



**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS SAPRÓBIOS DO SEMI-ÁRIDO
NORDESTINO PARA CONTROLE DE *COLLETOTRICHUM* sp. EM UVA
PÓS-COLHEITA**

LUIZA D. **MARBA**¹; ELIANE A. **BENATO**²; SILVIA R.T. **VALENTINI**³; MARIA
FERNANDA P.M. **CASTRO**³; SERGIO F. **PASCHOLATI**⁴.

Nº 12234

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da biodiversidade brasileira, neste caso, dos fungos sapróbios do semi-árido nordestino, através de sua possível ação direta por meio de antibiose e/ou produção de compostos voláteis contra *Colletotrichum* sp., bem como, pela indução de mecanismos de resistência em uvas pós-colheita. Inicialmente, este projeto consistiu no levantamento de dados *in vitro* do efeito fungistático (pareamento e voláteis) de fungos sapróbios sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, em diferentes meios de cultura. Desta maneira, verificou-se que os saprobios *S. globosa*, *S. nephrosfora* e *M. echinata* foram os mais promissores quanto à atividade antifúngica, chegando a exercer inibição no crescimento micelial do patógeno. Numa segunda etapa, foram realizados testes *in vivo* em uva 'Itália' com os sapróbios que apresentaram os melhores resultados *in vitro*. Para isso, montou-se um experimento com 5 tratamentos: inoculação do patógeno 4h antes, 24h depois e ao mesmo tempo da aspersão do sapróbio, e testemunhas com apenas inoculação do patógeno ou apenas aspersão do sapróbio. Através destes testes, pode-se observar que o sapróbio *M. echinata* apresentou efeito significativo no controle de *C. gloeosporioides* em uvas inoculadas e naturalmente infectadas.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, lu.marba@gmail.com. ²Orientadora: Pesq. Científica, GEPC/ITAL, Campinas-SP, benato@ital.sp.gov.br.

³Pesq. Científica, GEPC/ITAL, Campinas-SP. ⁴Professor Titular, ESALQ/USP, Piracicaba/SP.



ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the action of saprobes fungi, from the semi-arid Northeast of Brazil, for the control of *Colletotrichum* sp in grapes. The saprobe fungus action was evaluated by means of antibiosis and/or the production of volatile compounds, and inducing resistance mechanisms in the fruit. First, it was evaluated *in vitro* the saprobes fungistatic effect (pairing and volatile) on mycelial growth of *C. gloeosporioides*, in different media. The saprobes *S. globosa*, *S. nephrospora* and *M. echinata* were the most promising for their antifungal effect, inhibiting mycelial growth of the pathogen. The second investigation consisted in testing the saprobes - with the best results *in vitro* – for the control of *C. gloeosporioides* in 'Italia' grapes. The saprobe fungi were sprayed on the grapes 4 hours before their inoculation with *C. gloeosporioides*, 24 hours after and simultaneously to the inoculation. The saprobe *M. echinata* had significant effect in controlling *C. gloeosporioides* in inoculated grapes and naturally infected.

INTRODUÇÃO

A viticultura no Brasil vem apresentando um crescimento em área cultivada, resultado de investimentos por parte das indústrias vinícolas e da introdução de novas variedades. Segundo o IBRAF (2012), em 2010, a produção brasileira de uvas atingiu 1.365 mil t, sendo que 53% foi destinado à mesa. No *ranking* da exportação de frutas, a uva ocupou o 6º lugar em volume, cerca de 80 mil t, porém, devido ao seu alto valor agregado, teve o 1º lugar em valor, equivalente a US\$136 milhões.

Por outro lado, a “podridão da uva madura”, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* tem, nos últimos anos, causado perdas expressivas na produção de uva, principalmente nas regiões com clima quente e úmido durante a fase de maturação da uva, podendo continuar a causar danos mesmo depois da uva colhida (CIA et al, 2009). Torna-se, assim, crescente a busca por alternativas de biocontrole de doenças na agricultura para identificar substâncias naturais bioativas que possam ser empregadas no manejo fitossanitário, com menor impacto ao ambiente, assim como o controle biológico, o qual utiliza microrganismos antagônicos (CIA et al., 2007).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da biodiversidade brasileira, neste caso, dos fungos sapróbios do semi-árido nordestino, através de sua possível ação direta por meio de antibiose e/ou produção de compostos voláteis contra *Colletotrichum* sp., bem como, pela indução de mecanismos de resistência em uvas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolado de *Colletotrichum* sp.

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* foi fornecido pelo Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho (Código CNPUV 381). O microrganismo foi cultivado em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), à temperatura de 25 °C, com alternância de luz (12 horas).

Isolados de fungos sapróbios

Foram utilizados como possíveis antagonistas, os fungos sapróbios isolados do semi-árido nordestino (Tabela 1), os quais estão depositados na CCMB (Coleção de Microrganismos da Bahia – www.uefs.br/ccmb/), situada na Universidade Estadual de Feira de Santana – BA, sendo uma coleção fiel depositária certificada pelo CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético).

Tabela 1. Fungos sapróbios isolados do semi-árido nordestino brasileiro, utilizados nos ensaios.

Sapróbios	Nome da espécie	Número	Código a ser utilizado
1	<i>Curvularia inaequalis</i>	0005/06	CUI
2	<i>Stachybotrys nephrospora</i>	0019/07	STN
3	<i>Memnoniella levispora</i>	0033/08	MEL
4	<i>Stachybotrys globosa</i>	0011/10	STG
5	<i>Memnoniella echinata</i>	0004/07	MEE
6	<i>Pithomyces chartarum</i>	0036/07	PIC
7	<i>Lappodochium lageniforme</i>	0118/07	LAL
8	<i>Volutella minima</i>	0013/08	VOM
9	<i>Gonytrichum macrocladum</i>	0034/08	GOM
10	<i>Curvularia eragrostidis</i>	0047/06	CUE

11	<i>Dictyochaeta simplex</i>	0050/06	DIS
12	<i>Thozetella cubensis</i>	0090/06	THC
13	<i>Gonytrichum clamydosporium</i>	0084/07	GOC
14	<i>Pseudobotrytis terrestris</i>	0011/09	PST

Efeito dos meios de cultivo no crescimento micelial do *C. gloeosporioides* e dos fungos sapróbios

Para verificar se havia diferença no desenvolvimento do patógeno e dos sapróbios em diferentes meios de cultivo, foi montado um experimento com três meios diferentes, sendo eles: Meio de Aveia (Aveia em flocos – 60g; Ágar – 15g; Água destilada – 1000mL); Meio Cenoura (Cenoura – 200g; Ágar – 17g; Água destilada – 1000 mL) e Meio Batata (BDA) (39 g de meio sintético em 1000 mL de água destilada).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Foram realizadas duas medições perpendiculares do diâmetro das colônias, frequentemente, até que as bordas das colônias se encontrassem.

Avaliação *in vitro* do efeito dos fungos sapróbios sobre o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*.

Efeito de antibiose (pareamento) sobre o crescimento micelial do fitopatógeno

Para o estudo foram utilizadas placas de poliestireno, de 85 mm, sendo, em cada, vertidos 20 mL dos meios de Aveia ou de Cenoura. Cada placa foi visualmente dividida ao meio com o auxílio de uma caneta permanente e, no centro de cada metade, foi depositado um disco de micélio do sapróbio e do fitopatógeno no mesmo dia. No tratamento controle foram utilizadas placas somente com *C. gloeosporioides*.

As placas foram incubadas em câmaras tipo B.O.D. à 25°C e fotoperíodo de 12h. As avaliações foram realizadas diariamente, até o encontro dos microrganismos em todos os tratamentos, medindo-se dois diâmetros perpendiculares de cada fungo com o auxílio de uma régua. Neste ensaio, zonas de inibição do crescimento micelial do patógeno foram consideradas como indicativas de antibiose (REZENDE, 2010).

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições, e as médias do diâmetro das placas do fitopatógeno no último dia de avaliação foram utilizadas para análise estatística.

Avaliação da produção de compostos voláteis pelos sapróbios e seu efeito sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*.

A avaliação foi feita mediante a utilização dos meios de cultivo de Aveia e de Cenoura. Neste ensaio foram utilizadas placas de poliestireno (85 mm), divididas ao meio por um septo. Em um dos lados da placa, foram vertidos 10 mL de um dos meios de cultivo a serem testados, e o outro lado, com 10 mL do outro, assepticamente. No centro de cada metade da placa, foram depositados os disco de micélio do fungo sapróbio ou do fitopatógeno, no mesmo dia. O tratamento controle consistiu em placas contendo apenas o fitopatógeno. As placas foram imediatamente vedadas com filme flexível e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada diariamente, através da média entre duas medições diametralmente opostas da colônia, até que as colônias das placas do tratamento controle atingissem os bordos. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa.

Efeito de antibiose (cruz de malta) sobre o crescimento micelial do fitopatógeno

Com os fungos sapróbios que obtiveram os melhores resultados *in vitro* sobre o desenvolvimento do fitopatógeno: *S. globosa* (STG), *S. nephrosfora* (STN), *G. macrocladum* (GOM) e *M. echinata* (MEE) – foi montado um experimento com placas de poliestireno, de 85 mm, vertidas de 20 mL dos meios de Aveia ou de Cenoura, divididas em 4 quadrantes com o auxílio de uma caneta permanente e, no centro de cada quadrante, foram depositados um disco de micélio do sapróbio. No centro da placa, foi depositado um disco de micélio do fitopatógeno, no mesmo dia. No tratamento testemunha foram utilizadas placas somente com *C. gloeosporioides* no centro. As placas foram imediatamente vedadas com filme flexível e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h e, a avaliação realizada foi somente visual após 1 semana da repicagem. Neste ensaio, zonas de inibição do crescimento micelial do patógeno foram consideradas como indicativas de antibiose. O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições.

Avaliação, *in vivo*, do efeito dos fungos *S. globosa* (STG), *S. nephrosfora* (STN) e *M. echinata* (MEE) sobre patossistema uva x *Colletotrichum*.

Uvas 'Itália', provenientes de vinhedos comerciais de Marialva (PR), foram selecionadas e o lote foi homogeneizado pela cor e tamanho, passando por uma toalete. Para a realização da inoculação, 10 cachos de uva foram separados para 5 diferentes tratamentos: (1) Inoculação do patógeno 4 horas antes da aspersão do

sapróbio (efeito curativo); (2) Inoculação do patógeno 24 horas depois da aspersão do sapróbio (efeito protetivo); (3) Inoculação do patógeno ao mesmo tempo da aspersão do sapróbio; (4) testemunha com inoculação do patógeno; (5) testemunha com aspersão do sapróbio.

Para a obtenção da suspensão de esporos (inóculo), foi adicionada água destilada esterilizada nas placas de petri com a cultura do fungo *C. gloeosporioides* ou dos fungos sapróbios e, com auxílio de uma alça de Drigalsky, foi promovida a formação da suspensão dos esporos e micélio. A suspensão foi filtrada em gaze e ajustada para aproximadamente 10^5 esporos mL^{-1} , determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Para melhor dispersão dos esporos na suspensão, foi adicionado Tween²⁰.

Para os tratamentos de 1 a 3, foram feitos microferimentos em 10 bagas por cacho, a 1-2 mm de profundidade na epiderme, com auxílio de uma agulha, e foi feita a aspersão da suspensão de esporos do patógeno e do sapróbio. Para tratamento 4, foi feita apenas a inoculação, da mesma maneira, e para o tratamento 5, foi feito apenas o tratamento com o antagonista. Os cachos foram dispostos em sacolas plásticas e armazenados em câmara frigorífica à 25°C /75%UR.

Após sete dias, foram feitas análises fitopatológicas de *Incidência de Podridão Natural* – obtida através do seguinte cálculo: $\{PN\% = [(massa\ de\ bagas\ não\ inoculadas\ com\ podridão) / (massa\ do\ cacho\ inteiro - massa\ de\ bagas\ inoculadas)] \times 100\}$ e *Índice de doença em bagas inoculadas* – obtidas através do seguinte cálculo $\{ID\ (\%) = \{[(n_1 \times 1) + \dots + (n_6 \times 6)] \times (6 \times N)^{-1}\} \times 100$, onde $n_1 \dots n_6$ = número de bagas infectadas com a respectiva nota e N = número total de bagas inoculadas}.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para efeito de análise estatística, as médias resultantes da avaliação fitopatológica foram transformadas em $\sqrt{x + 0,5}$.

Avaliação *in vivo*, do sapróbio *M. echinata* (MEE) sobre o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*, e análise físico-química da uva.

Outro experimento foi realizado para confirmar o efeito antimicrobiano de *M. echinata* (MEE), semelhante ao citado anteriormente, com 5 tratamentos, com 8 cachos de uva 'Itália' por tratamento para análises fitopatológicas e, 4 repetições, para

análises físico-químicas. Após 7 dias de incubação, sob as mesmas condições, foram feitas as seguintes análises:

Fitopatológicas: *Incidência de Podridão Natural* (PNI%), *Incidência de Podridão em Bagas Inoculadas* {PI% = (número de bagas inoculadas com podridão / 10) x 100} e *Índice de doença*.

Análises físico-químicas: Acidez titulável (g de ácido tartárico por 100g de suco), Sólidos solúveis (°Brix), pH, Firmeza (N) e Cor de casca (sistema L*C*H).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As médias dos resultados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade, pelo programa ESTAT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos meios de cultivo no crescimento micelial do *C. gloeosporioides* dos fungos sapróbios.

O fungo *C. gloeosporioides* cresceu e esporulou melhor em meio de Aveia-Agar e os sapróbios, de maneira geral, apresentaram melhor desenvolvimento em meio de aveia, cenoura e BDA, em ordem decrescente (dados não apresentados).

Efeito de antibiose (pareamento) sobre o crescimento micelial do fitopatógeno

Foi verificado que os sapróbios apresentaram variação quanto à atividade antifúngica, *in vitro*, contra *C. gloeosporioides*, sendo os isolados *S. globosa* (STG), *S. nephrospora* (STN), *G. macrocladum* (GOM) e *M. echinata* (MEE), os mais promissores, chegando a exercer inibição no crescimento micelial do patógeno por pareamento.

Avaliação da produção de compostos voláteis antimicrobianos pelos fungos sapróbios e seu efeito sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*

O efeito de compostos voláteis, possivelmente produzidos por fungos sapróbios, não apresentou nenhuma inibição expressiva de *C. gloeosporioides*.

Efeito de antibiose (cruz de malta) sobre o crescimento micelial do fitopatógeno

A partir dos resultados do teste de pareamento, os fungos selecionados para o teste da “cruz de malta” foram os sapróbios *S. globosa* (STG), *M. echinata* (MEE), *S. nephrospora* (STN) e *G. macrocladum* (GOM), sendo os 3 primeiros os que exerceram inibição no crescimento micelial do patógeno e foram, portanto, selecionados para os testes *in vivo* seguintes.

Efeito dos fungos *S. globosa* (STG), *M. echinata* (MEE), *S. nephrospora* (STN) sobre patossistema uva x *Colletotrichum* (in vivo)

A partir da tabela 2, o sapróbio *M. echinata* foi escolhido para análise final, como o mais promissor quanto à atividade antifúngica *in vivo* contra *C. gloeosporioides*

Tabela 2. Índice de doença (ID) e Incidência de Podridão natural (PN) em cachos de uva 'Itália' inoculados *C. gloeosporioides* e tratadas com sapróbios, após 7 dias de armazenamento a 25°C/75%UR.

Índice de Doença (ID)						
Tratamentos	STG		STN		MEE	
1 – Inoc. 4h antes	25,39 ^z	c	35,33	b	22,17	b
2 – Inoc. 24h depois	41,18	ab	22,33	c	23,50	ab
3 – Inoc. Mesmo tempo	39,41	b	37,33	b	15,33	b
4 – Test. <i>Collet.</i>	50,32	a	57,50	a	36,33	a
Incidência de Podridão Natural (PN)						
Tratamentos	STG		STN		MEE	
1 – Inoc. 4h antes	6,23 ^z	b	20,00	ab	11,72	bc
2 – Inoc. 24h depois	21,28	a	23,98	a	12,77	ab
3 – Inoc. Mesmo tempo	11,41	ab	12,99	b	9,10	bc
4 – Test. <i>Collet.</i>	6,20	b	27,92	a	20,21	a
5 – Test. Sapró.	7,00	b	18,21	ab	5,01	c

^z Média de 10 repetições (com 10 bagas por parcela). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey $\leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

Efeito do fungo *M. echinata* (MEE) sobre patossistema uva x *Colletotrichum* (in vivo)

Observando a tabela 3, verifica-se que o sapróbio apresentou efeito significativo no controle de *C. gloeosporioides* em uvas inoculadas e naturalmente infectadas.

Já pela tabela 4, verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos para textura, devido ao desenvolvimento da podridão da uva madura, e para alterações de cor da casca.

Tabela 3. Índice de doença (ID), Incidência de Podridão em bagas inoculadas (PI) e Índice de Podridão natural (PN) causado por *C. gloeosporioides* em cachos de uva 'Itália' inoculados e tratados com *M. echinata*, após 7 dias de armazenamento a 25°C/75%UR.

Análises Fitopatológicas			
Tratamentos	ID (%)	PI (%)	PN (%)
1 – Inoc. 4h antes	25.21 ^z b	57,5 b	19.58 ab
2 – Inoc. 24h depois	33.54 ab	67,5 ab	19.64 ab
3 – Inoc. Mesmo tempo	28.33 b	72,5 ab	17.85 ab
4 – Test. Collet.	50.83 a	92,5 a	26.62 a
5 – Test. Sapró.	-	-	4.36 b

^zMédia de 8 repetições (com 10 bagas por parcela). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Tuckey $\leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

Tabela 4. Análises físicas e físico-químicas em cachos de uva 'Itália' inoculadas com *C. gloeosporioides* e tratadas com *M. echinata*, no início e após 7 dias de armazenamento a 25°C/75%UR.

Tratamentos	AT (g.100g-1)	SS (°Brix)	pH	Firmeza (N)	Cor da baga ^z		
					L*	C*	Hue
dia 1	1.28 ^y	8.65	3.35	4.06	36.89	10.87	109.48
1 – Inoc. 4h antes	1,16 a	9,00 a	3,38 a	2,39 ab	39,99 b	9,77 a	115,66 a
2 – Inoc. 24h depois	1,23 a	8,57 a	3,38 a	2,77 a	43,03 a	8,83 ab	118,64 a
3 – Inoc. mesmo t	1,12 a	8,55 a	3,40 a	2,17 b	42,29 ab	9,42 ab	115,28 a
4 – Test. Collet	1,23 a	9,15 a	3,38 a	2,12 b	42,66 ab	8,57 b	118,85 a
5 – Test. Sapró.	1,05 a	7,85 a	3,36 a	2,88 a	43,58 a	8,67 b	118,62 a

Média de 4 repetições. Médias seguidas da mesma letra minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

^y Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

^z Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preta a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a*=verde a a*=vermelho e, b*=azul a b*=amarelo). Cromo =

$$\sqrt{a^2 + b^2} \text{ e HUE} = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) \times \frac{180}{PI}$$



CONCLUSÃO

Os sapróbios *S. globosa* (STG), *S. nephrospora* (STN) e *M. echinata* (MEE) foram os mais promissores quanto à inibição no crescimento micelial, *in vitro*, do fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Os testes *in vivo* mostraram que o sapróbio *M. echinata* apresentou efeito significativo no controle de *C. gloeosporioides* em uvas inoculadas e naturalmente infectadas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ/PIBIC, pela bolsa concedida. À FAPESP (2010/52343-0) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CIA, P., BENATO, E.A., VALENTINI, S.R.T., ANJOS, V.D.A., PONZO, F.S., SANCHES, J., TERRA, M.M. Radiação ultravioleta no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em uva 'Niagara Rosada'. **Bragantia**, v.68, n.4, p.1009-1015, 2009.

CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: RODRIGUEZ, F.; ROMEIRO, R. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. REUNIÃO BRASILEIRA DOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 3., 2007. Viçosa, **Anais...**Viçosa, 2007. p. 245-280.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> .Acesso em: 10 junho 2012.

REZENDE, D.C. **Efeito de compostos orgânicos voláteis identificados a partir de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* e no controle de antracnose em goiaba**. Mestrado (dissertação) Piracicaba: ESALQ/USP, 2010. 79p.