

UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS GRAS NO CONTROLE DO CRESCIMENTO DO FITOPATÓGENO *FUSARIUM GUTTIFORME* IN VITRO.

Camilla Martins Malta¹, Eskálath Morganna Silva Ferreira¹, Raphael Sanzio Pimenta²

¹Doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE. e-mail: <camilla.malta@ifto.edu.br>

²Professor Doutor da Fundação Universidade Federal do Tocantins - UFT. e-mail: <biorapha@yahoo.com.br>

Resumo: Entre as principais doenças do abacaxi (*Ananas comosus*), a fusariose ou gomose é a mais destrutiva, podendo gerar perdas entre 50 a 100% dos frutos e, também, diminuir em até 50% a sobrevivência das mudas. A utilização de agrotóxicos é cada dia mais contestada pelos danos causados ao homem e ao ambiente, deste modo, substâncias “GRAS” (Geralmente Reconhecida como Segura – Generally Recognized as Safe) se mostram como uma boa alternativa no controle de fitopatógenos. Este trabalho objetivou testar a capacidade de substâncias GRAS em inibir o crescimento do fitopatógeno *Fusarium guttiforme in vitro*. Foram testadas cinco substâncias GRAS listadas pela FAO/FDA, quanto sua capacidade de inibir o crescimento do fitopatógeno *F. guttiforme in vitro*, (1) Bicarbonato de Sódio, (2) Carbonato de Sódio, (3) Carbonato de Cálcio, (4) Cloreto de Cálcio e (5) Cloreto de Potássio. O fitopatógeno *Fusarium guttiforme* teve seu crescimento micelial reduzido em 100% e 87% pela substância GRAS Carbonato de Sódio, nas concentrações de 5% e 3% respectivamente. Bicarbonato de Sódio na concentração de 5% foi capaz de inibir o crescimento de *F. guttiforme* em 87%, e 72,5% na concentração de 3%. Cloreto de Cálcio 5% foi capaz de inibir 51% do crescimento micelial deste fitopatógeno. Já Carbonato de Cálcio e Cloreto de Potássio não mostraram eficácia em inibir este fitopatógeno.

Palavras-chave: Controle biológico, fitopatógeno, *Fusarium guttiforme*, substâncias “GRAS”

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos grandes e tradicionais produtores de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) no mundo, sendo que maior parte dos frutos é comercializada no mercado interno, na forma de fruta *in natura* (MELETTI, et al., 2011). O abacaxi é um fruto de grande aceitação pelo seu aroma e sabor, consumido em todo o globo terrestre, sendo rico em açúcares, sais minerais e vitaminas (GONÇALVES, 2000). A incidência de doenças na cultura pode depreciar a qualidade dos frutos e diminuir a produção (NOGUEIRA et al., 2014). Entre as doenças principais, a fusariose ou gomose é a mais destrutiva, podendo gerar perdas entre 50 a 100% dos frutos e, também, diminuir em até 50% a sobrevivência das mudas (MATOS, 2003).

O agente etiológico é o fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell, 1998 (= *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim & Gilbertson, 1993) (NIRENBERG & O'DONNELL, 1998). A fusariose é uma doença que pode ocorrer em qualquer estágio fenológico e órgão da planta, mas o fruto é o local de maior incidência, cujo principal sintoma é a exsudação de uma substância gomosa (CARVALHO et al, 2006).

O fitopatógeno é altamente agressivo e seu manejo é realizado com um conjunto de medidas de controle, sendo a redução do inóculo inicial a primeira medida a ser adotada, seguida

pelo controle químico (MATOS, 2003). No entanto, a utilização de agrotóxicos é cada dia mais contestada pelos danos causados ao homem e ao ambiente, além de poder promover a resistência de fitopatógenos a fungicidas (CIA et al., 2007). Assim, formas alternativas de controle despertam interesse cada vez maior, levando à investigação e ao desenvolvimento de produtos eficazes e sustentáveis para o controle de fitopatógenos (DELIOPOULUS et al., 2010).

Deste modo, substâncias “GRAS” (*Generally Recognized As Safe*) se mostram como uma boa alternativa no controle de fitopatógenos, pois auxiliam outros agentes biológicos em sua ação antagonista, podendo causar efeito fungistático ou fungicida. São ainda, substâncias sancionadas pela FAO/FDA e já utilizadas como aditivos alimentícios, portanto, não causam danos a saúde e não necessitam de avaliação prévia de uso e comercialização (JANISIEWICZ, et al., 2010). Existem várias substâncias GRAS utilizadas na indústria alimentícia e como auxiliares no controle biológico, como por exemplo, ácido cítrico, Agar Agar, goma xantina, bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, quitosana, etc. (TALIBI et al., 2014). Embora as formas ácidas também possuam atividade antimicrobiana, em alguns casos, os sais são preferidos para os tratamentos, devido à sua solubilidade superior, facilidade de aplicação, e a atividade adicional de cátions tais como Na⁺ (sódio), K⁺ (potássio) e NH₄⁺ (amônia) (SMILANICK et al., 1999).

Portanto, este trabalho teve como objetivo testar a capacidade de substâncias GRAS em inibir o crescimento do fitopatógeno *Fusarium guttiforme* *in vitro*.

2 METODOLOGIA

2.1. Fitopatógeno

O fitopatógeno *Fusarium guttiforme*, foi isolado a partir de frutos comerciais que manifestaram a doença. Os isolados foram identificados pelos padrões morfológicos. Todos os isolados foram preservados em tubos criogênicos contendo glicerol a 15% em freezer - 80° C.

2.2. Testes de Sensibilidade de *F. guttiforme* as Substâncias GRAS

Foram testadas cinco substâncias GRAS listadas pela FAO/FDA, quanto sua capacidade de inibir o crescimento do fitopatógeno *Fusarium guttiforme* *in vitro*, (1) Bicarbonato de Sódio, (2) Carbonato de Sódio, (3) Carbonato de Cálcio, (4) Cloreto de Cálcio e (5) Cloreto de Potássio.

O fitopatógeno *Fusarium guttiforme* foi reativado previamente em meio de cultivo NYDA (0,3% Extrato de Carne, 0,5% Extrato de Levedura, 0,5% Peptona, 1% Glicose e 2% Ágar) suplementado com clorafenicol (0,1g/L) e incubado a 25 °C por cerca de 7 dias. Após o crescimento seus esporos foram raspados, sendo a concentração destes ajustada com auxílio de Câmara de

Newbauer em solução de Tween 60® a 0,2% para 10^3 esporos/mL. Foram plaqueados, em forma de gota e no centro da placa, 10 μ L desta solução de esporos em placas de Petri contendo o meio de cultivo NYDA suplementado com 1%, 3% e 5% de cada uma das substâncias GRAS escolhidas. A porcentagem de concentração de Cloreto de Potássio nas placas de Petri foi de 0,1%, 0,5% e 1%, pois, de acordo com a FAO/FDA o limite de suplementação em alimentos por esta substância é de 1% (FAO, 2013).

Como controle positivo, 10 μ L da solução de esporos do fitopatógeno foi inoculado em placas de NYDA isentos de substâncias “GRAS”. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25 °C por um período de 7 dias. O diâmetro do micélio fúngico foi mensurado com o auxílio de paquímetro digital e comparado com o controle positivo nos dias 3, 5 e 7 do período de incubação. O teste foi realizado em triplicata e foram consideradas eficazes aquelas substâncias que inibiram 50% ou mais do crescimento do fitopatógeno quando comparado com o controle positivo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O fitopatógeno *F. guttiforme* teve seu diâmetro de crescimento observado durante seu período de incubação em meio de cultura suplementado com as substâncias GRAS. Das cinco substâncias GRAS utilizadas neste teste apenas Carbonato de Sódio foi eficaz em reduzir ou inibir o crescimento micelial do fitopatógeno *in vitro* em todas as concentrações utilizadas. Quando comparado com o controle positivo no sétimo dia de leitura, Carbonato de Sódio na concentração de 1% inibiu 52,5% do crescimento micelial do fitopatógeno. Esta mesma substância GRAS nas concentrações de 3% e 5%, inibiram 87,3% e 100% o crescimento de *F. guttiforme in vitro* como observado na figura 1.

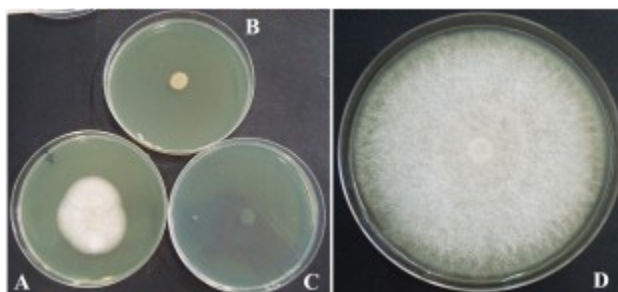


Figura 1. Teste de sensibilidade de *F. guttiforme* em meio de cultura suplementado com (A) 1% de Carbonato de Sódio, (B) 3% de Carbonato de Sódio e (C) 5% de Carbonato de Sódio. (D) Controle positivo *F. guttiforme*.

Ainda com base nos dados obtidos no sétimo dia de leitura, a substância GRAS Bicarbonato de Sódio não inibiu o crescimento de *F. guttiforme* na concentração de 1%. Na

concentração de 3% foi capaz de inibir em 72,5% o crescimento micelial deste fitopatógeno. E por fim inibiu 87% do crescimento micelial de *F. guttiforme* na contração de 5% (Figura 2).

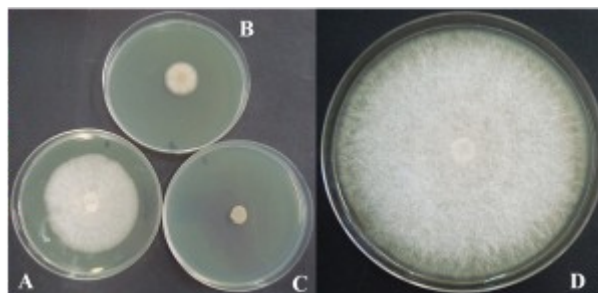


Figura 2. Teste de sensibilidade de *F. guttiforme* em meio de cultura suplementado com (A) 1% de Bicarbonato de Sódio, (B) 3% de Bicarbonato de Sódio e (C) 5% de Bicarbonato de Sódio. (D) Controle positivo *F. guttiforme*.

O tratamento utilizando 5% de Cloreto de Cálcio foi o único desta substância que reduziu em 51% o crescimento do *F. guttiforme in vitro*, na leitura do sétimo dia de crescimento (Figura 3).

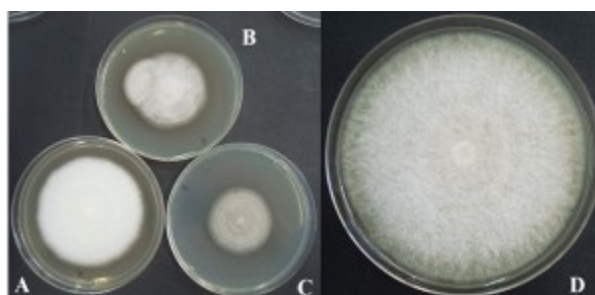


Figura 3. Teste de sensibilidade de *F. guttiforme* em meio de cultura suplementado com (A) 1% de Cloreto de Cálcio, (B) 3% de Cloreto de Cálcio e (C) 5% de Cloreto de Cálcio. (D) Controle positivo *F. guttiforme*.

As substâncias “GRAS” Carbonato de Cálcio e Cloreto de Potássio não apresentaram capacidade de reduzir ou inibir o crescimento micelial do fitopatógeno quando comparado com o controle (Figura 4).

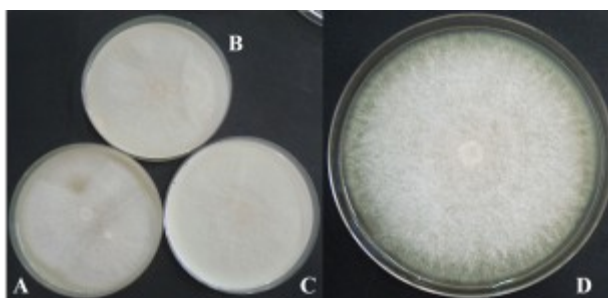


Figura 4. Teste de sensibilidade de *F. guttiforme* em meio de cultura suplementado com (A) 1% de Carbonato de Cálcio, (B) 3% de Carbonato de Cálcio e (C) 5% de Carbonato de Cálcio. (D) Controle positivo *F. guttiforme*.

Na realidade, nos meios de cultura suplementados com Cloreto de Potássio o crescimento micelial apresentou aumento com a adição desta substância GRAS. No tratamento utilizando 0,3% Cloreto de Potássio o crescimento da colônia de *F. guttiforme* se mostrou maior que o observado no tratamento controle, como podemos observar no na figura 5.

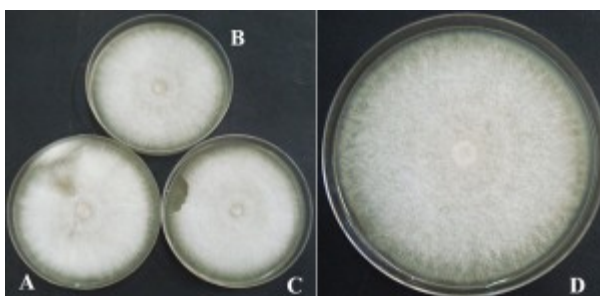


Figura 5. Teste de sensibilidade de *F. guttiforme* em meio de cultura suplementado com (A) 1% de Cloreto de Potássio, (B) 3% de Cloreto de Potássio e (C) 5% de Cloreto de Potássio. (D) Controle positivo *F. guttiforme*.

Para elucidar com mais clareza a relação de inibição das substâncias GRAS utilizadas as tabelas 1 e 2 detém a relação das médias obtidas através das medidas em triplicata do crescimento micelial do fitopatógeno *Fusarium guttiforme*.

Tabela 1. Relação de médias obtidas através das medidas do crescimento micelial do fitopatógeno *Fusarium guttiforme* para a substância GRAS Cloreto de Potássio.

	Cloreto de Potássio			
	0.3%	0.5%	1%	Controle Positivo
Dia 3	29,5	30,1	56,6	28,4
Dia 5	48,6	56,4	78,8	55,6
Dia 7	56,6	54,2	70,8	76,2

Tabela 2. Relação de médias obtidas através das medidas do crescimento micelial do fitopatógeno *Fusarium guttiforme*.

	Carb. Sódio	Carb. Cálcio	Bic. Sódio	Clor. Cálcio	Controle Positivo
Dia 3 - 1%	10,5	26,8	18,5	23,7	28,4
	0	28,3	10,6	18,2	28,4
	0	25,8	7,5	13,7	28,4
Dia 5 - 3%	22,3	52,2	37,8	43,6	55,6
	8,7	53,5	14,6	32,8	55,6
	0	51,6	9,4	26	55,6
Dia 7 - 5%	36,2	76,3	56,2	56,6	76,2
	9,7	77	21	43,7	76,2
	0	76,2	9,9	37,9	76,2

O êxito de fosfato trissódico em impedir o desenvolvimento da podridão parda causada por *Monilinia fructicola* em jujuba (*Zizyphus jujuba* cv. Dongzao) e pêssgo foi examinado por Cai et al. (2015). Estes autores mostraram que a eficiência do fosfato trissódico foi positivamente correlacionada com as suas concentrações, onde esta substância GRAS inibiu diretamente a germinação de esporos, alongamento das hifas e crescimento micelial de *M. fructicola* em meio de cultura. O tratamento com fosfato trissódico ocasionou na perda da integridade da membrana plasmática de *M. fructicola*, resultando no rompimento das células e liberação de seu conteúdo intracelular, tais como proteínas, hidratos de carbono solúveis e ácidos nucleicos.

Segundo Janisiewicz & Conway (2010), o efeito dos tratamentos de sais de bicarbonatos e carbonatos é principalmente fungistático porque os esporos fúngicos não são inativados, somente a sua germinação é adiada. Os mesmos autores ainda afirmam que os esporos geminados parecem ser mais facilmente inativados pela presença destas substâncias que os esporos não germinados. Portanto, o fitopatógeno *F. guttiforme* se mostrou sensível às substâncias GRAS Carbonato de Sódio, nas três concentrações, Bicarbonato de Sódio, nas concentrações de 3% e 5%. Foi observada ainda a sensibilidade deste fitopatógeno à Cloreto de Cálcio na concentração de 5%.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através dos testes realizados neste estudo sugerem que as substâncias GRAS Carbonato de Sódio nas concentrações de 5% e 3% e Bicarbonato de Sódio na concentração de 5% podem ser indicadas para protocolos de controle biológico contra o *Fusarium guttiforme*.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, R.A.; LACERDA, J.T. de; OLIVEIRA, E.F. de; CHOAIRY, S.A.; BARREIRO NETO, M.; SANTOS, E.S. dos. **Controle agroecológico da fusariose do abacaxi com plantas antibióticas**. 2006. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/abacaxi/Index.htm. Acesso em: 12 jan. 2016.
- CAI, J.; CHEN, J.; LU, G.; ZHAO, Y.; TIAN, S.; QIN, G. Control of brown rot on jujube and peach fruits by trisodiumphosphate. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 93–98, 2015.
- CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. **Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita**. In: RODRIGUES, F.A.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas apatógenos. Viçosa: Ed. da UFV, 2007. p.245-280.
- DELIOPOULUS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, v. 29, p. 1059-1075, 2010.
- FAO. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**. FAOSATS: Crop yields, 2013. Disponível :<http://faostat.fao.org>. Acessado em 19 de setembro de 2016.
- GONÇALVES, N.B. (Org.) **Abacaxi: pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA. Comunicação para a Transferência de Tecnologia, cap. 2, p. 13-27 (Frutas do Brasil, 5), 2000.
- JANISIEWICZ, J.W.; CONWAY, W.S. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. **Stewart Postharvest Review**. p.1- 3, 2010. doi: 10.2212/spr.2010.1.3
- JANISIEWICZ, W. J; KURTZMAN, C. P.; BUYER, J. S. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. **Yeast**. 27: 389-398, 2010.
- MATOS, A.P. Doenças do abacaxizeiro. In: FREIRE, F. das C.O.; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Ed.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.16-55, 2003.
- MELETTI, L.M.M.; SAMPAIO, A.C.; RUGGIERO, C. Avanços na Fruticultura Tropical no Brasil. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, Volume Especial, E. p. 073-075, Outubro 2011.
- NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberellafujikuroi* species complex. **Mycologia**, v.90, p.434-458, 1998.
- NOGUEIRA, S.R.; LIMA, F.S.O.; ROCHA, E.M.; ARAÚJO, D.H.M. Fungicidas no controle de fusariose do abacaxi no estado do Tocantins, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n.4, p. 447-455, 2014.
- SMILANICK, J. L.; MARGOSAN, D. A.; MLIKOTA-GABLER, F.; USALL, J., MICHAEL, I. F. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. **Plant Dis**. v. 83, p. 139–145, 1999.
- TALIBI, H.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E.H ; BEN AOUMAR, A.A. Alternative methods for the control of postharvest citru. **Journal of Applied Microbiology**. p.3-17, 2014.