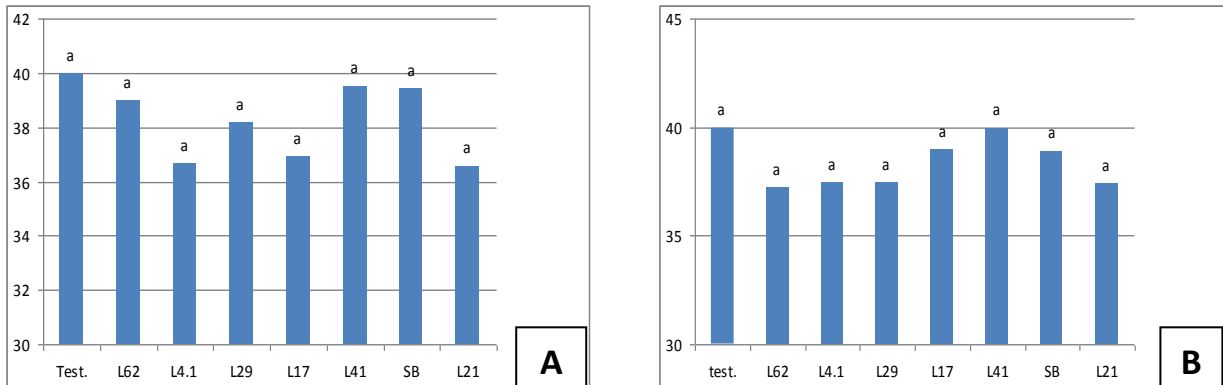


Figura 1. Diâmetro médio de colônias de *Fusarium pallidoroseum* (A) e *Penicillium digitatum* (B) quando pareados com leveduras em condição de separação espacial para avaliação da produção de compostos voláteis inibitórios. L41=*Sporobolomyces roseus*; SB=*Sporodiobolus pararoseus*; L29=*Pichia guilliermondii*; L21=*Pichia membranifaciens*; L62=*Debaryomyces hansenii*; L4.1=*Pichia* spp. e L17=*Rhodotorula mucilagenosa*.

3.2 Inibição por compostos difusíveis em meio de cultura e por competição.

No primeiro experimento, em nenhum dos tratamentos, apesar de não se observar a formação do halo de inibição, característico da antibiose, verificou-se que, ao redor dos discos, onde havia uma zona de crescimento da levedura, não havia o crescimento dos fungos.

Medindo-se essa zona de crescimento ao redor do disco verificou-se que todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha, destacando-se a levedura L41 (*S. roseus*), que apresentou um diâmetro maior de inibição do crescimento micelial dos fungos, *F. pallidoroseum* e *P. digitatum*, significativamente maior que os demais tratamentos (Figuras 2).

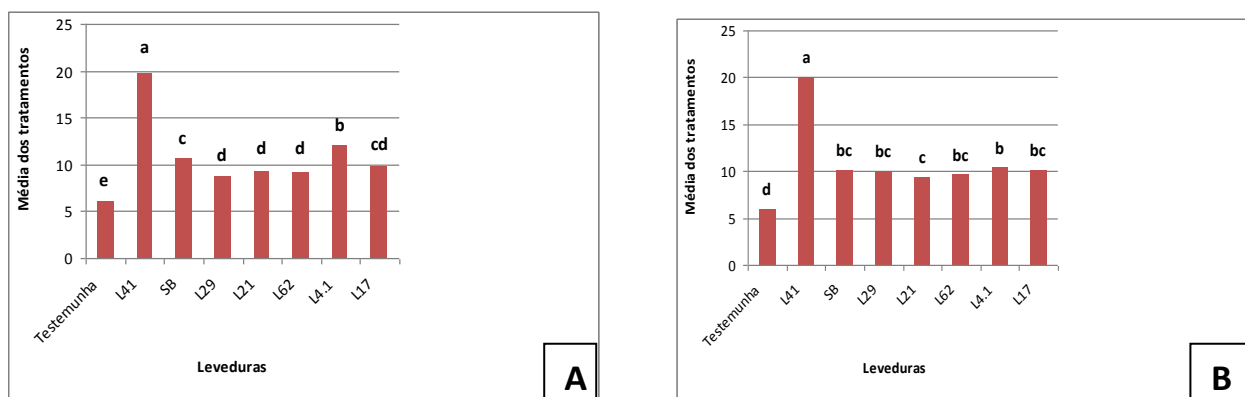


Figura 2. Comprimento da zona de crescimento ao redor de discos embebidos com as leveduras: L41=*Sporobolomyces roseus*; SB=*Sporodiobolus pararoseus*; L29=*Pichia guilliermondii*; L21=*Pichia membranifaciens*; L62=*Debaryomyces hansenii*; L4.1=*Pichia* spp. e L17=*Rhodotorula mucilagenosa*, impedindo o desenvolvimento de *Fusarium pallidoroseum* (A) e *Penicillium digitatum* (B).



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

No segundo experimento, de maneira similar, observou-se que o crescimento micelial dos fungos, *F. pallidorozeum* e *P. digitatum*, ocorria, normalmente, até alcançar os traçados paralelos, onde havia o crescimento das leveduras. Não havia desenvolvimento dos fungos entre os riscos das leveduras e nem sobre eles, sugerindo-se a presença de algum composto difusível no meio, produzido pelas leveduras, capaz de inibir o crescimento fúngico ou a competição delas por algum nutriente essencial ao desenvolvimento desses fungos.

4. CONCLUSÃO

A levedura L41=*S. roseus* é eficaz na inibição do crescimento micelial de *F. pallidorozeum* e *P. digitatum*.

Os principais mecanismos envolvidos na restrição ao crescimento de colônias de *F. pallidorozeum* e *P. digitatum* pelas espécies de leveduras avaliadas, possivelmente são a competição por nutrientes e a antibiose por meio de compostos difusíveis não voláteis.

5. AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/23432-8) pelo apoio financeiro para execução do Projeto de Pesquisa e pela concessão da bolsa de treinamento técnico (FAPESP: 2012/19557-2)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANCHACHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, San Diego, v. 42, p. 326 - 335, 2007.

IBRAF (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS). **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>> Acesso em: 02/06/2012.

LAPEYRE DE BELLAIRE, L. de & MOURICHON, X. **The biology of Colletotrichum musae** (Berk. et Curt.) Arx and its relation to control of banana anthracnose. *Acta Horticulturae* 490:287-303. 2000

LEELASU-HAKUL W.; HEMMANEEA 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**, Pullman, v. 48, p.113 - 121, 2008.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

PUNJA, Z.K.;UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.21,p.400-407,2003

STROBEL, G. Muscodor albus and its biological promise. **Journal of industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v.33,p.514-522, 2006

VENTURA, J.A., ZAMBOLIM, L., COSTA, H. **Patologia pós-colheita: doenças do mamão, banana e abacaxi**. In: Simpósio Brasileiro de Pós-colheita de Frutas, Hortaliças e Flores (2.: 2007: Viçosa, MG) Palestras e resumos / II simpósio brasileiro de pós-colheita de frutas, hortaliças e flores, UFV, Viçosa, MG, 24 a 27 de abril de 2007; editores Maria Aparecida Nogueira Sedyama... [et al.]. – Viçosa, Mg, 2007 p. 149 a 166.

VINALE, F.; MARRA, R.;SCALA,F.; GHISALBERT,E.L.; LORITO,M,;SIVASITHAMPARAM,K. major secondary metabolites produced by two commercial Trichoderma strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.43,p.143-148,2006

WISNIEWSKI, M.; WILSON, C.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; EL GHAOUTH, E.; STEVENS, C. postharvest Biocontrol: New Concepts and Applications. In: VICENT, C.; GOETTEL, M.S.; LAZAROVITS, G. Biological Control: a Global Perspective. Cap.29, p 262-273.2007