



## EFICIÊNCIA DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS NO CONTROLE DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA DE MANGA

Adriane Maria da **Silva**<sup>1</sup>; Monica Pirola **Viecelli**<sup>2</sup>; Bernardo de Almeida Halfeld **Vieira**<sup>3</sup>; Katia de Lima **Nechet**<sup>4</sup>; Daniel **Terao**<sup>5</sup>

Nº 15401

**RESUMO:** A manga é uma das frutas mais populares no mundo, amplamente consumida nos diversos países. A incerteza quanto à sanidade das frutas tem levado os produtores a utilizar agrotóxicos, no tratamento pós-colheita de forma indiscriminada e excessiva, provocando contaminação química e colocando em risco a saúde do consumidor. Existe uma demanda por tecnologias limpas nos tratamentos pós-colheita de frutas que não deixem resíduos químicos. Assim o presente trabalho teve como objetivo estudar a eficiência de sete espécies de leveduras e os mecanismos envolvidos no biocontrole da podridão de frutos de manga causada por *Botryosphaeria dothidea*. Avaliaram-se as leveduras: *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia spp*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia quilliermondii*, *Sporobolomyces roseus*, *Debaryomyces hansenii* e *Rhodotorula mucilagenosa*, para o controle de doenças pós-colheita em manga, comparadas com o fungicida thiabendazole (485 g i.a. 100 L<sup>-1</sup>) e um controle pulverizado com água estéril. Foram investigados também os mecanismos envolvidos no controle por antibiose e por competição por nutrientes. Os resultados revelaram que as leveduras apresentaram resultados distintos dependendo da espécie. Destacaram-se as leveduras *Pichia spp.*, *R. mucilagenosa*, *P. quilliermondii*, que apresentaram nível de controle superior ao tratamento com o fungicida, diferindo estatisticamente da testemunha, enquanto as demais leveduras não apresentam níveis significativos de controle. Com relação aos mecanismos envolvidos no biocontrole, observou-se que a antibiose não é responsável pela inibição dos fungos por nenhuma das leveduras avaliadas. Os resultados demonstram que a competição por nutrientes é o principal mecanismo responsável.

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

<sup>1</sup> Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP; drisilva66@gmail.com

<sup>2</sup> Bolsista Embrapa Meio Ambiente: Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP; moviecelli@hotmail.com

<sup>3</sup> Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente; bernardo.halfeld@embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente; katia.nechet@embrapa.br

<sup>5</sup> Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente; daniel.terao@embrapa.br



**ABSTRACT:** *Mango is one of the most popular fruit around the world, widely consumed in different countries. The uncertainty about the health of the fruit has led producers to use pesticides in the post-harvest treatment in an indiscriminate and excessively way, causing the chemical contamination of the fruit, endangering consumers' health. Therefore, there is a demand for clean technologies in post-harvest fruit treatments that leave no chemical residues. Thus, the present study aimed to verify the efficiency of seven species of yeast and the mechanisms involved on biocontrol of fruit rot caused by Botryosphaeria dothidea. The yeasts evaluated were: Sporodiobolus pararoseus, Pichia spp., Pichia membranifaciens, Pichia quilliermondii, Sporobolomyces roseus, Debaryomyces hansenii and Rhodotorula mucilagenosa on control of postharvest diseases in mango compared to thiabendazole fungicide (485 g ai 100 L<sup>-1</sup>) and a control sprayed with sterile water. It was also investigated the mechanisms involved on the biocontrol by antibiosis and competition for nutrients. The results showed distinct levels of control depending on the yeast species. The highlights were the yeasts, Pichia spp., R. mucilagenosa, and P. quilliermondii, which showed higher level of control than fungicide treatment, differing statistically with from the control, while other yeast did not show significant levels of control. In respect to mechanisms involved on biocontrol, it was observed that antibiosis is not involved in this process. The results demonstrated that competition for nutrients is the main mechanism involved.*

**Key words:** Biological control, mango, postharvest pathology.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante produtor e exportador de manga em 2013 produziu cerca de 1,2 milhões de toneladas (t) e exportou em volume 122.000 t e em receita U\$ 147.481.604,00 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014, 2013).

A vida pós-colheita da manga é limitada pela deterioração fisiológica causada pelo excessivo amadurecimento da fruta e pelo desenvolvimento de patógenos que ocasionam podridões. Além disso, a perda de água pode atingir níveis que causam enrugamento e murchamento dos frutos, comprometendo o aspecto visual e reduzindo seu valor comercial (ROSSETTO et al., 2000)

A crescente preocupação com o conceito de qualidade mercadológica e a preservação do ambiente têm aumentado a procura por frutas saudáveis e sem resíduos de agroquímicos (ROZWALKA et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2011), havendo uma necessidade crescente de estratégias de controle alternativas (LAPEYRE DE BELLAIRE & MOURICHON, 2000).



Dentre os métodos alternativos, o 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, conforme as necessidades do biocontrolador. (WISNIEWSK et al., 2007).

A utilização de microrganismos antagonistas em pós-colheita pode interferir em algum estágio da doença ou do 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).

Dentre os antagonistas destacam-se as leveduras, que fazem parte da flora epifítica das plantas e são ativas competidoras por nutrientes, efetivas como colonizadoras de ferimentos e, em alguns casos, indutoras de resistência do hospedeiro, além de produtoras de enzimas líticas (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Pesquisas 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 de frutas (LEELASU-HAKUL et al., 2008; CHANCHAOVIVAT et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo estudar a eficiência de diversas espécies de leveduras no biocontrole da podridão em manga, causada por *Botryosphaeria dothidea* em pós-colheita e investigar os mecanismos utilizados por elas no processo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Mangas Tommy Atkins, provenientes de pomar comercial do município de Taquaritinga/SP, colhidas no índice de maturação 3, foram previamente lavadas com detergente neutro e feridas na região equatorial do fruto, com o auxílio de um prego de 2,5 mm de diâmetro e 2,5 mm de profundidade. Inoculou-se a lesão com um disco de 5 mm de micélio obtido de colônia em crescimento em meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) do fungo *Botryosphaeria dothidea* e, após o procedimento os frutos foram mantidos em câmara úmida à temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 12 horas. Avaliaram-se as leveduras: *Sporodiobolus pararoseus* (SB); *Pichia* spp. (L4.1); *Pichia membranifaciens* (L21); *Pichia guilliermondii* (L29); *Sporobolomyces roseus* (L41); *Debaryomyces hansenii* (L62) e *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), comparadas com o fungicida thiabendazole (485 g i.a. 100 l<sup>-1</sup>) e uma testemunha pulverizada com água estéril. Foram utilizadas 30 mangas por tratamento, considerando-se como unidade experimental uma fruta. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado.

As mangas foram pulverizadas com a suspensão de levedura no local inoculado com *B. dothidea*, na região equatorial da fruta, ou com o fungicida thiabendazole ou a testemunha (água estéril). As frutas foram mantidas armazenadas em temperatura ambiente durante 18 dias, avaliando-se diariamente o diâmetro da lesão, usando-se um paquímetro digital. A partir dos dados obtidos em



gráficos, calculou-se a área abaixo da curva de progresso do diâmetro da lesão (AACPD<sub>L</sub>) (CAMPBELL & MADDEN, 1990). Procedeu-se a análise de variância usando o procedimento GLM do software SAS versão 9 e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

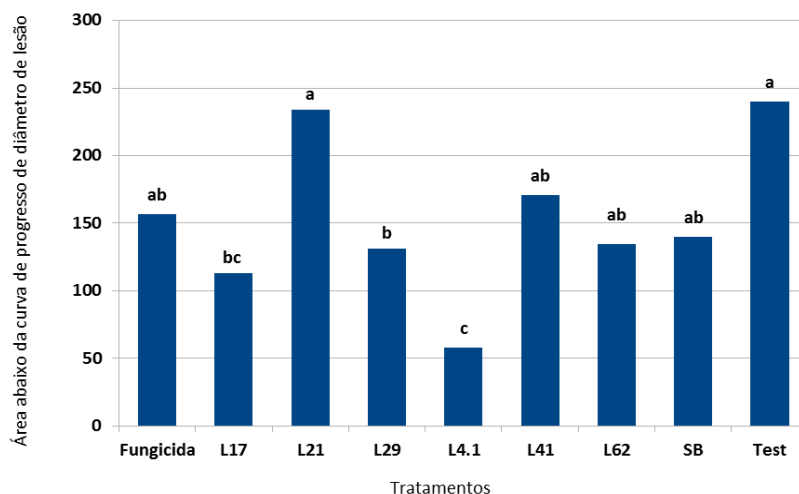
Nos estudos de mecanismos envolvidos no biocontrole avaliaram-se a antibiose e a competição por nutrientes. Para o estudo de antibiose, foram distribuídas radialmente cinco leveduras em meio BDA por placa de Petri de 18 cm de diâmetro. Depois de mantidas em incubadora a 26°C por 7 dias, as leveduras foram mortas com vapor de clorofórmio. Em seguida foi distribuída uma segunda camada de meio de BDA semi-sólido, contendo 10<sup>3</sup> propágulos de *B. dothidea* em 100 mL de meio. Após quatro dias, avaliou-se a presença de halos de inibição do crescimento das colônias fúngicas, por substâncias difusíveis.

Avaliou-se a competição por nutrientes vertendo-se uma camada basal de BDA na placa de Petri de 9 cm de diâmetro e, após a solidificação do ágar, com o auxílio de uma alça de Drigalski, espalhou-se uma suspensão na ordem de 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup> de cada levedura sobre a camada. Realizou-se este procedimento em placas distintas em dois tempos, defasados de uma semana, com a finalidade de avaliar o consumo de nutrientes aos 7 e 14 dias de crescimento da levedura. Após os respectivos períodos de incubação, todas as leveduras foram mortas com vapor de clorofórmio e depositada uma sobrecamada, com meio ágar-água (AA) ou BDA. Em seguida adicionou-se um disco de BDA contendo crescimento ativo de *B. dothidea*, medindo-se diariamente o crescimento micelial em dois sentidos ortogonais. Como controle absoluto (T) discos de micélio de *B. dothidea* foram adicionados em meio BDA ou AA, sem presença de levedura. Utilizaram-se três repetições por tratamento, considerando-se uma placa de Petri como repetição. Os resultados foram analisados por teste Tukey, em esquema fatorial, onde foram comparadas as taxas de crescimento micelial.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 refere-se à área abaixo da curva de progresso de diâmetro de lesão (AACPD<sub>L</sub>) de *B. dothidea* usando os sete biocontroladores já citados. Observou-se que as espécies de leveduras estudadas apresentaram resultados diversos no controle da podridão causada por *B. dothidea* em manga, destacando a levedura L4.1 (*Pichia spp*), com incidência ao redor de 20% de infecção até o 13º dia de armazenamento, permanecendo ao redor de 30% até o final da avaliação, diferindo significativamente da testemunha, que rapidamente evoluiu para 90% de frutos infectados (Figura 1).

As leveduras L17 (*R. mucilagenosa*), L29 (*P. guilliermondii*) apresentaram um grau moderado de controle, superiores ao tratamento com fungicida, diferindo da testemunha. As demais leveduras apresentaram baixo nível de controle, não diferindo da testemunha.



**Figura 1.** Área abaixo da curva de progresso de diâmetro de lesão (AACPD) de *Botryosphaeria dothidea* usando leveduras biocontroladoras: *Rhodotorula mucilaginosa* (L17); *Pichia membranifaciens* (L21); *Pichia guilliermondii* (L29); *Pichia spp* (L4.1); *Sporobolomyces roseus* (L41); *Debaryomyces hansenii* (L62) e *Sporodiobolus pararoseus* (SB), comparando-se com o fungicida thiabendazole (485 g i.a. 100 L<sup>-1</sup>) e uma testemunha pulverizada com água estéril (Test).

A Tabela 1 refere-se à taxa de crescimento micelial em milímetros (mm) de *B. dothidea* usando os biocontroladores já citados. Mostra que, em média, a taxa de crescimento micelial, independente do período de crescimento da levedura, foi significativamente maior em tratamentos que receberam a sobrecamada de BDA (13,19 mm/dia) quando comparado com os tratamentos que receberam a sobrecamada de Agar-água (7,48 mm/dia). Estes resultados evidenciam que a antibiose não é o mecanismo envolvido no biocontrole, corroborando com as observações feitas no ensaio de antibiose, em que não houve aparecimento de halo de inibição de *B. dothidea* para nenhuma das leveduras avaliadas.



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

**Tabela 1.** Taxa de crescimento micelial (mm) de *Botryosphaeria dothidea* usando os biocontroladores: *Rhodotorula mucilaginosa* (L17); *Pichia membranifaciens* (L21); *Pichia guilliermondii* (L29); *Pichia spp* (L4.1); *Sporobolomyces roseus* (L41); *Debaryomyces hansenii* (L62) e *Sporodiobolus pararoseus* (SB) que receberam sobrecamada de BDA e Agar –água (AA) e foram incubados por 7 e 14 dias a uma temperatura de 26°C.

Tratamentos	AA				BDA			
	7 dias		14 dias		7 dias		14 dias	
Testemunha	10,24	aA	10,24	aA	12,28	NS	12,28	
L29	7,91	aB	8,27	aAB	13,28	NS	13,27	
SB	7,93	aB	7,96	aB	12,57	NS	11,88	
L21	6,96	aC	6,62	aBC	13,47	NS	13,54	
L4.1	6,85	aC	5,4	bCD	13,35	NS	13,6	
L62	7,01	aBC	5,14	bCD	13,32	NS	13,46	
L17	6,80	aC	5,17	aCD	13,58	NS	13,32	
L41	6,15	aC	3,75	bD	13,69	NS	13,32	

Letras minúsculas representam comparações no sentido da linha; letras maiúsculas representam comparações no sentido da coluna. NS=nenhum tratamento foi significativo, tanto no sentido da linha quanto da coluna.

Com a sobrecamada AA, todas as leveduras reduziram a taxa de crescimento micelial de *B. dothidea* aos 7 dias de crescimento em relação à testemunha; já aos 14 dias, somente o isolado L29 não diferiu significativamente da testemunha. A maior inibição foi observada para a levedura L41 aos 14 dias, não diferindo de L4.1, L62 e L17, indicando que, de maneira geral, a competição por nutrientes é o principal mecanismo de controle utilizado pelas leveduras estudadas. Verificou-se, também, que a diminuição na taxa de crescimento foi mais evidente aos 14 dias que aos sete dias, para as leveduras L4.1, L62 e L41, indicando que para elas, o fator tempo influenciou no aumento da exaustão de nutrientes essenciais para o crescimento do fungo (Tabela 1).

A competição por nutrientes como forma de controle exercido por leveduras é reportada como o mecanismo mais importante logo após ser incitado um fermento como via de acesso ao inóculo de fungos que causam podridões em pós colheita. Considera-se que nesses locais as leveduras são capazes de exaurir os nutrientes disponíveis para o desenvolvimento do patógeno em etapa de pré-penetração, podendo ter efeito direto ainda na fase de germinação de esporos, por meio da exclusão de nicho (LIU, et al., 2013). Mesmo em se tratando de um meio rico utilizado na camada basal onde foram cultivadas as leveduras (BDA) foi, portanto, inferido que os nutrientes do meio de cultura foram reduzidos em níveis capazes de diminuir a taxa de crescimento micelial de *B. dothidea*.

O fato de não ter havido redução da taxa de crescimento quando adiciona a sobrecamada de BDA corroborou que as leveduras não produzem compostos inibitórios difusíveis.



#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que as espécies de levedura: *Pichia* spp. (L4.1), *Pichia guilliermondii* (L29) e *Rhodotorula mucilagenosa* (L17) são eficientes no biocontrole da podridão em laboratório em manga causada por *Botryosphaeria dothidea*, e que a antibiose não é mecanismo usado por elas e sim a competição por nutrientes.

#### 5. AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa PIBIC e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto (Projeto FAPESP 2011/23432-8).

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013.136p.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: Wiley, 1990. 532p.
- CHANCHAOVIVAT, 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.
- 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.
- LIU, J; SUI, L.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, San Diego, v.167, p.153-160, 2013.
- NOGUEIRA, D. R. S.; ALBUQUERQUE, L. B.; ARAÚJO, J. A. de M.; VALE, E. V. G.; SALES JÚNIOR, R. Eficiência de *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* no controle de *Podosphaera xanthii* em meloeiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 6, n.3, p. 125-130, 2011.
- 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
- ROSSETTO, C.J.; GALLO, P.B.; BORTOLETTO, N.; CARVALHO, C.R.L.; RIBEIRO, I.J.A.; CASTRO, J.V. Manga IAC Espada Vermelha. In: DONADIO, L. C. (Ed.) **Novas variedades brasileiras de frutas**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p.138-139.
- ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, M. L.L.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

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

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.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii* I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p. 245-258, 2007