

## ISOLAMENTO DE LEVEDURAS COLONIZADORAS DE FRUTOS E SELEÇÃO PARA O CONTROLE DE PODRIDÃO DA MANGA CAUSADA POR PATÓGENOS MÚLTIPLOS

CARLOS ALBERTO TUÃO GAVA<sup>1</sup>; ALÍCIA VIEIRA DE SÁ<sup>2</sup>; ANA PAULA CARVALHO DE CASTRO<sup>3</sup>; CARLIANA ARAÚJO PEREIRA<sup>3</sup>; CRISTIANE DOMINGOS DA PAZ<sup>3</sup>

### INTRODUÇÃO

As principais doenças pós-colheita da manga (*Mangifera indica* L.) nas condições de clima quente e seco do Nordeste são causadas por *Fusicoccum aesculi* Corda (1829), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl. (1909) e *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crus, juntamente com as espécies de *Colletotrichum*, são os principais causadores de podridão pós-colheita de frutos de manga no nordeste do Brasil (COSTA et al., 2010).

A estratégia usual para controlar podridões pós-colheita tem sido o uso de fungicidas sintéticos, tanto em pré-colheita quanto no processamento pós-colheita, integrado ao tratamento hidrotérmico e armazenamento refrigerado. No entanto, há uma restrição global contra o uso de agrotóxicos nas cadeias produtivas de frutas, especialmente na pós-colheita, devido à preocupação com resíduos em produtos destinados ao consumo in natura.

O controle biológico de doenças pós-colheita usando espécies de levedura tem sido relatado para uma ampla variedade de frutas e hortaliças (LIMA et al., 2014). As leveduras têm muitas características que as tornam atraentes agentes de controle pós-colheita, especialmente porque não produzem toxinas e são comumente encontrados colonizando superfícies de frutas. Dada a importância das perdas pós-colheita nas cadeias de produção de manga e as restrições ao uso de fungicidas sintéticos, o objetivo deste estudo foi o isolamento e seleção de estirpes de leveduras autóctones isoladas de superfícies de frutos de plantas nativas e cultivadas, contra múltiplos patógenos que afetam a pós-colheita da manga, por meio de ensaios in vitro e in vivo.

### MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de frutos de manga cv. “Tommy Atkins”, melão (*Cucumis melo* L.), uva (*Vitis vinifera* L.) cv. “Italia”, “Sugraone”, “Cabernet Sauvignon” e “Petit Syrah” e cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) foram coletados em áreas experimentais da Embrapa localizadas nos municípios de

<sup>1</sup> Embrapa Semiárido; Petrolina – e-mail: carlos.gava@embrapa.br

<sup>2</sup> Universidade de Pernambuco - UPE, Campus Petrolina

<sup>3</sup> Universidade Estadual da Bahia - UNEB, Campus Juazeiro – Programa de Pós-graduação em Horticultura Irrigada - PPGHI

Petrolina (PE) e Juazeiro (BA) e transportados para o laboratório. Frutos da espécie nativa umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.), Siriguela (*S. purpurea* L.) e mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.) foram coletados na estação experimental da Embrapa Semiárido em Petrolina (PE). Os frutos foram cuidadosamente lavados em água estéril e armazenados em recipientes esterilizados até o processamento e inoculação em meio de cultura.

A ocorrência de antagonismo *in vitro* foi realizada por meio de testes de cultivo pareado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Um plugue obtido do crescimento ativo de colônias dos fungos *Colletotrichum sp.*, *F. aesculi*, *N. parvum* e *L. theobromae*s foi depositado no centro de cada placa, e as leveduras em pontos equidistantes e incubados a  $25 \pm 1$  °C. No experimento *in vivo*, os frutos foram higienizados e fragmentos de casca foram e perfurados usando um perfurador de 1 mm contendo cinco agulhas em um círculo de 5 mm. A inoculação das leveduras foi feita introduzindo 20 µl de uma suspensão de células de levedura em NaCl 0,8% ( $DO_{590} = 0,2$ ) sobre o círculo de perfuração. Uma suspensão de propágulos dos patógenos foi aplicada sobre a punção duas horas após as leveduras. O tratamento controle recebeu apenas 0,08% de NaCl e os propágulos de patógenos. O experimento foi realizado utilizando seis fragmentos de casca para cada tratamento. Um último experimento utilizando frutos saudáveis da cv. “Tommy Atkins” foi realizado utilizando procedimentos similares.

A seguir, os isolados foram avaliados quanto à tolerância à radiação UV, temperatura e disponibilidade de água. No primeiro experimento, os isolados foram incubados em diferentes temperaturas (6; 10; 15; 20; 25; 30; 35 e 40 °C) e o número de colônias crescidas avaliados. No segundo experimento, os isolados foram inoculados em meio contendo PEG600 de forma a obter  $a_w$  de 0,999; 0,985; 0,970; 0,959; 0,925 e 0,862. No terceiro experimento, suspensões de leveduras ( $10^6$  mL<sup>-1</sup>) foram aplicadas em placas de petri secas e expostas a doses de radiação UV de 0; 1,664; 3,32; 4,11; 8,22 e 12,34 kJ cm<sup>-2</sup>. O crescimento foi convertido para as contagens de células viáveis obtidas nas condições ótimas  $T = 25$  °C,  $a_w = 0,999$  e  $UV = 0$ . Os potenciais agentes de controle se destacaram neste experimento foram identificados utilizando o sequenciamento da região intergênica ITS1/ITS4 e aplicados a um segundo experimento utilizando metodologia similar em frutos inteiros.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cento e oitenta e dois isolados de levedura foram obtidos de frutos coletados de espécies cultivadas e nativas no Submediário do Vale do São Francisco (Figura 1). Quando co-cultivados com os isolados de patógenos, dezesseis das leveduras apresentaram antibiose *in vitro* para pelo menos um dos patógenos nos ensaios de cultura dupla (Figura 2A) e vinte e cinco isolados não permitiram o crescimento dos fungos sobre suas colônias. O maior número de isolados capaz de reduzir o crescimento micelial de *Colletotrichum sp.* (41) e quatorze isolados produziram halos de antibiose

contra *F. aesculi*, onze a *N. parvum* e apenas oito inibiram o crescimento de *L. theobromae*. De forma similar, apenas seis isolados foram capazes de reduzir os sintomas de podridão produzidos pela inoculação com *L. theobromae* e todos esses isolados também reduziram o tamanho das lesões para todos os fungos avaliados. Entre estes isolados, cinco produziram halos de inibição contra *Colletotrichum* sp. *in vitro*, mas apenas três reduziram o crescimento micelial de todos os fungos em meio BDA (Figura 2B).

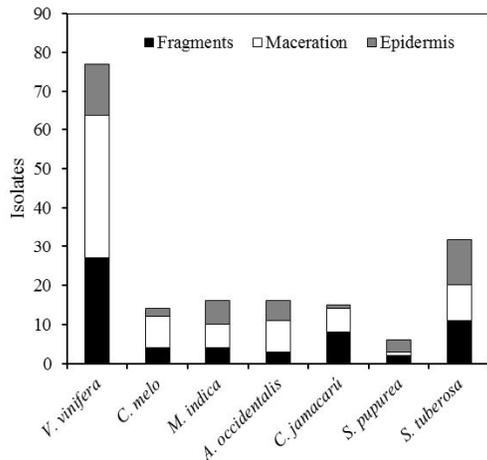


Figura 1 - Isolados de leveduras obtidos de diferentes frutas e métodos de isolamento.

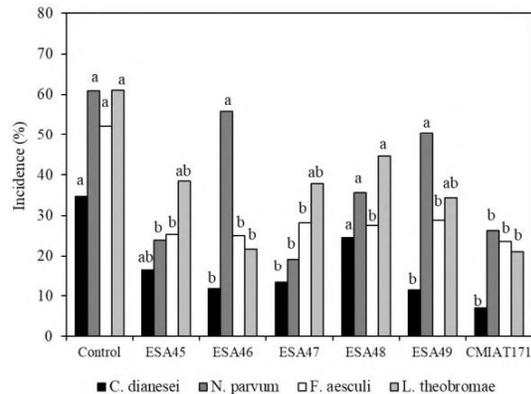


Figura 3 - Incidência de podridões de manga em feridas artificiais e inoculação dos patógenos após a aplicação dos agentes de controle.

A maioria das espécies identificadas pelo sequenciamento parcial *Its1/Its4* pertencia ao gênero *Saccharomyces* (Saccharomycetes, Saccharomycotina, Ascomycota, Fungi). Três deles tiveram alta similaridade com *S. cerevisiae* ESA45, ESA46 e ESA48, outro para *Pichia kudriavzevii* CMIAT171 e um *Saccharomyces* ESA47 sem confirmação da espécie. O último teve uma alta correspondência com *Cystobasidium calyptogenae* ESA49 (Cystobasidiomycetes; Pucciniomycotina, Basidiomycota, Fungi).

*S. cerevisiae* ESA45 e *Saccharomyces* sp. ESA47 reduziu significativamente a incidência de *N. parvum* em 45,0 e 35,2%, respectivamente. Ambos os isolados também reduziram a infecção de *C.*

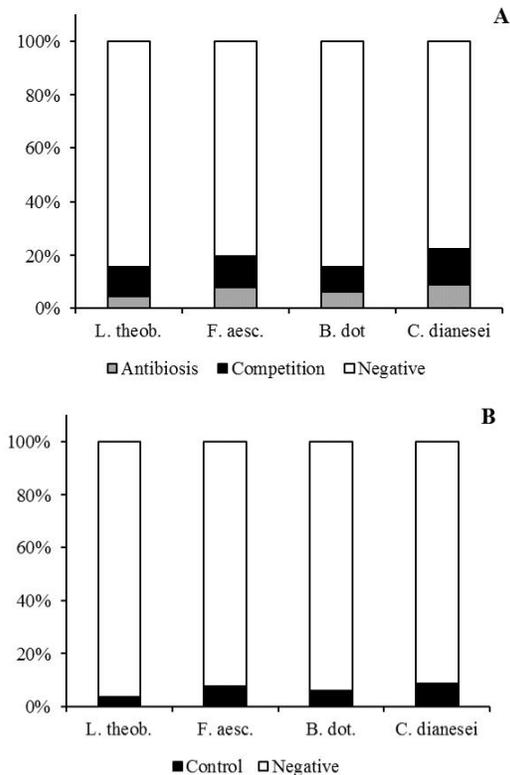


Figura 2 - Antagonismo in vitro (A) e in vivo (B) de isolados de levedura contra patógenos pós-colheita em manga. O controle em B refere-se à capacidade do antagonista de reduzir em pelo menos 50% o tamanho médio

*dianesei* em 37,5 e 25,0%. Para *F. aesculi* e *L. theobromae*, os isolados ESA45, ESA46 e CMIAT171 produziram a maior redução na incidência de podridão dos frutos. A aplicação dos isolados de levedura também reduziu significativamente a severidade da doença reduzindo a área média dos sintomas.

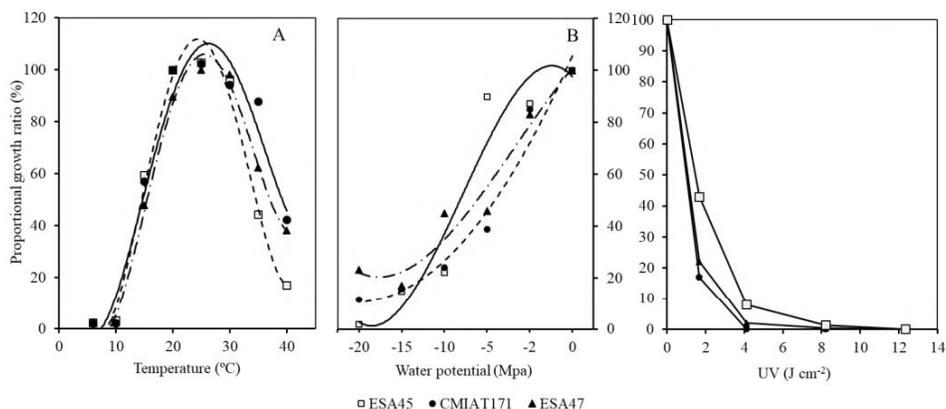


Figura 4 - Relação de crescimento proporcional de *S. cerevisiae* ESA45, *Saccharomyces* sp. ESA47 e *P. kudriavzevii* CMIAT171 submetidos a diferentes fontes de estresse abiótico.

Os isolados de levedura não cresceram em meio PDY nas temperaturas de seis e 10 °C após três dias de incubação. No entanto, quando as placas foram transferidas para 25 °C, as colônias começaram a crescer e o crescimento relativo (CR) foi de aproximadamente 60%. O crescimento do ESA45 foi fortemente reduzido pelo incremento de temperatura acima de 30 °C, apresentando PGR de 44,3 e 16,9% a 35 e 45 °C, respectivamente, enquanto CMIAT171 e ESA47 ainda apresentaram CR de 42,3 e 38,1%, respectivamente, à temperatura mais alta testada. Os isolados ESA45 e CMIAT171 foram altamente tolerantes ao baixo potencial hídrico com CR próximo a 40% a 0,862 a<sub>w</sub>, enquanto o ESA47 ficou abaixo de 20%. Os isolados sofreram uma forte redução no CR quando expostos à radiação UV, mas o isolado ESA45 foi ligeiramente mais tolerante do que os outros aos 1,64 e 3,28 kJ cm<sup>2</sup> de UV.

## CONCLUSÕES

Há uma população autóctone de leveduras na superfície de frutos nativos e cultivos, com a incidência de cepas antagonistas aos patógenos pós-colheita de manga. A maioria dos isolados de levedura mostrou especificidade na inibição do desenvolvimento de patógenos *in vitro* e *in vivo*, mas seis isolados foram antagonistas *in vitro* e *in vivo* para os quatro patógenos.

## REFERÊNCIAS

- COSTA, V.S. de O. et al Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. Eur. J. Plant Pathol. 127, 509-519, 2010.
- LIMA, J.R. et al. Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. Summa Phytopathol 40, 203–211, 2014.