

**METODOLOGIA PARA SELEÇÃO E TESTE DE MICROORGANISMOS
EPÍFITAS DE FRUTOS DE MAMÃO PARA UTILIZAÇÃO EM CONTROLE
BIOLÓGICO CONTRA *Colletotrichum gloesporioides***

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 118

**METODOLOGIA PARA SELEÇÃO E TESTE DE
MICROORGANISMOS EPÍFITAS DE FRUTOS DE
MAMÃO PARA UTILIZAÇÃO EM CONTROLE
BIOLÓGICO CONTRA *Colletotrichum gloesporioides***

G. de Capdeville

J. R. P. Santos

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteadó*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

C 236 Capdeville, G. de.

Metodologia para seleção e teste de microorganismos epífitas de frutos de mamão para utilização em controle biológico contra *Colletotrichum gloesporioides* / G. de. Capdeville e J. R. P. Santos. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

21 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 118)

1. *Colletotrichum gloesporioides* - controle biológico. 2. Mamão – fungo – controle biológico. I. Santos, J. R. P. II. Título. II. Série

632.96 – CDD 21.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAIS E MÉTODOS	10
Isolamento de microorganismos epífitas de frutos e folhas de	
mamão	10
Preparação do inóculo do patógeno.....	10
Avaliação “in vivo” da efetividade de controle dos	
microorganismos epífitas	11
Análise Estatística	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

METODOLOGIA PARA SELEÇÃO E TESTE DE MICROORGANISMOS EPÍFITAS DE FRUTOS DE MAMÃO PARA UTILIZAÇÃO EM CONTROLE BIOLÓGICO

G. de Capdeville¹
J. R. P. Santos²

RESUMO

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* é uma das mais importantes doenças pós-colheita do mamão. O controle desta enfermidade têm sido realizado por meio de tratamentos pós-colheita com fungicidas protetores. Entretanto, dado à crescente preocupação com resíduos de agrotóxicos sobre os produtos, bem como o desenvolvimento de resistência pelos patógenos, novas estratégias de controle, incluindo o controle biológico, têm sido testadas como alternativas ao uso de fungicidas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo eficiente para seleção massal e teste de microorganismos antagonistas para utilização como agentes de controle biológico. A metodologia testada mostrou grande eficácia para a seleção de antagonistas com eficácia para controlar a antracnose em pós-colheita de frutos de mamão. Tal metodologia pode ser facilmente adaptada para seleção de agentes de controle em outras culturas.

¹ Engenheiro agrônomo – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Engenheiro agrônomo – Mestrando em Fitopatologia - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum gloesporioides*, is one of the most important postharvest diseases of papaya fruit. The control of this disease has been accomplished by fungicide deep or drench after harvest while the fruit are being processed. Due to the increasing concern with fungicide toxicity, development of fungicide resistance by pathogens, and potential harmful effects on human health and on the environment, the search for alternative control methods has increased considerably. The main objective of the present work was to develop an effective protocol to select and test a large number of microorganisms to use in biological control of papaya postharvest diseases. The methodology tested did show great efficacy to select and test effective antagonists able to control anthracnose of papaya. This methodology is very useful and may be easily adapted to other crops.

INTRODUÇÃO

No Brasil, as perdas pós-colheita de frutos tropicais como banana, manga e mamão situam-se na ordem de 50% ou mais dos produtos comercializados (PANTASTICO, 1981). Segundo Fagundes (1998), dentre os fatores que influenciam a qualidade dos frutos na fase de comercialização estão as perdas provocadas por injúrias mecânicas e por patógenos. A falta de um manuseio adequado tanto antes como durante a colheita é considerado o principal causador de danos nos frutos. Estes danos causados aos frutos também facilitam o ataque de microorganismos patogênicos que afetam sua qualidade e reduzem sua vida útil e sua resistência ao transporte e armazenamento.

A antracnose é considerada a doença mais importante na pós-colheita do mamão e ocorre em todos os países produtores. Embora ocorra em frutos de qualquer estágio de desenvolvimento, apresenta-se com maior frequência nos maduros. Sua nocividade para a economia é muito grande, pois os frutos atacados tornam-se impróprios para o consumo e inaceitáveis para a comercialização. Ainda que frutos colhidos não apresentem sintomas da doença, ela se manifesta na fase de pós-colheita, causando grandes perdas.

A antracnose do mamoeiro é atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeoporioides* (Penzing) Penzing et Saccardo in Penzing, que tem como fase teliomórfica, *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld & Shrenk, Phylum Ascomycota, classe Ascomycetes, sub-classes sordariomycetida, ordem Phylloporales, família Glomerellaceae e gênero *Glomerella* (SNOWDON, 1990).

Esta enfermidade se caracteriza, inicialmente, por pequenas manchas arredondadas, aquosas e pardacentas, sobre a superfície do fruto. No decorrer da maturação, essas manchas vão aumentando rapidamente de tamanho, formando lesões circulares ligeiramente deprimidas. O ataque do fungo é favorecido por condições de alta temperatura e umidade. Sua penetração ocorre por ferimentos causados na superfície dos frutos por insetos ou injúrias mecânicas. O seu controle somente é alcançado por meio de um contínuo programa de pulverização (MEDINA, 1989).

Segundo Pascholati (1995), fungos do gênero *Colletotrichum*, causadores da antracnose, costumam provocar infecções latentes em frutos de

várias espécies vegetais. Estes fungos penetram nos frutos ainda verdes, onde permanecem inativos até seu amadurecimento. Assim, frutos aparentando completa sanidade quando verdes podem vir a apresentar grande quantidade de lesões por ocasião do amadurecimento. A colonização ocorre nos frutos maduros, embora a infecção tenha ocorrido muito antes.

O controle de doenças de pós-colheita do mamão tem sido feito quase que exclusivamente por meio do uso de fungicidas protetores, entretanto, tais produtos estão se tornando menos efetivos porque os patógenos estão desenvolvendo resistência. Também, a recente preocupação com a contaminação de alimentos por resíduos de pesticidas tem precipitado a completa retirada de um número expressivo de fungicidas-chave do mercado. Esses desenvolvimentos têm diminuído a efetividade de se controlar doenças de pós-colheita e têm estimulado a busca por novas tecnologias alternativas de controle (EL-GHAOUTH et al., 1994).

As restrições quanto ao uso de fungicidas estão relacionadas ao custo, à possibilidade de aquisição de resistência pelo patógeno e às possíveis conseqüências negativas para o ecossistema. Além da quantidade, a busca por qualidade, aliadas à redução de custos, influencia um novo padrão tecnológico na agricultura, favorecendo a integração do controle biológico de doenças no sistema de manejo.

Alguns microorganismos antagonistas que vivem como epífitas sobre os frutos, parecem crescer e colonizar mais rapidamente que os patógenos os ferimentos onde, em geral, as infecções se iniciam. Segundo Castoria et al. (2001), os modos de ação que desempenham um papel significativo na atividade de biocontrole destes organismos antagonistas são: competição por espaço e nutriente, antibiose, micoparasitismo e ativação de respostas de defesa no hospedeiro.

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver uma metodologia de coleta, seleção e teste, em larga escala, da efetividade de microorganismos epífitas para controlar doenças de pós-colheita do mamão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de microorganismos epífitas de frutos e folhas de mamão

Microorganismos epífitas foram isolados da superfície de folhas e frutos de plantas de mamão dos cultivares 'Solo' e 'Formosa', selecionadas ao acaso, da estação experimental da Universidade de Brasília.

Amostras de folhas e frutos foram coletadas e cortadas, separadamente, em pedaços de aproximadamente 3 x 3 cm. Quatro a cinco pedaços de casca ou folhas foram imersos em 20 ml de água Mili-Q estéril dentro de um tubo de ensaio. Os tubos foram agitados em um agitador por cerca de 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado através de uma camada única de gaze estéril. Em seguida, alíquotas de 1 ml da suspensão de microorganismos foram utilizadas para preparar diluições seriadas até a proporção de 1:10.000 com intervalos de 10x. De cada uma destas diluições, 20 µL foram colocados em placas de petri contendo meio BDA adicionado ou não de 0.1% de sulfato de estreptomicina, para separar bactérias de fungos. As placas foram encubadas em câmara BOD a 25 °C e umidade relativa de 80%. Após 24 a 48 horas de incubação, colônias individualizadas de fungos miceliais, bactérias e leveduras que surgiram nas placas foram repicadas para novas placas contendo meio BDA.

As culturas puras obtidas foram utilizadas para preparar suspensões celulares que serviram para armazenar os microorganismos por meio de três métodos de armazenamento: sob óleo mineral, sobre sílica gel e sobre papel de filtro estéril, como descrito por Dhingra e Sinclair (1985). A partir destas culturas estoque foram preparadas as suspensões de células utilizadas na seleção "in vivo".

Preparação do inóculo do patógeno

Um isolado de *Colletotrichum gloesporioides* (Cg-32) mantido no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília foi utilizado como fonte de inóculo para os experimentos. A patogenicidade do isolado foi avaliada pela inoculação de frutos de mamão (*Carica papaya* L.). A partir das margens das lesões formadas nestes frutos, foram retirados fragmentos de tecido contendo parte do tecido infectado e parte do tecido sadio e, então, os mesmos foram imersos em etanol 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio 1% por dois

minutos e finalmente lavados três vezes consecutivas em água destilada estéril. Após serem secados em papel de filtro estéril os pedaços de tecido foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA suplementado com 0.1% de sulfato de estreptomicina. As placas foram colocadas em câmara BOD a 25 °C e, após as colônias serem formadas, discos de micélio foram retirados das margens da colônia e transferidos para tubos de ensaio contendo BDA acrescido de 0.1% de sulfato de estreptomicina. Após crescer por 5 dias a 25 °C, os tubos foram armazenados no refrigerador a 5 °C. Tais culturas foram testadas para sua patogenicidade a cada 2 meses. Estas culturas estoque foram utilizadas para produzir culturas esporulantes de 10 dias sobre meio de peptona – glicose – agar (PGA), a partir dos quais os esporos foram coletados em água estéril. A concentração final da suspensão de esporos foi ajustada utilizando um hemacitômetro.

Avaliação “in vivo” da efetividade de controle dos microorganismos epífitas

Para avaliar de forma massiva a efetividade de microorganismos epífitas em controlar a antracnose do mamão, frutos de mamão em ponto de colheita (dois terços da superfície amarelada) foram colhidos, esterilizados superficialmente por imersão em etanol 1% por dois minutos seguido de imersão em hipoclorito de sódio 1% por cinco minutos e, então, de três lavagens sucessivas em água destilada estéril. Após deixados secar a temperatura ambiente, foram removidos fragmentos de tecido dos frutos (contendo a casca e cerca de 0.5 a 1 cm de polpa) de 3 x 3 cm os quais foram acondicionados sobre papel de filtro estéril, umedecido com água estéril, dentro de caixas gerbox (Figura 1). Após o acondicionamento dos pedaços de fruto nas caixas gerbox, foram realizados ferimentos de 3 x 3 mm no centro dos pedaços de fruto (Figura 2). Cada ferimento recebeu uma gota de 30 µL de uma suspensão de células do antagonista a ser testado nas seguintes concentrações (0, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ e 10⁹ células por mL) e, em diferentes tempos (0, 24, 48, 72 e 96 horas) após a inoculação com o agente antagonista, os ferimentos foram inoculados com uma gota de 30 µL de uma suspensão de esporos de *Colletotrichum gloesporioides* na concentração de 10⁴ esporos por mL. Os pedaços de frutos foram avaliados diariamente para o

aparecimento de lesões circulares cujo diâmetro foi medido e usado para calcular a área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) (SHANER e FINNEY, 1977). Os resultados de AACPD foram utilizados para realizar a análise estatística.

Análise Estatística

Os experimentos, repetidos três vezes, foram conduzidos em um delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições. Os valores de AACPD foram utilizados para realizar uma análise de variância utilizando o procedimento PROC GLM do SAS (SAS Institute, Carry, NC) e, sempre que efeitos significativos ou interações significativas foram identificadas, análise de regressão foi aplicada utilizando o procedimento SOLUTION do SAS para comparar os coeficientes de regressão para os níveis de concentração do antagonista (0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 células por mL) e horas de inoculação com o patógeno (0 , 24 , 48 , 72 e 96 horas) (KUEHL, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de seleção e avaliação massal utilizada para testar a eficácia de controle de agentes antagonistas mostrou ser bastante efetiva, uma vez que não somente muitos antagonistas puderam ser avaliados simultaneamente, mas também, muitas concentrações de células do antagonista (Figura 3). Com base nos resultados da utilização deste procedimento, foi possível selecionar um grande número de organismos antagonistas com efetividade de controle da antracnose. Dentre os microorganismos estudados, as leveduras foram as mais eficientes em controlar a antracnose do mamão e destas, cerca de trinta isolados foram bastante efetivos. Destes trinta isolados 4 apresentaram grande potencial de controle, como pode ser visto pela considerável ou total redução da área abaixo da curva de progresso da doença proporcionadas pelos antagonistas mais eficientes (Figura 4).

O desenvolvimento de protocolos eficientes para seleção massal de microorganismos antagonistas para uso como agentes de controle biológico é fundamental para garantir a agilidade e a eficácia necessária ao

desenvolvimento de formulações para fins comerciais. É importante considerar que o procedimento de seleção massal descrito neste trabalho não garante uma seleção definitiva, uma vez que testes adicionais mais elaborados se tornam necessários para confirmar a eficácia de um dado agente selecionado. Entretanto, o procedimento garante rapidez na identificação dos potenciais antagonistas bem como na identificação daqueles agentes ineficazes. Outra vantagem é que o procedimento também permite identificar as concentrações de células do antagonista mais promissoras para uso no controle de patologias de pós-colheita. É importante salientar que todo cuidado deve ser exercido quando da descontaminação tanto dos frutos quanto das caixas gerbox e dos papéis de filtro, pois contaminações com microorganismos oportunistas podem prejudicar a avaliação dos experimentos. Finalmente, a metodologia de seleção massal apresentada neste trabalho pode ser facilmente adaptada para outros sistemas incluindo frutos de hortaliças como abóbora, pimentão, berinjela, entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTORIA, R.; CURTIS, F. de; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; CICCIO, V. de. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, NL, v. 22, p. 7-17, 2001.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; KHAN, V.; LU, J. Y.; STEVENS, C.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 78, n. 9, p. 837-844, 1994.

FAGUNDES, G. R. **Características físicas e químicas do mamão do grupo 'Solo' comercializado em 4 estabelecimentos de Brasília-DF**. 1998. Não

paginado. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Brasília, Brasília.

KUEHL, R. O. **Design of experiments**: statistical principles of research design and analysis. 2nd ed. New York: Duxbury Press, 2000.

MEDINA, J. C. Cultura. In: MEDINA, J. C.; BLEINROTH, E. W.; SIGRIST, J. M. M.; MARTINZ, J. de; NISIDA, A. L. A. C.; BALDINI, V. L. S.; LEITE, R. S. S. F.; GARCIA, B. **Mamão**: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2. ed. rev. ampl. Campinas: ITAL, 1989. p. 1-178.

PANTASTICO, E. B. Importância do manuseio pós-colheita e armazenamento de Frutas. In: CURSO de pós-colheita e armazenamento de frutas. Campinas: ITAL, 1981. não paginado.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimática. In: BERGAMIN, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 365-392.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SNOWDON, A. L. **Color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruit and vegetables**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990. v. 1.

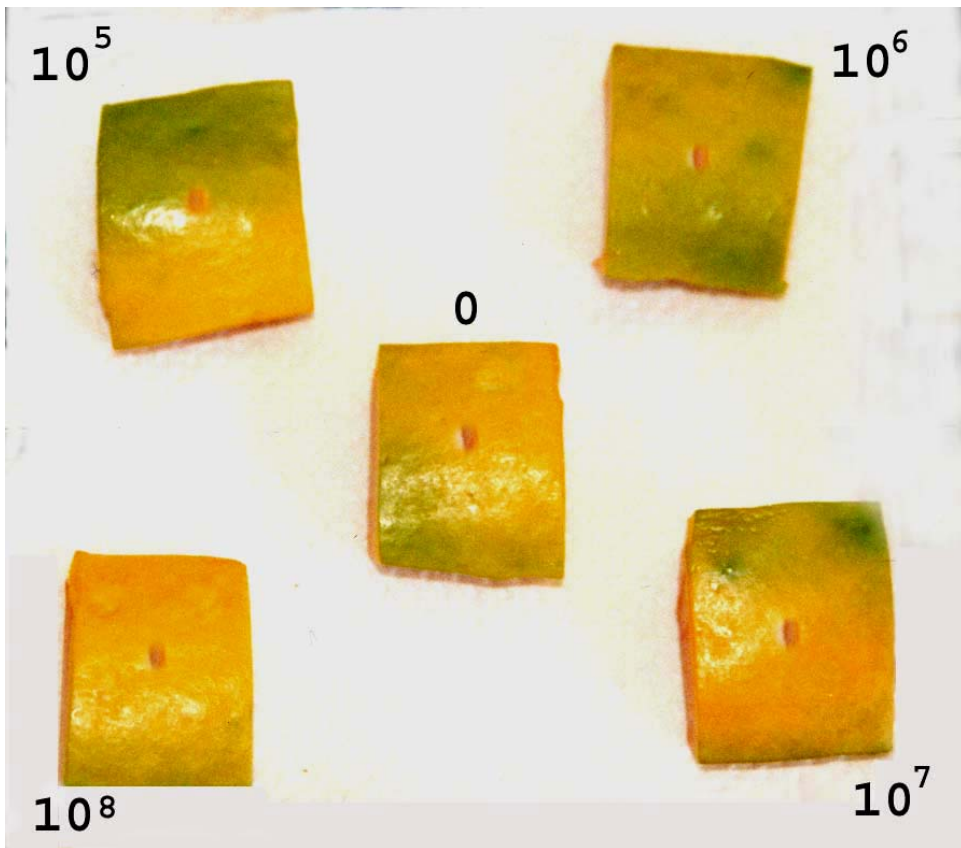


FIGURA 1



FIGURA 2

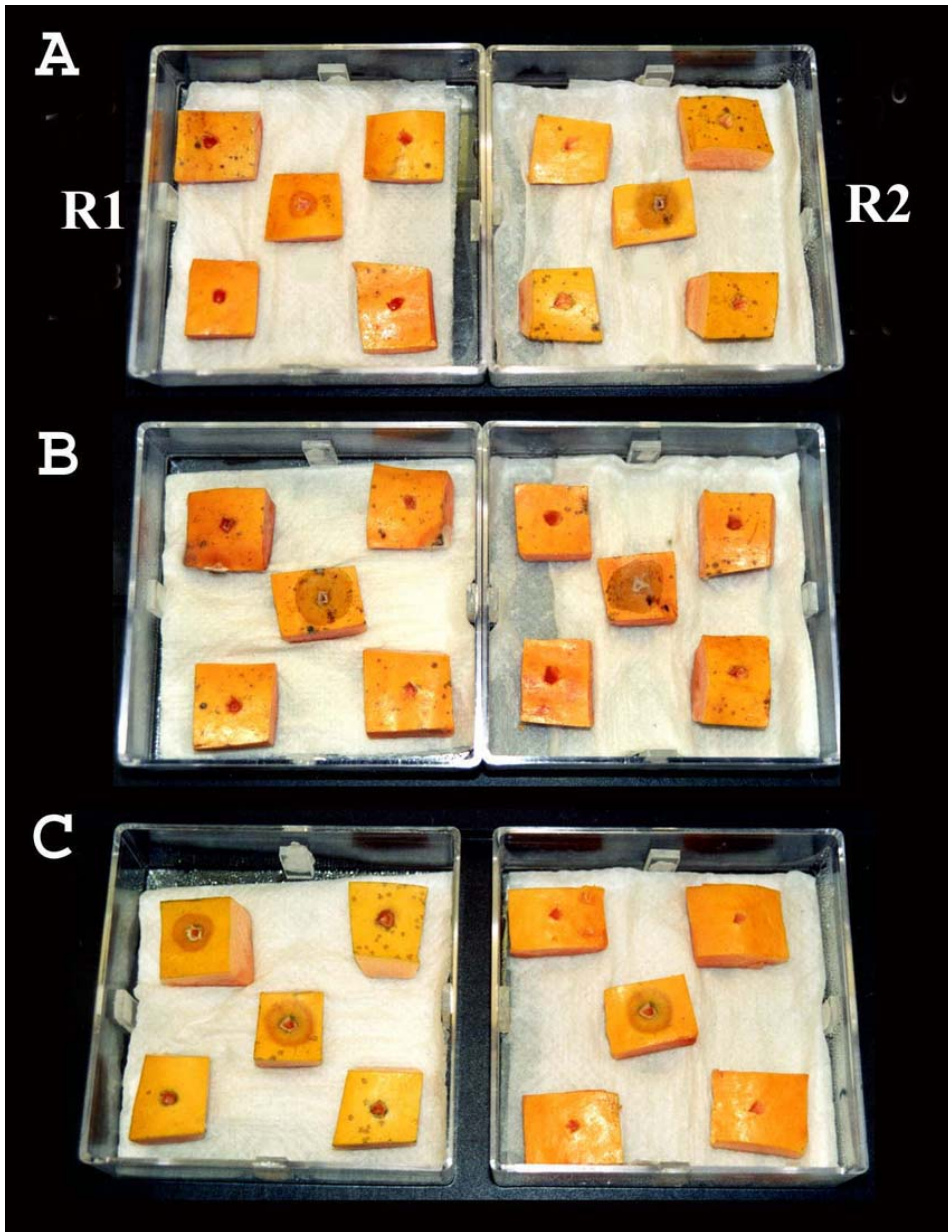


FIGURA 3

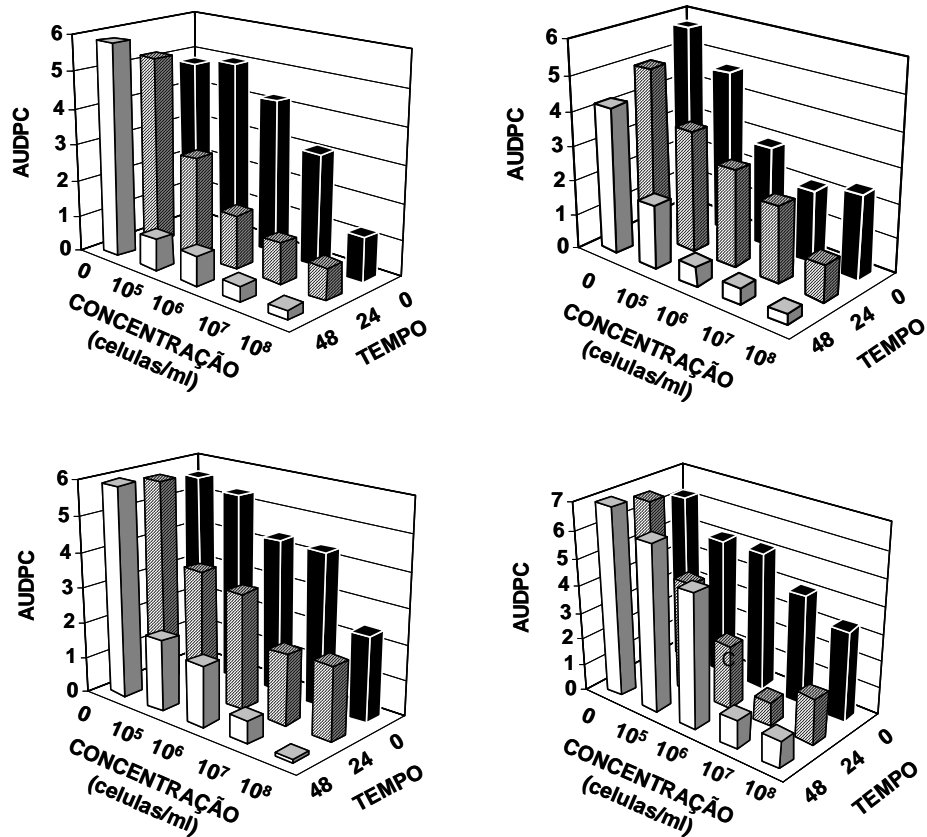


FIGURA 4

Figura 1. Detalhe de uma caixa gerbox mostrando a disposição dos fragmentos de tecido do fruto e distribuição do inóculo do antagonista para teste de diferentes concentrações do mesmo.

Figura 2. Detalhe de um fragmento de tecido de fruto de mamão no qual foi feito um ferimento de 3 x 3 mm.

Figura 3. Detalhe de parte de um experimento onde 3 leveduras diferentes (A, B e C) foram testadas em diferentes concentrações com duas repetições (R1 e R2). Observa-se o início da formação de lesões nos fragmentos controle (sem antagonista) e naqueles tratados com as menores concentrações do antagonista.

Figura 4: Efeito de 4 diferentes isolados de levedura (A, B, C e D) sobre a área abaixo da curva de progresso(AACPD) da antracnose em frutos de mamão tratados com cinco diferentes concentrações do antagonista (0 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8) em diferentes tempos após a inoculação com o antagonista. A ($P = 0.0315$; $R = 0,85$); B ($P = 0.0273$; $R = 0,93$), C ($P = 0.042$; $R = 0,91$) e D ($P = 0.0235$; $R = 0,89$)