

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DA PODRIDÃO PEDUNCULAR EM MAMÃO¹

Inoculation methodology's of papaya fruits with fungi causing stem-end-rot

Flávia Andrea Nery-Silva², José da Cruz Machado³, Mário Lúcio Vilela de Resende³, Luiz Carlos de Oliveira Lima⁴

RESUMO

A podridão peduncular, uma das principais doenças associadas à pós-colheita do mamão (*Carica papaya* L.), tem sido pouco investigada no que se refere a aspectos ecológicos e epidemiológicos nas condições brasileiras. Para que estudos sejam conduzidos nas referidas áreas é necessário que se disponham, *a priori*, de metodologias adequadas que permitam a reprodução dos sintomas dessa doença em condições de laboratório. No presente trabalho, o objetivo foi estabelecer um método de inoculação de frutos de mamão com o intuito de se reproduzir os sintomas da podridão peduncular, por meio de três procedimentos: 1) corte do pedúnculo seguido por deposição de um disco de micélio do fungo; 2) deposição de suspensão de conídios na região do pedúnculo, seguido por ferimento, e 3) aplicação de suspensão de conídios na região peduncular sem ferimento. Foram utilizados os fungos: *Phoma caricae-papayae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*, sendo os frutos inoculados, submetidos a temperaturas de 20 e 25°C. Os resultados indicaram que não houve efeito das temperaturas testadas no desenvolvimento dos fungos, nos diferentes métodos de inoculação. A maior severidade da podridão peduncular (notas de 1 a 5) foi observada em frutos inoculados pelo método de injeção no pedúnculo, independente do patógeno utilizado. Os fungos *C. gloeosporioides* e *P. caricae-papayae* foram os que apresentaram as maiores médias de severidade da doença seguido por *B. theobromae* e *F. solani*.

Termos para indexação: *Carica papaya*, pós-colheita, podridão peduncular, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma caricae-papayae*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*.

ABSTRACT

The stem-end-rot, one of the major post-harvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.), has not been very well investigated concerning ecological and epidemiological aspects of the Brazilian conditions. So that studies can be developed in the referred to areas, it is necessary to use the right methodologies that allow the reproduction of the symptoms of this disease in laboratory conditions. This study aimed to establish a method for inoculating papaya fruits to reproduce the symptoms of the stem-end-rot through tree procedures: 1) cut of the stem followed by deposition of fungal mycelium in agar discs; 2) deposition of the spore suspension into the stem's region followed by injuries, and 3) application of spore suspension in the stem's region without injuries. The inoculation was performed with the fungi *P. caricae-papayae*, *C. gloeosporioides*, *B. theobromae* e *F. solani*, and inoculated fruits were placed under temperatures of 20° and 25°C. The results indicate that there were no effects of the tested temperatures in the development of all fungi, in the different methods of inoculation. The highest severity of stem-end-rot (score 1-5) was observed in fruits inoculated by the methods of injection in the stem, independent of the fungus used. The fungi *C. gloeosporioides* and *P. carica-papaya* presented the highest levels of severity in the disease followed by *B. theobromae* and *F. solani*.

Index terms: *Carica papaya*, postharvest, stem-end-rot, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma caricae-papayae*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*.

(Recebido em 21 de dezembro de 2005 e aprovado em 16 de outubro de 2006)

INTRODUÇÃO

Dentre as frutas que são exportadas pelo Brasil, o mamão (*Carica papaya* L.) é um dos destaques, chegando a uma produção anual em 2004 estimada em 1.600.000 toneladas métricas (FAO, 2005). As doenças na fase de pós-colheita constituem o principal fator limitante ao aumento da produção e exportação desta espécie. As exigências do mercado externo, e ultimamente também do

mercado interno, estão cada vez mais evidentes, e características de aceitação do produto como aparência, aroma e sabor não são mais os únicos requisitos para se garantir a aceitação nesses mercados. Atualmente, aspectos como ausência de podridões e baixo nível de resíduos de agrotóxicos, tanto aqueles aplicados na fase pré como em pós-colheita, são importantes também na avaliação da qualidade do mamão.

¹Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor.

²Professora, MSc. em Fitopatologia, Universidade Estadual de Goiás/UEG – UnU Ipameri – Rodovia GO 330, Km 241 – 75780-000 – Ipameri, GO – Doutoranda em Fitotecnia – Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia/UFU – flavia.nery@ueg.br

³Professor, PhD em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia/DFP da Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx.P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – machado@ufla.br; mlucio@ufla.br

⁴Professor, DSc. Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos/DCA da Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – lcolima@ufla.br

A podridão peduncular é causada por um complexo de fungos, que podem provocar grandes prejuízos na pós-colheita de frutos de mamoeiro. Primeiramente, essa doença era atribuída somente ao fungo *Ascochyta* sp. (*Phoma caricae-papayae*) e *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo posteriormente, incluídos outros gêneros como *Botryodiplodia*, *Phomopsis* e ocasionalmente *Fusarium*, além de *Alternaria alternata*, sendo que todos já foram identificados nos tecidos doentes (GAYET et al., 1995).

Dentre os agentes etiológicos relacionados à podridão peduncular, *C. gloeosporioides* parece ser o de maior incidência, seguido por *P. caricae-papayae* (BOLKAN et al., 1976; LIBERATO & TATAGIBA, 2001).

A ocorrência desses patógenos no complexo da podridão peduncular foi observada no Brasil em levantamento realizado por Dantas et al. (2003) que também consideraram a podridão peduncular a principal doença observada na fase de comercialização de frutos de mamão na Central de Abastecimento do Recife (CEASA), acometendo cerca de 39,71% dos frutos ao longo de 6 meses de avaliações.

De modo geral, as doenças de pós-colheita são originadas no campo, ainda na fase de produção dos frutos (DICKMAN & ALVAREZ, 1983), e seu inóculo permanece no fruto até as etapas finais da pós-colheita. Desta forma, a origem da podridão peduncular em pós-colheita do mamão poderia ser atribuída aos conídios presentes na região peduncular, que no momento da colheita, podem penetrar pelo tecido ferido pela quebra do pedúnculo ou, a partir de infecções quiescentes onde o desenvolvimento do patógeno é inibido por condições fisiológicas impostas pelo hospedeiro até o início da maturação do fruto.

Assim, os conídios no ambiente sob condição de alta umidade no momento da colheita, além do tempo em que o fruto permanece no campo após a colheita, tornam-se importantes fatores a influenciar na intensidade de podridão peduncular desenvolvendo em superfícies injuriadas (HUNTER & BUDDENHAGEN, 1972).

A inexistência de cultivares comerciais resistentes à antracnose e à podridão peduncular, causadas principalmente por *C. gloeosporioides*, dificulta o controle da podridão peduncular e vários estudos sobre a eficácia de fungicidas têm sido realizados objetivando minimizar os prejuízos causados por essas doenças, sejam em condições de pré ou pós-colheita (ALVAREZ et al., 1977; ALVAREZ & NISHIJIMA, 1987; LIBERATO & TATAGIBA, 2001; NERY-SILVA et al., 2001).

Para que estudos sobre a podridão peduncular na fase de pós-colheita sejam conduzidos, torna-se necessário

o estabelecimento de metodologias seguras de inoculação dos agentes envolvidos no complexo dessa doença, de forma a reproduzir seus sintomas, tornando-se assim uma ferramenta auxiliar para o entendimento da participação de cada fungo no complexo da doença, de seus aspectos de patogenicidade e interação com outros agentes, como, por exemplo, a temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Isolamentos de fungos foram realizados a partir de lesões pedunculares de frutos de mamão obtidos de Linhares-ES, Janaúba-MG e Manaus-AM; sendo obtidas culturas puras das espécies *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *P. caricae-papayae*. Foi adicionado ao trabalho um isolado de *B. theobromae* pertencente à Micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os isolados utilizados nos ensaios foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar), incubados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. Após um período de 6 dias, foram preparadas suspensões, para cada espécie fúngica, na concentração de $1,7 \times 10^5$ conídios/mL.

Para os ensaios, foram utilizados frutos de mamoeiro (*Carica papaya*), cultivar Improved Sunrise Solo Line 72/12 (ISS 72/12), no terceiro estágio de maturação, obtidos de pomar comercial pertencente à Empresa Caliman Agrícola S/A, Linhares-ES. Após a colheita, os frutos foram lavados, submetidos à desinfestação com hipoclorito de sódio (0,5%), e selecionados. Em seguida, os frutos receberam tratamento hidrotérmico (48°C por 20 minutos), conforme recomendado por Akamine & Arisumi (1953), resfriados a 20°C , secos ao ar, embalados e transportados ao Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia (UFLA), onde os frutos foram armazenados em câmara fria a 15°C durante a condução dos ensaios.

No ensaio de inoculação os frutos foram acondicionados em copos plásticos, com a região peduncular voltada para cima, e separados de acordo com os métodos de inoculação testados. Esses procedimentos foram realizados em separado, para as quatro espécies fúngicas citadas anteriormente.

Os tratamentos consistiram em: a) Corte do Pedúnculo (M1) – para o caso de frutos colhidos com esta estrutura, por meio de corte, sobre o qual foi colocado um disco de ágar de 5 mm com micélio, retirado da margem de

colônias com 5 a 7 dias de crescimento, e testemunha onde, no local do corte, foi adicionado um disco de BDA de 5 mm sem micélio fúngico (Figura 1a e 1b); b) Deposição de gotas do inóculo na região peduncular seguido de ferimento (M2) – neste caso utilizou-se uma seringa hipodérmica, para a deposição de 1 gota de suspensão de conídios em 4 pontos equidistantes na região do pedúnculo seguido por ferimentos com a ponta da agulha, e a testemunha, onde o procedimento foi repetido utilizando-se água destilada esterilizada (Figura 1c); c) Deposição de gotas do inóculo na ausência de ferimentos (M3) – foram depositadas na região do pedúnculo, 4 gotas de suspensão de conídios, em pontos equidistantes, na ausência de ferimento, e com testemunha com deposição de gotas de água destilada esterilizada, também na ausência de ferimentos (Figura 1d).

Realizada a inoculação, a região peduncular de cada fruto foi submetida à câmara úmida, por meio de copos de plásticos descartáveis e perfurados no fundo, no qual foi colocado um pedaço de gaze, de 5 cm² aproximadamente, umedecida com água destilada esterilizada. O copo foi fixado sobre a região do pedúnculo, com auxílio de uma fita adesiva na superfície do fruto. A câmara úmida foi desfeita após 48 horas da inoculação, sendo os frutos armazenados à temperatura de 20±2°C e de 25±2°C, com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do ensaio foi realizada aos 7 dias de inoculação, onde foram atribuídas notas aos sintomas da podridão peduncular, de acordo com a escala de notas da

severidade da doença sugerida de acordo com ensaios preliminares realizados com estes mesmos isolados e em frutos de mamão da mesma variedade e no mesmo estágio de maturação (Figura 2A e 2B).

A escala de severidade da doença foi definida em: 1- Ausência de sintomas da podridão peduncular, 2- Presença de pequenas pontuações (até 3 mm), aquosas superficiais na região do pedúnculo, 3- Presença de lesões aquosas ou mumificadas, não coalescentes, abrangendo maior área em torno do pedúnculo, 4- Presença de lesões coalescentes, com aspecto translúcido ou mumificado, limitando-se à região peduncular, e 5- Lesões semelhantes às descritas para a nota 4, abrangendo maior extensão na polpa do fruto, podendo chegar até a cavidade das sementes, com o tecido dessa região podendo apresentar excessivo amaciamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento, sendo o experimento montado em esquema fatorial, 4 x 2 x 3, sendo 4 espécies fúngicas, 2 temperaturas e 3 métodos de inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as temperaturas utilizadas para o armazenamento dos frutos (20°C e 25°C), não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, havendo um desenvolvimento dos sintomas nos mesmos períodos, independentemente das temperaturas utilizadas.

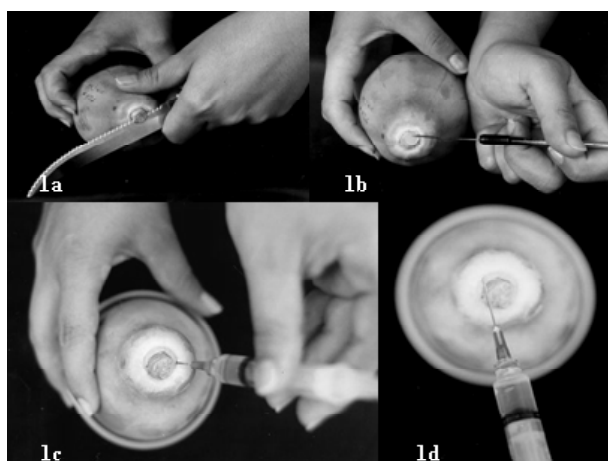


FIGURA 1 – 1a corte do pedúnculo e 1b deposição do disco de micélio (M1), 1c deposição de suspensão de esporos seguida por ferimento (M2), e 1d deposição da suspensão de esporos na ausência de ferimentos (M3).

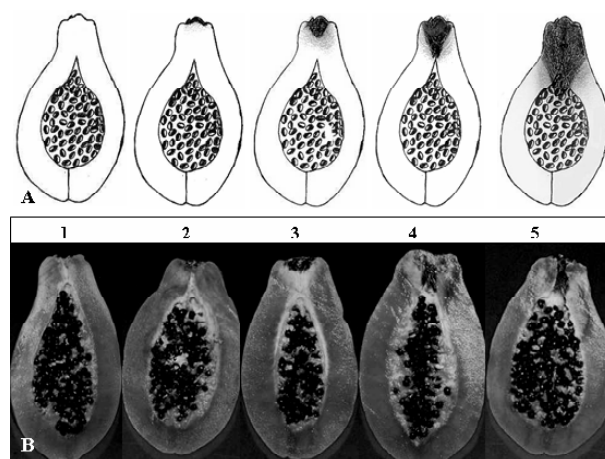


FIGURA 2 – Escala de notas de sintomas em frutos de mamão inoculados com agentes da podridão peduncular. Notas de 1 a 5. 2A: escala diagramática em desenho. 2B: escala diagramática em material vegetal.

O método de inoculação M2 (deposição de suspensão de esporos na região do corte peduncular seguida por fermento), foi o que apresentou as maiores notas quanto à severidade da doença, fato observado para todos os fungos utilizados no ensaio (Tabela 1). A ocorrência de sintomas nas testemunhas de todos os métodos testados (M1, M2 e M3), deve-se às infecções quiescentes, que muito provavelmente ocorreram no campo e se encontravam em estado latente nos frutos.

O método de inoculação por deposição de suspensão de conídios seguida por fermento (M2), foi o mais eficiente para *F. solani*, apresentando maior nota de sintomas no pedúnculo e diferindo estatisticamente dos outros dois métodos. Apesar do fungo *F. solani* estar sempre associado ao complexo da podridão peduncular, este proporcionou menor severidade de doença, igualando-se às testemunhas, nos três métodos de inoculação testados.

Questionamentos a respeito da participação de espécies do gênero *Fusarium* na podridão peduncular são feitos por vários autores. Couey & Farias (1979) e Hunter & Buddenhagen (1972), relataram a existência de algumas infecções causadas por *Fusarium* sp. na região onde ocorre o corte do pedúnculo no momento da colheita, e as denominaram de podridão do pedúnculo ("stem rot") e não de podridão peduncular ("stem-end rot"), por diferirem em relação à severidade da doença.

A metodologia de inoculação M3, realizada na ausência de fermento, distinguiu estatisticamente o fungo *C. gloeosporioides* dos demais agentes causadores da podridão peduncular. Os conídios desse fungo são conhecidos por produzir a enzima cutinase, que rompe a cutícula de vegetais promovendo assim a penetração desse patógeno na ausência de ferimentos.

De acordo com Pascholati (1995), dentre os fitopatógenos em potencial, os fungos que penetram por meio da superfície intacta da planta mostram-se aptos para degradar enzimaticamente essa barreira pela produção de cutinases, o que se constitui, para alguns, em fator-chave na patogenicidade, como é o caso de *C. gloeosporioides*.

Dickman et al. (1982) observaram que *C. gloeosporioides* penetra os frutos de mamão dissolvendo as barreiras da casca do fruto pela ação da cutinase. A ação dessa enzima foi também observada por Dickman & Patil (1988) que, trabalhando com mutantes de *C. gloeosporioides* que necessitavam de ferimentos para a penetração em frutos de mamão, observaram que na presença de cutinase exógena colocada na superfície do fruto, esses isolados conseguiam penetrar sem a necessidade de ferimentos.

O método de inoculação M2 mostrou-se altamente eficiente na caracterização da podridão peduncular para o fungo *B. theobromae*, sendo que nesse método a média das notas de severidade foi máxima. Para *P. caricae-papayae* foram observadas notas máximas para os métodos M1 e M2, mostrando uma alta agressividade desse fungo quando associado a algum estresse causado no fruto, como, por exemplo, a própria metodologia de inoculação testada.

O aspecto da lesão causada pelos diferentes fungos testados foi diferenciado com relação à fonte de inóculo. Para *C. gloeosporioides* e *F. solani*, observou-se que, quando a fonte de inóculo era proveniente de conídios, a lesão apresentava-se com uma característica aquosa e o tecido translúcido de coloração muito próxima à normal, enquanto que para fonte de inóculo proveniente de micélio, a lesão apresentava um aspecto ressecado e de coloração negra. Para *P. caricae-papayae*, observou-se externamente

TABELA 1 – Médias das notas de severidade (escala de 1 a 5) atribuídas a frutos de mamão inoculados com agentes causadores da podridão peduncular.

Fungos	Métodos de Inoculação		
	M1	M2	M3
Testemunha	1.33aA	1.33aA	1.17aA
<i>F. solani</i>	1.75aAB	2.08aB	1.25aA
<i>B. theobromae</i>	1.83aA	5.00bB	1.83aA
<i>P. caricae-papayae</i>	5.00bB	5.00bB	1.58aA
<i>C. gloeosporioides</i>	4.41bB	4.50bB	2.66bA

* médias seguidas de mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

na região peduncular a presença de uma lesão negra mumificada e com uma grande produção de conídios, enquanto que para *B. theobromae* a lesão apresentava grande quantidade de micélio aéreo.

A podridão peduncular de frutos de mamão é atribuída a um complexo de agentes etiológicos (ALVAREZ & NISHIJIMA, 1987; DANTAS et al., 2003; GAYET et al., 1995) e a metodologia de inoculação desses agentes causais deve ser capaz de reproduzir o mais próximo possível os aspectos da doença. No presente ensaio, o método de inoculação que consiste na deposição de gotas de suspensão de conídios na região próxima ao pedúnculo, seguida de ferimento por agulha hipodérmica apresentou a melhor reprodução dos sintomas da doença para os fungos testados, tomando-se como padrão de avaliação a escala de notas sugerida para a caracterização dos sintomas.

CONCLUSÕES

Todas as metodologias propostas neste trabalho, assim como a escala de severidade da doença sugerida, mostraram-se eficazes na reprodução dos sintomas da podridão peduncular em condições de laboratório e podem, por conseguinte, ser recomendadas em trabalhos futuros que tenham por objetivo obter informações como grau de resistência de frutos, efeitos de fatores ambientais no desenvolvimento da infecção e avaliação de medidas de controle.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Caliman Agrícola, pelo fornecimento dos frutos de mamão para a realização dos ensaios e a CAPES, pelo apoio na forma de bolsa de estudos ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMINE, E. K.; ARISUMI, T. Control of post-harvest storage decay of fruits of papaya (*Carica papaya* L.) with special reference to their effect of hot water. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Lancaster, n. 61, p. 270-274, 1953.
- ALVAREZ, A. M.; HYLIN, J. W.; OGATA, J. N. Post harvest diseases of papaya reduced by biweekly orchard sprays. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 61, n. 10, p. 731-735, Oct. 1977.
- ALVAREZ, A. M.; NISHIJIMA, W. T. Post harvest diseases of papaya. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, n. 8, p. 681-686, Aug. 1987.
- BOLKAN, H. A.; CUPERTINO, F. P.; DIANESE, J. C.; TAKATSU, A. Fungi associated with pre and post harvest fruit rot of papaya and their control in Central Brazil. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 60, n. 8, p. 605-609, Aug. 1976.
- COUEY, M.; FARIAS, G. Control of postharvest decay of papaya. **HortScience**, Alexandria, v. 14, n. 6, p. 719-720, Dec. 1979.
- DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 528-533, maio 2003.
- DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S. The role of cutinase from *Colletotrichum gloeosporioides* in the penetration of papaya. In: HESS, W. M.; SINGH, R. S.; SINGH, U. S.; WEBER, D. J. (Eds.). **Experimental and conceptual plant pathology**. Montreaux: Gordon and Breach Science Publishers, 1988. v. 2, p. 385-397.
- DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. **Physiological Plant Pathology**, Lancaster, v. 20, n. 3, p. 333-347, May 1982.
- DICKMAN, M. B.; ALVAREZ, A. M. Latente infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 748-750, 1983.
- FAO. **FAOSTAT – Agricultural Statistics Database**. Rome: World Agricultural Information Center. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 12 jun. 2005.
- GAYET, J. P.; BLEINROTH, E. W.; MATALLO, M.; GARCIA, E. E. C.; GARCIA, A. E.; ARDITO, E. F. G.; BORDIN, M. R. **Mamão para exportação**: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília, DF: Embrapa-FRUPEX, 1995. 38 p.
- HUNTER, J. E.; BUDDENHAGEN, I. W. Incidence, epidemiology and control of fruit diseases of papaya in Hawaii. **Tropical Agricultural**, Trinidad, v. 49, n. 1, p. 61-71, Jan. 1972.

- LIBERATO, J. R.; TATAGIBA, J. S. Avaliação de fungicidas *in vitro* e em pós-colheita para o controle da antracnose e da podridão em frutos de mamão. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 409-414, out./dez. 2001.
- NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; LIMA, L. C. O.; RESENDE, M. L. V. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 519-524, maio/jun. 2001.
- PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 365-392.