

Avaliação de Microrganismos de Solo no Controle Biológico de *Botrytis cinerea*

Gildo Almeida da Silva¹, Patricia Dayane Carvalho Schaker², Carolina Madalozzo Poletto³, Sayuri Raquel Yoshida⁴, Jandora Severo Poli⁵.

¹Embrapa Uva e Vinho – Laboratório de Microbiologia
Caixa Postal 130 – 95.700-000 Bento Gonçalves – RS - E-mail: gildo@embrapa.cnpuv.br

²Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Rua Benjamin Constant, 229, Bento Gonçalves – RS.

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Depto. Microbiologia Agrícola
Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre – RS. Bolsista Capes.

⁴Unijuí - RS 344, Km 39 CP 489, 98900-000, Santa Rosa-RS. Bolsista PIBIC.

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Depto. Microbiologia Agrícola
Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre – RS. Bolsista CNPq.

RESUMO

Os problemas microbiológicos que envolvem a pós-colheita são responsáveis por grandes perdas de produtos agrícolas e são causadas principalmente por fungos, destacando-se Botrytis cinerea. Com o objetivo de selecionar agentes potenciais para controle deste patógeno, foram isolados 99 microrganismos de solo, os quais foram submetidos a testes in vitro. O patógeno e o isolado foram inoculados e incubados em meio G7c durante quatro dias. Foi realizada avaliação diária do crescimento do disco central do patógeno e calculado o índice de inibição do crescimento com base no diâmetro do disco, parâmetro utilizado para seleção dos isolados com potencial para controle do fungo. Das 99 linhagens, 17 apresentaram índices de inibição superiores a 50%, dentre os quais M13/08 e M31/08 inibiram severamente o crescimento do patógeno. O antagonismo destas duas linhagens está relacionado, muito provavelmente, à síntese de compostos antifúngicos que se difundem no meio, impedindo sua proliferação.

Palavras-chave: antagonismo, patógeno, podridão cinzenta, pós-colheita, difusão.

INTRODUÇÃO

As doenças de plantas são responsáveis por consideráveis perdas econômicas nas culturas de importância agrícola (Bettiol., 1991). Atualmente, o controle de pragas de campo tem sido realizado principalmente com o uso de defensivos químicos. Estes atuam sobre organismos não-alvo, contaminam as águas superficiais e subterrâneas, deixam resíduos em alimentos e induzem resistência. Adicionalmente, a sociedade, exigindo cada vez mais alimentos livres de resíduos químicos, tem incentivado o desenvolvimento de métodos alternativos de controle (Melo et al., 1998). Uma dessas alternativas é o controle biológico. Este processo ocorre por meio da substituição de defensivos químicos por microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Alguns destes microrganismos possuem a capacidade de inibir a ação de patógenos. Esta inibição se dá por antibiose, parasitismo, resistência induzida e competição por espaço ou nutrientes (Janisiewicz et al., 2000).

Segundo Melo et al. (1998), o solo é o principal reservatório de agentes microbianos para controle de insetos-praga, microrganismos causadores de doenças e nematóides. Nele

encontramos uma microfauna com elevada resistência, uma vez que interagem com diversos outros microrganismos para assegurar sua sobrevivência, além da capacidade de se ajustar rapidamente às variações ambientais. Neste caso, estes microrganismos são antagonistas promissores para o controle biológico de pragas.

A aplicação destes agentes biológicos pode ser realizada tanto em pré como pós-colheita. As podridões pós-colheita são de difícil controle e são responsáveis por grande percentagem de perdas (Kretzschmar, 1991). Diversos microrganismos estão associados às podridões em pós-colheita de frutos e hortaliças, com destaque para os fungos. Estes microrganismos penetram nos frutos por meio de ferimentos acidentais durante a colheita, o transporte e o armazenamento. A penetração pode se dar também por aberturas naturais do fruto, como lenticelas e partes florais, permanecendo latente até o amadurecimento quando então causam a podridão (Creemers, 1989). O fungo *Botrytis cinerea* é um dos principais patógenos causadores de doenças pré e pós-colheita. Os problemas causados por este fungo têm sido descritos em vários produtos agrícolas (Naradisorn, 2008). Esse patógeno é o agente etiológico da “podridão cinzenta”. Seu desenvolvimento e sua propagação são favorecidos por ambientes com precipitação pluviométrica elevada, alta umidade relativa do ar e teores elevados de matéria orgânica no solo. Adicionalmente, o fungo é de difícil controle devido a sua complexa epidemiologia e suas diversas rotas de infecção (Walker et al., 2001).

Como testes de seleção de antagonistas *in vitro* permitem identificar microrganismos que apresentem potencial para o controle de um determinado patógeno, o objetivo do trabalho foi isolar microrganismos de solo e avaliar seus potenciais para controle *in vitro* de *B. cinerea*.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO

Foi coletada uma amostra de solo da Embrapa Uva e Vinho em Bento Gonçalves-RS. A amostra foi triturada em liquidificador com 100 ml de água destilada. Foi utilizado o meio G7c (Silva e Almeida, 2006), que se caracteriza por possuir 114ml/L de extrato de levedura não-comercial e 20g/L de Agar (Bacto Difco). O pH foi ajustado para 6,5. Foi efetuada diluição em série e alíquotas de 100µL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram transferidas para placas de Petri, contendo meio G7c, e mantidas em estufa (Labline-Imperial II USA) a 25°C. Para o isolamento foram consideradas as placas que apresentaram contagem entre 30 e 300 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por placa. As colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio, contendo G7c inclinado e mantidas em estufa (Labline-Imperial II USA). Foram isoladas 99 colônias e denominadas por códigos (M1/08 a M99/08).

ANTAGONISMO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS CONTRA *BOTRYTIS CINEREA*

Todos os microrganismos isolados foram testados quanto à capacidade de interferir *in vitro* no crescimento de *B. cinerea*, inibindo-o ou estimulando-o. Foram retirados discos centrais de 0,4 cm de diâmetro de placas contendo meio G7c, originando poços. As linhagens foram dispostas na forma de estrias equidistantes um cm das extremidades do poço, onde foi introduzido um disco de 0,4 cm de diâmetro retirado da periferia da colônia de *B. cinerea*. Como testemunha foi utilizada uma placa contendo apenas um disco central com micélio do fungo. As placas foram incubadas a 25°C durante quatro dias na ausência de luz. O crescimento micelial do disco do patógeno foi medido diariamente na direção das estrias (st) e no espaço livre (fw). Para cada microrganismo foi utilizada uma placa.

O índice de inibição do crescimento de *B. cinerea* foi obtido com as seguintes fórmulas:

$$(IGc)_{st} = [d(\phi_{f-is}) - d(\phi_{f-stis})] / d(\phi_{f-is})$$

$$(IGc)_{fw} = [d(\phi_{f-is}) - d(\phi_{f+fwis})] / d(\phi_{f-is})$$

Sendo,

(IGc)st: índice de inibição do crescimento em direção as estrias (st)

(IGc)fw: índice de inibição do crescimento em direção ao espaço livre (fw)

$d(\Phi_{f-is})$: diâmetro da circunferência (cm) na ausência do microrganismo isolado (testemunha)

$d(\Phi_{f-stis})$: diâmetro da circunferência (cm) na presença do microrganismo isolado, em direção às estrias (st)

$d(\Phi_{f-fwis})$: diâmetro da circunferência (cm) na presença do microrganismo isolado, em direção ao espaço livre (fw)

Foram considerados microrganismos com potencial antagonico para controle do crescimento de *B. cinerea* aqueles que apresentaram, no quarto dia de avaliação, índice de inibição em direção ao espaço livre e às estrias maior que 0,5. Para estes microrganismos foi calculada a taxa de crescimento do patógeno na presença dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 99 microrganismos, dos quais 17 apresentaram índice de inibição superior ou igual a 0,5 no quarto dia de avaliação (Tabela 1). Assim, esses microrganismos foram capazes de inibir 50% ou mais o crescimento da *B. cinerea*. Destes, destacou-se a linhagem M31/08, apresentando um índice de inibição de 0,79 no sentido das estrias (st) e 0,80 no sentido do espaço livre (fw) no quarto dia de avaliação (Figura 1). O crescimento do fungo foi detido por ação da linhagem M31/08 em 24 horas. A inibição se efetuou sem contato célula-célula. Essa característica observada sugere que o provável mecanismo de antagonismo seja a produção de substâncias com características antifúngicas que se difundem com facilidade no meio e podem interromper a proliferação do fungo. A produção de substâncias antimicrobianas é um mecanismo universal de antagonismo que os agentes de biocontrole exibem com frequência, ainda que necessariamente não sejam os únicos nem os mais importantes meios de antagonismo (Yoshida et al., 2001, Barra et al., 2008). Nutrientes podem atuar de várias formas. Estimulam o desenvolvimento do antagonista sobre o fruto, aumentando a eficiência do controle (Janisiewicz et al., 1992) ou, sendo consumido rapidamente pelo antagonista (Janisiewicz et al., 2000), inibem uma determinada fase do desenvolvimento do fungo. Os aminoácidos, em particular, podem fazer parte da composição de moléculas inibidoras da esporulação (Musetti et al., 2006).

Comportamento semelhante ao da linhagem M31/08 foi observado para linhagem M13/08. O microrganismo impediu o crescimento do patógeno a partir das 48 horas de incubação. Na placa contendo M13/08, *B. cinerea* apresentou uma taxa de crescimento linear de 0,35 cm/dia; enquanto que na placa testemunha (Figura 2) a taxa de crescimento linear foi de 0,9 cm/dia. Da mesma forma que para M31/08, não foi necessário contato célula-célula para inibição do crescimento. Esse resultado indica que os compostos antifúngicos sintetizados por M13/08 também são capazes de se difundir no meio, porém com menor velocidade que os produzidos por M31/08 ou apresentam menor atividade inibidora.

Nas placas M13/08 e M31/08, onde houve inibição do crescimento do fungo, foi formado um aglomerado de micélios condensados e conídios deformados. O mesmo foi observado por Paul et al. (1998), ao testar *in vitro* a bactéria de solo B-781 no controle de *B. cinerea*. Apesar de não ocorrer germinação de conídios do patógeno na presença do antagonista, eles permaneceram viáveis quando plaqueados em meio de cultura sem antagonista. O mesmo comportamento foi observado por Janisiewicz et al. (2000) ao caracterizar o mecanismo de controle biológico por meio de um estudo de competição por nutrientes para controle de *Penicillium expansum*.

Entre os microrganismos isolados, foram registrados para quatro deles (M51/08, M56/08,

M59/08 e M60/08) índices de inibição do crescimento negativo, com valor de 0,03 para todos os quatro. Esse resultado pode ter decorrido por diferenças na quantidade de micélios em cada disco, evidenciando que os dois microrganismos, *B. cinerea* e antagonista, podem coexistir e proliferar no mesmo ambiente sem que haja inibição.

As demais linhagens apresentaram alguma habilidade na redução da proliferação de *B. cinerea*, no entanto, esses valores não foram expressivos, variando entre 3 e 49%. Zahavi et al. (2000) testaram 129 microrganismos epifíticos isolados de uvas de mesa para controle biológico de *B. cinerea*. Poucas linhagens reduziram o desenvolvimento da podridão nos frutos em um nível que pudesse ser considerado significativo para as condições comerciais. Na busca de agentes biológicos capazes de controlar *B. cinerea*, Rabosto et al. (2006) isolaram 223 microrganismos entre fungos e bactérias de solos de vinhedos uruguaios, dentre os quais 8 fungos e 4 bactérias apresentaram eficácia superior a 50% em testes *in vitro*. Uma espécie de *Bacillus* (UYBC38) e uma linhagem de *Hanseniaspora uvarum* (UYNS13) mostraram uma alta capacidade antagonista *in vitro* contra o patógeno, com índices de inibição de 1 e 0,9, respectivamente.

Embora o comportamento de microrganismos obtido *in vitro* não seja o mesmo que se observa em condições de campo, informações importantes podem ser auferidas a respeito do potencial destes microrganismos para controle biológico (Silva, 1996). De acordo Spadaro e Gullino (2004), um agente de controle biológico ideal deve ser geneticamente estável, eficaz em baixas concentrações, apresentar um amplo espectro de ação, sobreviver em condições adversas, crescer em meios de baixo custo e não produzir metabolitos tóxicos aos seres humanos. No entanto, poucos microrganismos apresentam todas as características desejáveis quando submetidos às condições de campo. Porém, a procura por agentes biológicos para controle da deterioração de frutos na pós-colheita é facilitada, uma vez que os produtos são armazenados em condições controladas de temperatura e de umidade relativa. Além disso, a limitação da superfície de aplicação dos antagonistas torna o procedimento de controle economicamente viável (Michereff, 2008). Essas características favorecem a estabilidade do metabolismo e da atividade antagonista do isolado, facilitando sua exploração para produção em grande escala e comercialização.

Em condições de atmosfera e umidade relativa controladas, vários microrganismos já foram encontrados para controle de *B. cinerea*. Saligkarias et al. (2002) utilizaram com sucesso as leveduras *Candida guilliermondii* e *Candida oleophila* no controle do patógeno em uvas viníferas e de mesa. Calvo et al. (2007) obtiveram resultados satisfatórios com a bactéria *Rahnella aquatilis* em maçãs e Yu et al. (2008) utilizaram com sucesso a levedura *Cryptococcus laurentii* em combinação com o fito hormônio ácido-indol-acético no controle da podridão cinzenta em maçãs.

Como o controle foi caracterizado por inibição à distância, avaliações sobre as condições de produção de metabólitos inibidores da *B. cinerea* deverão ser conduzidas.

Tabela 1. Linhagens de bactérias com índice de inibição em direção ao espaço livre e em direção às estrias superior ou igual a 0,5 no quarto dia de avaliação e suas respectivas equações que definem o crescimento do fungo *B. cinerea*.

Isolado	Ind. Inib. st	Ind. Inib. fw	Equações	r ²
M1	0,54	0,57	$y = 0,075x^3 - 0,6964x^2 + 2,2286x - 1,2$	0,997
M11	0,51	0,50	$y = -0,025x^3 + 0,175x^2 + 0,1x + 0,14$	0,9955
M13	0,72	0,61	$y = 0,35x + 0,0667$	0,9932
M15	0,51	0,50	$y = -0,025x^3 + 0,175x^2 + 0,1x + 0,14$	0,9955
M16	0,54	0,61	$y = 0,8803 \ln(x) + 0,3571$	0,992
M21	0,51	0,59	$y = 0,37x + 0,09$	0,992
M22	0,51	0,50	$y = -0,025x^3 + 0,175x^2 + 0,1x + 0,14$	0,9955

M28	0,51	0,50	$y= 0,39x-0,03$	0,9928
M31	0,79	0,80	$y= 0,7x-0,3$	1
M32	0,51	0,50	$y= -0,0286x^2+0,5514x-0,14$	0,9969
M33	0,51	0,50	$y= 0,39x-0,01$	0,9928
M35	0,51	0,52	$y= -0,0286x^2+0,5514x-0,12$	0,9914
M39	0,51	0,52	$y= -0,0357x^2+0,604x-0,2$	0,9941
M43	0,51	0,55	$y= 0,2784e^{0,3964x}$	0,9909
M45	0,51	0,55	$y= 0,2726e^{0,3964x}$	0,9972
M46	0,62	0,64	$y= 0,28x+0,08$	0,9949
M68	0,54	0,55	$y= -0,0333x^3+0,25x^2-0,1167x+0,3$	1

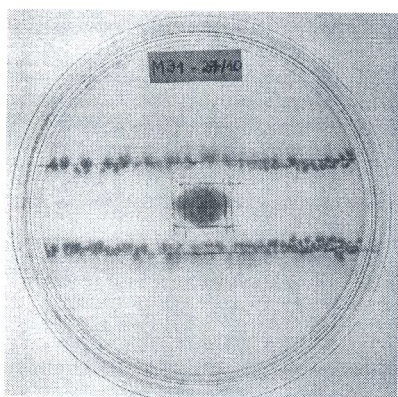


Figura 1. Crescimento *B. cinerea*, contendo a linhagem M31 (4 dias) em meio G7c.

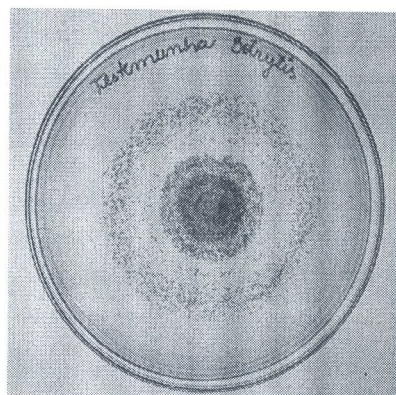


Figura 2. Crescimento *B. cinerea* (testemunha-4 dias) em meio G7c.

CONCLUSÕES

O número de microrganismos isolados do solo que apresentou índices de inibição satisfatórios para o controle de *B. cinerea* é baixo. O mecanismo de ação antagonística das linhagens está relacionado com a síntese de metabólitos inibidores ou com a competição por nutrientes mas não com a inibição por contato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barra, V. R.; Silva, R da; Ferraz, H. G. M.; Macagnam, D.; Silva, H. S. A.; Moura, A. B.; Halfeld-Vieira, B. A.; Mendonça, H. L. e Vieira Júnior, J. R. (2008), Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. *Summa Phytopathol.*, v. 34, n. 2, p. 121-126.
- Bettiol, W. (1991), Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. *Controle Biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, Brasil.
- Calvo, J.; Calvente, V.; Orellano, M. E.; Benuzzi, D. e Tosetti, M. I. S. (2007), Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 113, n. 3, p. 251-257.
- Creemers, P. (1989), Chemical control of parasitic storage diseases on apple and pear. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 258, p. 646-653.
- Janisiewicz, W. J. Usall, J. E Bors, B. (1992), Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology*, v. 82, p. 1364-1370.
- Janisiewicz, W. J.; Tworkoski, T. J. e Sharer, C. (2000), Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, v. 90, p. 1196-1200.

Kretzschmar, A. A. (1991), Controle Biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita. In: Bettiol, W. *Controle Biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, Brasil.

Melo, I. S. e Azevedo, J. L. (1998), *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa, Brasil.

Michereff, S. J. (2008), Controle biológico de doenças de plantas. Disponível em <http://www.fag.edu.br/professores/smtrento/T17.pdf>. Acesso em 05 fev. 2009.

Naradisorn, M. (2008), Effect of nutrition on postharvest quality and grey mould development in strawberries. *Thesis Doctor of Philosophy*, University of Adelaide, Adelaide, Australia.

Paul, B.; Chereyathmanjiyil, A.; Masih, I.; Chapuis, L. e Benoit, A. (1998), Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, n. 165, p. 65-70.

Rabosto, X.; Carrau, M.; Paz, A.; Boido, E.; Dellacassa, E. e Carrau F. M. (2006), Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 57, n. 3, p. 332-338.

Saligkarias, I. D.; Gravanis, F. T. e Epton, H. A. S. (2002), Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: *in vivo* studies. *Biological control*, v. 25, p. 143-150.

Silva, G. A. da (1996), Bactérias de rizosfera de videira e sua relação com *Fusarium oxysporum*. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, Bento Gonçalves, p. 78.

Silva, G. A. da e Almeida, E. A. (2006), Production of Yellow-Green Fluorescent Pigment by *Pseudomonas Fluorescens*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 3, p. 411-419.

Spadaro, D. e Gullino, M. L. (2004), State of art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, v. 91, p. 185-194.

Walker, R.; Innes, C. M. e Allan, E. J. (2001), The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, p. 346-348.

Yoshida, S.; Hiradate, S.; Tsukamoto, T. Hatakeda, K. e Shirata, A. (2001), Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, v. 91, p. 181-187.

Yu, T.; Zhang, H.; Li, X. e Zheng, X. (2008), Biocontrol of *Botrytis cinerea* in apple fruit by *Cryptococcus laurentii* and indole-3-acetic acid. *Biological Control*, v. 46, p. 171-177.

Zahavi, T.; Cohen, L.; Weiss, B.; Schena, L.; Daus, A.; Kaplunov, T. Zutkhi, J.; Ben-Arie, R. e Droby, S. (2000), Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, v. 20, p. 115-124.