



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
ÁREA DE FITOSSANIDADE
LABORATÓRIO DE FITOBACTERIOLOGIA



RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

USO DE LEVEDURAS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO DA ESCAMA EM CEBOLA

Relatório de Estágio Supervisionado
Obrigatório vinculado ao Curso de Bacharelado
em Agronomia da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como requisito para a obtenção
do Título de Bacharel em Agronomia.

Aluna: Bárbara Gomes Ribeiro

Orientador: Marco Aurélio Siqueira da Gama

Recife, PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

R484u Ribeiro, Barbara Gomes
 Uso de leveduras para o controle da podridão da escama em
cebola / Barbara Gomes Ribeiro. – 2018.
 13 f. : il.

 Orientador: Marco Aurélio Siqueira da Gama.
 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife,
BR-PE, 2018.
 Inclui referências e apêndice(s).

 1. Cebola 2. Leveduras 3. Controle biológico 4. Podridão
I. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, orient. II. Título

CDD 631

Sumário

1. Resumo	4
2. Introdução	5
3. Material e métodos	7
3.1. Obtenção dos isolados e cultivo de <i>Burkholderia</i> e leveduras.	7
3.2. Proteção dos bulbos com leveduras.....	7
3.3. Análise estatística	8
4. Resultados e discussão	8
5. Conclusões.....	10
6. Referências bibliográficas	11

USO DE LEVEDURAS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO DA ESCAMA EM CEBOLA

1. Resumo

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma das hortaliças mais produzidas no mundo. No Brasil, a cebolicultura representa uma atividade agrícola de grande importância socioeconômica e atingiu, em 2017, uma produção de 1.726.600 toneladas de bulbos. Essa cultura pode ser acometida por diversas doenças, como a podridão das escamas. Seu manejo é desafiador, pois a doença é causada por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*, que possuem ampla distribuição e são naturalmente encontradas na rizosfera da cultura. Dessa forma, objetivou-se por meio deste estudo avaliar o controle biológico de *B. cenocepacia* com leveduras em tratamento pós-colheita dos bulbos de cebola. Foram utilizados neste estudo cinco isolados de leveduras (LMS, LMA, CC-2, CC-5 e CA-6) e três isolados de *B. cenocepacia* com diferentes níveis de agressividade, todos encontram-se depositados na Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE. Os bulbos de cebola foram perfurados com alfinete entomológico e tratados com suspensões de leveduras à concentração de $1,5 \times 10^8$ cel mL⁻¹ separadamente até o ponto de escoamento. Após 24h do tratamento, realizou-se a inoculação com a deposição de 20µL de suspensão bacteriana à $0,54 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ sobre a perfuração, incubando-se com câmara úmida a temperatura ambiente (25° C±2) por 48.h. Os bulbos foram avaliados quanto ao período de incubação (PI) e a severidade (SE) nos períodos de 24h e 48h após a inoculação. O período de incubação variou entre 2 à 3 horas e todos os tratamentos com leveduras atuaram no controle da severidade da doença nas primeiras 24h, o melhor o tratamento foi a levedura CA-6, porém os resultados não se mantiveram em 48h. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o controle biológico com leveduras possui eficiência no controle da severidade da doença apenas nas primeiras 24h após inoculação de *B. cenocepacia*.

Palavras-chave: Cebola, Podridão das escamas, Controle biológico, Leveduras.

2. Introdução

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma espécie bienal, com fase vegetativa e a produção de bulbos no primeiro ano, e fase reprodutiva no segundo ano, é uma planta herbácea da família Alliaceae, parente de outras importantes hortaliças cultivadas como o alho (*A. sativum*) e a cebolinha (*A. schoenoprasum*), sendo cultivada desde 3 000 a.C. e é uma das hortaliças mais produzidas e no mundo (COSTA et al., 2002; EADY, 1995)

No ano de 2016 a produção mundial de cebola atingiu 93 milhões de toneladas, os maiores produtores são a China, Índia, Egito e Estados Unidos (FAO, 2016). No Brasil a cultura da cebola representa uma atividade agrícola de grande importância socioeconômica, e atingiu em 2017 uma produção de 1 726 600 toneladas, onde os maiores estados produtores foram Santa Catarina, Bahia e Minas Gerais (COSTA et al., 2002; IBGE, 2017).

A nível regional, o Nordeste apresenta a terceira maior produção de cebola do país (IBGE, 2017). O seu cultivo foi introduzido no Vale do São Francisco na década de 40 onde expandiu-se para as margens do Rio São Francisco, abrangendo os Estados da Bahia e Pernambuco (COSTA et al., 2002). A região Nordeste é a única região brasileira capaz de ofertar o produto durante todos os meses do ano devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura, permitindo que os produtores programem suas safras para os meses de menor oferta no mercado interno das regiões Sul e Sudeste, e consequentemente, atingem melhores preços de mercado (ARAÚJO; CORREIA, 2007).

A cultura da cebola é atingida por diversas doenças, incluindo as de origem bacteriana, como a podridão das escamas. Esta doença é caracterizada pelo apodrecimento dos catafilos mais externos, adquirindo aparência úmida, amarelada e odor avinagrado, causada por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (JACCOUD FILHO et al., 1987). O gênero *Burkholderia* pertence ao filo Proteobacteria, classe Burkholderiales e família Burkholderiaceae, é composto por bactérias gram negativas, aeróbicas e monotríquias (KADO, 2010)

O complexo é composto por 21 diferentes espécies, porém intimamente relacionadas a *B. cepacia* (MARTINA et al., 2018; VANLAERE et al., 2009). Essas bactérias possuem faixa de temperatura ótima de desenvolvimento 30-35°C, apresentam distribuição generalizada e também são encontradas como patógenos humanos oportunistas, são

naturalmente encontradas na rizosfera de cebola e no solo dos campos de cultivo, podendo gerar perdas de até 50% na comercialização dos bulbos (JACOBS et al.; 2008; MISHRA et al. 2014).

As medidas de controle para fitobacterioses baseiam-se na prevenção da doença ou de condições favoráveis à sua ocorrência (SANTOS et al., 2016). No caso da podridão das escamas dentre as medidas de maior impacto encontra-se o uso de material propagativo sadio, evitar ferimentos, o manejo da irrigação e a escolha do método de irrigação, os maiores índices de ocorrência desta doença são encontrados no sistema por aspersão (MISHRA et al., 2014; SANTOS et al., 2016; TEVIOTDALE et al., 1989).

Uma das alternativas no controle de fitobacterioses é o controle biológico, ele consiste na utilização intencional de organismos vivos introduzidos ou já residentes, para suprimir as atividades e populações de um ou mais patógenos de plantas (PAL et al., 2006; SANTOS et al., 2016). Isso pode envolver o uso de inoculantes microbianos, ou o gerenciamento de solos para promover as atividades combinadas de organismos nativos associados ao solo e às plantas que contribuem para a supressão geral (PAL et al., 2006). Estudos revelam resultados promissores no controle biológico da podridão mole em couve-chinesa (MELLO et al., 2011) e de *Acidovorax citrulli* na cultura do melão com o uso de leveduras (MELO et al., 2015).

O manejo da podridão das escamas da cebola é desafiador, uma vez que é causada por um complexo de espécies de ampla distribuição e naturalmente encontrado no rizosfera da cultura, e não existem defensivos agrícolas registrados (AGROFIT, 2018). Desta forma o controle biológico pode ser uma importante ferramenta no manejo desta doença. As leveduras surgem como uma classe de microrganismos estudada no controle biológico, elas fazem parte do ambiente de uma maneira geral, e atuam no controle de doenças de plantas como agentes protetores de infecções (CASTORIA et al., 1997; EL- TARABILY, 2004; VALDEBENITO - SANHUEZA et. al., 2000) Assim, objetivou-se por meio deste estudo avaliar o controle biológico da podridão das escamas da cebola causada por isolados de *B. cenocepacia* por meio de leveduras.

3. Material e métodos

3.1. Obtenção dos isolados e cultivo de *Burkholderia* e leveduras.

Três isolados de *Burkholderia cenocepacia* foram obtidos na Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE. Os isolados CCRMBC38, CCRMBC46 e CCRMBC11 foram selecionados após teste de agressividade, como representantes de alta, intermediária e baixa agressividade respectivamente. O patógeno foi cultivado em meio NYDA (10g de dextrose, 3 g de extrato de carne, 5 g de extrato de levedura, 5g de peptona, 18 g de ágar e 1000 mL de água destilada) e incubado por 36h à 28°C. Os inócuos foram preparados suspendendo-se o crescimento bacteriano em água destilada esterilizada (ADE) e ajustados com auxílio de fotocolorímetro para a concentração equivalente à $0,54 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Foram utilizados neste estudo cinco isolados de leveduras (LMS, LMA1, CC-2, CC-5 e CA-6) depositados na Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE. As leveduras foram cultivadas em meio SDA (40g de dextrose, 10g de neopeptona, 17g de ágar e 1000mL de água) suplementado com 1,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 50 mg.L⁻¹ incubadas por 48h à 28°C. As suspensões de leveduras foram preparadas com ADE e ajustadas à concentração de $1,5 \times 10^8$ cel.mL⁻¹ usando câmara de Neubauer.

3.2. Proteção dos bulbos com leveduras

Bulbos de cebola foram lavados em água corrente, retirados os catafilos secos e após secagem em temperatura ambiente eles foram perfurados com alfinete entomológico e tratados com suspensões de leveduras separadamente, até o ponto de escorrimento. Após 24h do tratamento, realizou-se a inoculação com a deposição de 20µL de suspensão bacteriana sobre a perfuração, incubando-se com câmara úmida a temperatura ambiente (25° C±2) por 48h.

Foram avaliados o período de incubação (PI), calculado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença, e a severidade (SE), estimada pela medição das lesões com auxílio de um paquímetro nos períodos de 24h e 48h após a inoculação com o patógeno.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial duplo (cinco leveduras e três isolados de *B. cenocepacia*), com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por dois bulbos, contendo um ponto de inoculação em cada bulbo.

3.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Diferença Mínima Significativa (DMS) ($P \leq 0.05$). As análises foram realizadas com auxílio do programa AgroStat - (FCAV - UNESP)

4. Resultados e Discussão

O período de incubação variou de 2 a 3 horas nos tratamentos e testemunha. A análise estatística mostrou que não houve interação entre os isolados de *B. cenocepacia* e os tratamentos com leveduras as 24 e 48 h.

A severidade avaliada as 24 h após inoculação (Tabela 1) mostrou que o tratamento mais eficiente foi com a levedura CA-6, os demais tratamentos não diferiram entre si, porém apresentaram severidade inferior a testemunha. Durante as primeiras 24h todos os tratamentos atuaram na redução de severidade da doença. Entretanto, o resultado não se manteve após 48h de inoculação, quando o tratamento com a levedura CA-6 apresentou severidade superior à da testemunha, e os demais tratamentos apresentaram severidade igual a testemunha (Tabela 1) (Figura 1).

É sabido que competição por espaço e nutrientes é o principal mecanismo de ação das leveduras no controle biológico (DROBY et al., 1992; ARRAS et al., 1998). Os antagonistas microbianos absorvem nutrientes mais rapidamente do que patógenos, estabelecem-se e inibem a fase de germinação do patógeno no local da ferida (SHARMA et al., 2009).

A colonização das leveduras neste estudo foi facilitada pela realização de ferimento com alfinete entomológico nos bulbos no momento da pulverização dos tratamentos. Assim, esperava-se que o tecido ferido fosse facilmente colonizado pelas leveduras, protegendo os bulbos da ação da bactéria, o que foi percebido somente durante as primeiras 24h após

inoculação. Bactérias do complexo *B. cepacia* são encontradas na rizosfera da cebola, diferentemente das leveduras utilizadas neste experimento (não isoladas de bulbos de cebola), acredita-se que os resultados obtidos foram originados de uma natural vantagem que estas bactérias possuem no ambiente de competição com o agente antagonista utilizado.

Tabela 1. Severidade avaliada as 24h e 48h após inoculação de *B. cenocepacia*

Tratamento	Severidade*			
	24h		48h	
CA-6	6,33	c	17,22	a
CC-5	9,12	b	13,97	ab
LMS	8,60	b	12,41	bc
CC-2	8,24	b	12,39	bc
LMA1	8,21	b	9,57	c
Testemunha	11,26	a	12,06	bc
DMS (5%)	1,87		3,71	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Diferença Mínima Significativa à 5%

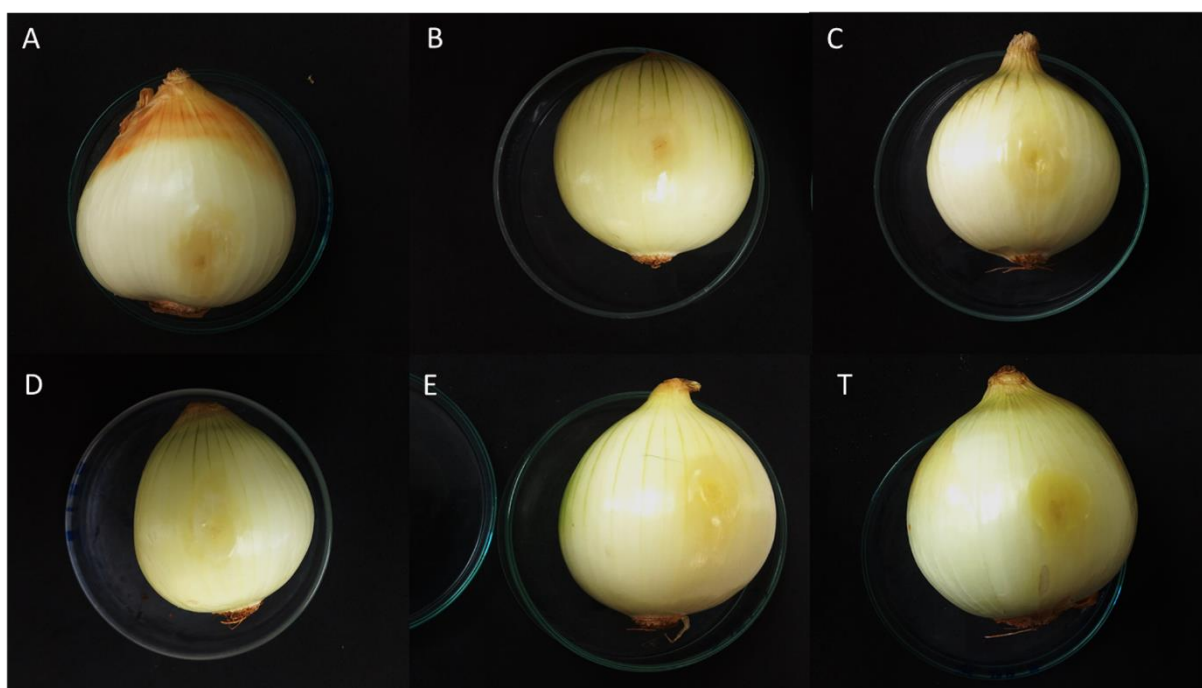


Figura 1. Bulbos de cebola após 48h de inoculação de *B. cenocepacia*. A- bulbo tratado 24h antes da inoculação com suspensão de levedura CC-5; B- bulbo tratado com levedura CA-6; C- bulbo tratado com levedura CC-2, D- bulbo tratado com levedura LMA; E- bulbo tratado com levedura LMS e T- testemunha, bulbo não tratado com levedura.

5. Conclusões

Os resultados obtidos com o uso de leveduras para o controle biológico da podridão das escamas em cebola revelaram a eficiência no controle da severidade da doença apenas nas primeiras 24h após a inoculação de *B. cenocepacia*.

6. Referências Bibliográficas

AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 21 jul. 2018.

ARRAS, G., DE-CICCO, V., ARRU, S., LIMA, G. Biocontrol by yeasts of blue mold of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 413–418, 1998.

BACH, E.; SANT'ANNA, F.H.; PASSOS, J.F.M.; BALSANELLI, E.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.D.; SOUZA, E.M.; PASSAGLIA, L.M.P. Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp nov. **Pathog Dis.**, v.75, n. 6, p. 1-8, 2017.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCO, V. β -1,3- glucanase activity of two saprophytic yeas and possible mode of actions as biocontrole agentes against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p. 293- 300, 1997.

COENYE, T., VANDAMME, P., GOVAN, J.R.W., LIPUMA, J.J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **J Clin Microbiol**, v.39, p.3427–3436, 2001.

COSTA, N. D.; QUEIROZ, M. A.; ARAÚJO, J. C.; SANTOS, C. A. F.; FARIA, C. M. B.; HAJI, F. N. P.; TAVARES, S. C. C. H. **A cultura da cebola**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 107 p. (Coleção Plantar, 45).

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. **Phytoparasitica**, v. 20, p.1495–1503, 1992.

EADY C. C. Towards the transformation of onions (*Allium cepa*) .**New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 23, p. 239-250, 1995.

EL-TARABILY, K. A. Supression of *Rhizoctonia solani* disease of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n.1, p. 69-75, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics division**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 21 jul. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Levantamento Sistemático Da Produção**. Rio De Janeiro, 86 P., 2017.

JACCOUD FILHO, D. de S.; ROMEIRO, R.S.; KIMURA, O.; ZAMBOLIM, L.; SOUZA, R.M. de. Podridão bacteriana da escama – uma nova doença da cebola em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.4, p.395-396, 1987.

JACOBS, J. L.; FASI, A. C.; RAMETTE, A.; SMITH, J. J.; HAMMERSCHMIDT, R.; SUDIN, G.W.. Identification and onion Pathogenicity of *Burkholderia cepacia* Complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p.3121-3129, 2008.

MARTINA, P.; LEGUIZAMON, M.; PRIETO, CI.; SOUSA, S.A.; MONTANARO, P.; DRAGHI, W.O.; STÄMMLER, M.; BETTIOL, M; CARVALHO, C.C.C.R.; PALAU, J.; FIGOLI, C.; ALVAREZ, F.; BENETTI, S; LEJONA, S.; VESCINA, C.; FERRERAS, J.; LASCH P.; LAGARES, A.; ZORREGUIETA, A.; LEITÃO, J.H.; YANTORNO, O.M.; BOSCH, A. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 14-20, 2017.

MELLO, M. R. F.; SILVEIRA, E. B.; VIANA, I. O.; GUERRA, M. L.; MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 78-83, 2011.

MELO, E. A.; MARIANO, R. L. R.; LARANJEIRA, D.; SANTOS, L. A.; GUSMÃO, L. O.; SOUZA, E. B. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 56-64, 2015.

MISHRA, R. K., JAISWAL, R. K.; KUMAR, D.; SAABALE, P. R.; SINGH, A. Management of major diseases and insect pests of onion and garlic: A comprehensive review. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 6, n. 11, p. 160-170, 2014.

PAL, K. K. AND. GARDENER, B.M. G. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**. 2006

SANTOS, K.M.; LOPES, U.P.; NICOLI, A.; GAMA; M.A.S. Manejo de Fitobacterioses. In: GAMA; M.A.S, NICOLI, A.; GUIMARÃES, L.M.P. ; MICHEREFF, S.J. (ed). **O Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais**. Recife : EDUFRPE, p. 137-158, 2016.

SHARMA, R.R.; SINGH,D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v. 50, p. 205–221, 2009.

TEVIOTDALE, B. L.; DAVIS, R. M.; GUERARD, J. P.; HARPER, D. H. Effect of irrigation management on sour skin of onion. **Plant Disease**,v.73,n..10, p.819-822, 1989.

VALDEBENITO - SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 41-55, 2000.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA J.J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K. a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, p.102–111, 2009.