

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (5)

May 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/1352020899>

Article link

<http://sea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=899&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



Análise microbiológica da cultura de laranja, manga e bergamota em meio de cultivo BDA

Microbiological analysis of the orange crop, mango and bergamot in the middle of BDA cultivation

R. Marchezan¹, A. R. Aigner¹, F. Dahmer¹, L. A. Munaretto¹, D. P. Ruppenthal¹, A. R. Nitz¹, T. Gerber²

¹ Faculdade Concórdia

² Universidade Federal de Santa Catarina

Author for correspondence: gerberthaise@gmail.com

Resumo. O presente estudo teve como finalidade verificar o desenvolvimento dos fungos e eventuais bactérias que podem ocorrer nos meios de cultivo, que são ricos em nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos, situação semelhante a que ocorre com a área de cultivo brasileira. Utilizou-se de base para a pesquisa o método BDA (batata, dextrose e ágar). Os tratamentos constituíram quatro procedimentos, onde foram desinfetadas e isoladas parte das folhas dos *citrus* laranja, manga e bergamota e parte do fruto da laranja valência, para posterior identificação de fungos e bactérias que se manifestaram após 24 horas da implantação do experimento. Concluiu-se desta forma que, os microrganismos se desenvolveram de forma satisfatória fora do seu hábitat natural.

Palavras chave: BDA, microrganismos, meio de cultivo.

Abstract. This study aimed to verify the development of fungi and any bacteria that may occur in the culture media, which are rich in nutrients needed for the development of micro-organisms, a situation similar to what happens with the area of Brazilian culture, to do so, used If the basis for the BDA search method (potato, dextrose and agar). The treatments were four procedures, which have been disinfected and isolated part of the leaves of citrus orange, mango and bergamot and part of the fruit of valencia orange, for identification of fungi and bacteria that there manifested 24 hours after implantation of the experiment. It follows therefore that the microorganisms have developed satisfactorily outside their natural habitat.

Keywords: BDA, microorganisms, the culture medium.

Introdução

Meios de cultura é o conjunto de substâncias necessárias, tendo um equilíbrio de agentes químicos e físicos que proporcionam o crescimento e multiplicação dos micro-organismos. São utilizados em três diferentes tipos de consistência: forma líquida, sólida e semissólida (Dugan et al. 1993).

O meio de cultura BDA é utilizado em laboratórios e é recomendado para o isolamento, enumeração de leveduras e bolores em alimentos. São técnicas para execução de meios de cultura, tipos dos meios empregados para o isolamento e identificação de micro-organismos (Brent, 1987). O meio de cultura BDA é um dos mais utilizados em

laboratórios. Nesse meio, a batata serve como fonte de nutrientes, a Dextrose como fonte de açúcar simples e o Ágar tem a função de solidificar o meio.

O Brasil é o maior fornecedor de mangas para o mercado europeu, representando 41% do total das importações em 2008. As mangas estão creditadas a ser o produto que mais cresce no segmento de fruta orgânica tropical (Pay, 2009), entretanto é constantemente prejudica pelo fungo *Oidium mangiferae* Bert.

É caracterizado por um pó branco (micélio) sobre as partes doentes. Os frutos afetados não crescem e podem cair antes de atingir o tamanho de uma ervilha. As perdas causadas por este patógeno podem superar os 20% (Nofal; Haggag, 2006),

havendo também diferenças de suscetibilidade entre as variedades (Ribeiro, 2005).

A clorose variegada dos citros (CVC), também conhecida como amarelinho, é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que, depois de transmitida para a planta, se multiplica e obstrui os vasos do xilema, responsáveis por levar água e nutrientes da raiz para a parte aérea. A obstrução dos vasos causa a diminuição do tamanho do fruto, podendo torná-lo inviável para o consumo (Beretta, 1990).

Esta doença é uma anormalidade observada primeiramente em pomares cítricos em meados de 1987 no Triângulo Mineiro, e das regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, de onde vem se alastrando muito rapidamente (De Negri, 1990).

Doenças em pós-colheita reduzem a quantidade e a qualidade de frutos comercializáveis e, em citros, podem provocar grandes perdas. No Brasil, dentre as doenças em pós-colheita dos citros, o bolor verde (*Penicillium digitatum*) é a principal. Seu controle é realizado com fungicidas, e isolados resistentes do patógeno são relatados (Teixidó et al. 2001), algumas vezes simultânea a mais de um fungicida (Kinay et al. 2007).

Como forma de controlar esse patógeno, vêm sendo utilizadas práticas culturais visando a reduzir o inóculo no campo, o tratamento químico, a irradiação e a termo terapia. Os tratamentos químicos são os mais utilizados, em pré e pós-colheita. No Brasil, os fungicidas do grupo dos benzimidazóis são os mais utilizados, e estes possuem várias restrições de uso, como o de selecionar estirpes resistentes dos patógenos quando usados continuamente. Alternativas visando à redução do uso de fungicidas vêm sendo pesquisadas e com resultados promissores no controle de vários fitopatógenos. Enfoque particular vem sendo dado ao controle biológico e ao uso de extratos de planta, de produtos alimentares, de aditivos de alimentos, de resíduos da produção de alimentos e de conservadores de alimentos no controle de doenças de plantas de forma geral (Sholberg & Gaunce, 1995).

A cochonilha *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) é conhecida por cochonilha-branca, cochonilha-dos-citros ou cochonilha-da-rosetado-cafeeiro. É um inseto sugador de seiva que coloniza especialmente a região do pedúnculo dos frutos, produz o "honeydew", que serve como substrato para o desenvolvimento da fumagina, acarretando a depreciação dos frutos comercializados (Gravena, 2003). Esta cochonilha apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, colonizando plantas cultivadas em condições de campo e casa de vegetação (Llorens, 1990).

Em pomares cítricos, os danos são ocasionados pela sucção contínua de seiva reduzindo o tamanho dos frutos e injetando toxinas no ato da alimentação, causando deformações e

queda de frutos novos. Em altas populações podem causar desfolhas nas plantas (Gravena, 2003).

Com este intuito este trabalho visa verificar a manifestação e proliferação de diferentes fungos de plantas frutíferas de cultivo comercial em meio de cultura BDA, com o propósito de ampliar conhecimentos sobre tais doenças.

Métodos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biotecnologia Vegetal da FACC – Faculdade Concórdia/SC.

O passo inicial das atividades foram: esterilização na autoclave (121°C / 30 minutos) das placas de petri, sendo consideradas, a base introdutória dos procedimentos, após, higienização com solução de álcool 70%, dando sequência ao trabalho com o fracionamento de exatas 20 gramas de açúcar e 12 gramas de ágar.

Para a mistura dos elementos, o recipiente utilizado foi uma proveta, na qual, fora inserido 500ml de água de batata, 500ml de água destilada, 20g de açúcar e 12g de ágar.



Figura 1: Pesagem dos materiais.

Fonte: Os autores.

Após agitação da proveta, e com a solução bem dissolvida, foi isolado exatamente 80ml da solução em erlenmeyer, esses foram tapados com algodão e lacrados com elásticos de látex, para que não ocorresse uma explosão na hora da sua ebulição, tais recipientes foram postos em sacolas plásticas e após introduzidos na autoclave para sua esterilização, a função das sacolas plásticas é apenas a de separar os recipientes.

Durante o processo de esterilização a autoclave pode atingir a temperatura de 121°C. O período necessário para conclusão do procedimento gira entorno de 30 minutos com adição de mais 20 minutos para esfriar. Subsequentemente, foram alocados cerca de 10ml dessa solução em cada placa de petri, constituído um experimento com 4 placas diferentes, foram colocados dentro da autoclave para repouso até estarem prontas, no sábado seguinte.

Os cortes nos vegetais foram realizados por um bisturi e com o auxílio de uma pinça, onde foi imergido os materiais por 2 minutos na solução de hipoclorito de sódio 2,5% e água destilada, findado o tempo, foi retirado os pedaços de folhas dessa

solução e mergulhados dentro do álcool 70%, deixando-os aí por mais dois minutos. Estes procedimentos foram feitos com cortes de folha de bergamota, folha de manga, folha de laranja valência e também o fruto da laranja valência.



Figura 2: Processo de esterilização em autoclave a 121°C por 30min.
Fonte: Os autores.

Depois do processo de imersão, os cortes das folhas foram banhados com água destilada e alojados dentro das placas de petri, juntamente com o material que foi desenvolvido no primeiro momento, tomando o cuidado de vedar em 100% com o uso de papel celofane, evitando que o material fosse contaminado com fungos e bactérias presentes no meio.

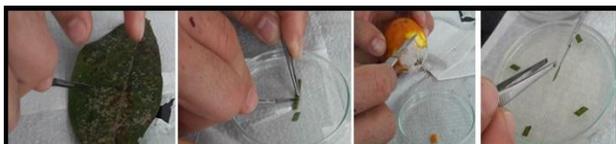


Figura 3: Processo de retirada do tecido vegetal doente.
Fonte: Os autores.

Com o processo concluído as placas de petri foram depositadas na sala de cultura, da qual, conta com um equipamento de manutenção de temperatura, vulgo ar-condicionado, que tem por função manter o ambiente da sala em constantes 25°C, sendo analisado periodicamente o desenvolvimento dos meios de cultura.

Resultados e discussões

Os resultados obtidos com os diferentes tratamentos de manifestação de doenças de plantas em meio de cultura BDA estão evidenciados na figura 04. Os tratamentos demonstram diferenças de evolução entre si, pois em cada tratamento foi testado uma doença diferente em meio de cultura BDA.

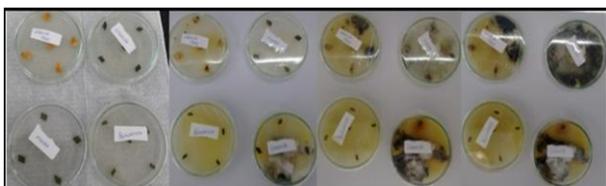


Figura 4: Evolução dos meios de cultura pelo método BDA após 14 dias. Fonte: Os autores.

No tratamento 1, foi utilizado como material vegetal folhas de manga infectada com uma doença conhecida como oídio, causado pelo fungo *Oidium mangiferae Bert*, na qual foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1914, e posteriormente, foi relatada em vários outros países (Duarte, 2003).

Neste tratamento, percebeu-se uma boa adaptação do fungo ao meio de cultura BDA, em temperatura ambiente controlada de 25°C, sendo constante em todo decorrer do experimento. O patógeno se manifestou cerca de 24 horas depois de ser inserido ao meio de cultura. Como é possível visualizar na figura 05 foi verificado um crescente aumento do fungo após 48 horas, sendo que se manifestou gradativamente de forma crescente no decorrer do teste, chegando ao último dia, já ocupando todo o espaço na placa de Petri.

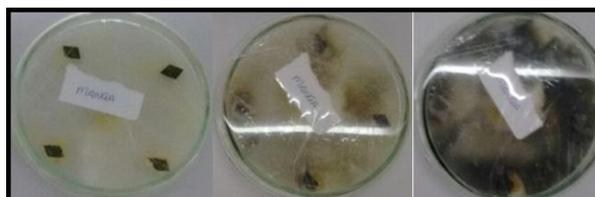


Figura 5: Tratamento com folha de Manga.
Fonte: Os autores.

O ambiente cedido no experimento demonstrou ser adequado para a o fungo *Oidium mangiferae Bert*, sendo que este se adaptou-se de forma rápida, e se manifestou de modo ágil. Segundo Standnik e Riviera (2001) os conídios não precisam de um filme de água para germinar, sua germinação dura cerca de 5 a 7 horas a 23°C e 20 % de umidade relativa do ar. O meio de cultura BDA para este fungo, demonstra ser ideal para a proliferação do mesmo, estando próximo da realidade do ambiente natural, com temperatura e nutrientes ideais para seu desenvolvimento, podendo assim, através destes dados ser estudados formas de controle deste fungo.

No segundo tratamento T2, foi trabalhado com folhas de bergamota, aonde as mesmas estavam contaminadas com a doença chamada *Clorose Variegada* dos citros, transmitida pela bactéria *Xylella fastidiosa*.

Por se tratar de uma bactéria, a sua manifestação no meio de cultura demorou mais para ocorrer em relação aos fungos, sendo constatado sua manifestação apenas 72 horas após a implantação do experimento. Além da demora para a manifestação da bactéria, também foi possível perceber que pouco se propagou, criando apenas uma pequena crosta branca ao redor da folha infectada. Isso se deve ao fato de a bactéria não se adequar ao meio de cultura, já que na natureza ela é transmitida diretamente por inúmeras espécies de cigarras, e encontram um ambiente mais propício.



Figura 6: Tratamento com folha de Bergamota.
Fonte: Os autores.

Segundo Paiva et al. (1996) altas temperaturas são condições biológicas favoráveis para propagação das espécies, como vegetação rasteira abundante, onde muitas buscam alimento.

Roberto & Yamamoto (1998) constataram que, em laranjeira em produção, as espécies *A. citrina*, *D. costalimaie* *O. facialis*, foram constantes em pomares das regiões Norte, Noroeste e Centro do estado de São Paulo, sendo que na Região Sul, as duas primeiras espécies foram acessórias.

No tratamento T3, foi trabalho com o fruto da laranja, especificamente com a doença *Penicillium digitatum*, conhecida como bolor verde. Como se verifica na figura 7, o tratamento com bolor verde, se manifestou aproximadamente 24 horas após a instalação do experimento, sendo que, se desenvolveu de forma lenta e desuniforme, como evidenciado na figura 7, entretanto, se demonstraram adaptar-se bem ao ambiente preposto.



Figura 7: Tratamento com o fruto da Laranja.
Fonte: Os autores.

Vários fatores relacionados com o fruto, o patógeno, o clima e as condições em pós-colheita determinam a incidência e a severidade das doenças (Eckert & Eaks, 1989).

Segundo Timmer et al. (2000) a elevada incidência da doença pode ser atribuída à elevada produção de esporos na superfície dos frutos, facilmente dispersos pelo ar, sendo abundantes nos pomares. Potencialmente, um único esporo de *P. digitatum* pode infectar um fruto e resultar na produção de 100 milhões de esporos, após sete dias sob condições ambientais ótimas. No entanto, esporos são capazes de germinar e crescer em temperaturas de 4 a 30°C (Plaza et al. 2003).

Desde os primórdios da agricultura há cerca de 10000 a.C. que o homem compete pelos recursos com vários grupos de organismos (animais, patogênicos e infestantes), designados coletivamente, como pragas (Oerke, 2005), aos quais se atribui a perda anual de 10-12% da produção agrícola (Samways, 1997). Desde 1945 que se tem vindo a registrar um acréscimo dramático no número de animais (principalmente insetos), infestantes e patogênicos de plantas resistentes aos pesticidas (Brent, 1987) e o uso destes terem aumentado, as perdas nas colheitas agrícolas devido às pragas não diminuíram (Oerke, 1995). Estima-se que apenas 0,1% dos pesticidas aplicados no controle de pragas atingem a praga-alvo a que se destinam (Pimentel, 1995).

Dentre vários insetos está a cochonilha-branca *Planococcus citri*, que é um inseto sugador

de seiva, que ataca a laranjeira doce, podendo ocasionar perdas à produção.

No tratamento T4, foi utilizado como material vegetal folhas de laranja doce infectada com uma doença conhecida como cochonilha-branca, causado pelo fungo *Planococcus citri*, a praga foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1938, em Pernambuco. Em 1947, sua presença foi constatada no Rio de Janeiro. Atualmente, está presente em todos os estados brasileiros. Neste tratamento percebeu-se uma boa adaptação do fungo ao meio de cultura BDA, em temperatura ambiente controlada de 25°C, sendo constante em todo decorrer do experimento. O patógeno se manifestou cerca de 24 horas depois de ser inserido ao meio de cultura. Como é possível visualizar na figura 08, foi verificado um crescente aumento do fungo após 48 horas, sendo que se manifestou gradativamente de forma crescente no decorrer do teste, chegando ao último dia, já ocupando quase todo o espaço na placa de Petri.

O ambiente cedido no experimento demonstrou ser adequado para a o fungo *Planococcus citri*, sendo que este adaptou-se de forma rápida, e se manifestou de modo rápido e ágil. O meio de cultura BDA para este fungo nos demonstra ser ideal para a proliferação do mesmo, estando próximo da realidade do ambiente natural, com temperatura e nutrientes ideais para seu desenvolvimento, podendo assim, através destes dados ser estudados formas de controle deste fungo.

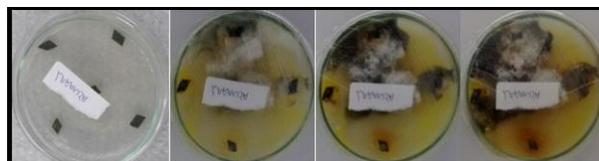


Figura 8: Tratamento com o fruto da Laranja.
Fonte: Os autores.

Conclusão

A isolamento pelo método BDA possibilitou a análise e avaliação do comportamento de três fungos e uma bactéria que se desenvolveram no meio de cultura.

Através desta análise, percebe-se que os pequenos microrganismos se desenvolvem bem fora de seu hábitat natural.

Referências

- GRAVENA, S. Cochonilha Branca: descontrolada em 2001. Laranja, v.24, n.1, p.71-82, 2003.
- LLORENS, J.M. Homoptera I – Cochinillas de los cítricos y sucontrol biológico. Valencia: Pisa Ediciones, 1990. 260p.
- SHOLBERG, P.L., GAUNCE, A.P. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent postharvest decay. Horticultural Science, Stuttgart, v. 30, p. 1271-1275, 1995.

- Dugan FM, Grove GG, Roberts JD (1993) Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *C. perennans*. I. Morphology and pathogenic behavior. *Mycologia* 85:551-564.
- PAY, E. The market for organic and fair-trade mangoes and pineapples. FAO: Rome, 2009. 23p. Disponível em: Acesso em: 01 dez. 2011.
- BERETTA, M.J.G., 1990. Relatório de viagem à Flórida. Datilografado. Instituto Biológico, S.Paulo. 6p.
- RIBEIRO, I.J.A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.457-465.
- De Negri, J.D., 1990. Clorose variegada dos Citros: uma nova anomalia afetando pomares em S.Paulo e Minas Gerais. Comunicado Técnico nº 82. Extensão Rural, Coord. Ass. Téc. Integral (CATI), Campinas, 6p.
- NOFAL, M.A.; HAGGA, W.A. Integrated management of powdery mildew of mango in Egypt. *Crop Protection*, Kidlington, v.25, p.480–486, 2006.
- TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; PALOU, L.; ASENSIO, A.; NUNES, C.; VIÑAS, I. Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, n. 7, p. 685-694, 2001.
- KINAY, P.; MANSOUR, M. F.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 647-656, 2007.
- DUARTE, M.L.R. Doenças de Plantas no Tropicó Úmido Brasileiro, Embrapa Informação e Tecnologia, Brasília, 2003.
- STADNIK, M. J; RIVIERA, M. C; Oídios, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, 2001.
- PLAZA, P.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 94, n. 4, p. 549-554, 2003.
- Paiva, P.E.B., J.L. da Silva, S. Gravena & P.T. Yamamoto. 1996. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do estado de São Paulo. *Laranja* 17: 41-54.
- Roberto, S.R. & P.T. Yamamoto. 1998. Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros. *Laranja* 19: 269-284.
- Oerke, E.-C. (2005) Centenary Review. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 1-13.
- Samways, M.J. (1997) Classical Biological Control and biodiversity conservation: what risks are we prepared to accept? *Biodiversity and Conservation* 6, 1309-1316.
- Brent, K.J. (1987) Fungicide resistance in crops-its practical significance and management. In: *Biological Control*. Chapman & Hall. 539pp.