



RESISTÊNCIA TÉRMICA DE BOLORES DE CASTANHA JAPONESA

Marcela Lucio de **Oliveira**¹; Flávio Luis **Schmidt**²; Ricardo **Harakava**³; Jessica da Silva **Tronquini**⁴;
Maria Fernanda D. P. M. de **Castro**⁵;

Nº14221

RESUMO - *O emboloramento ou podridão fúngica é um dos mais sérios problemas de pós-colheita em híbridos de castanha japonesa. No Brasil a colheita ocorre durante o verão, quente e chuvoso, condições essas que favorecem ainda mais a proliferação de bolores. A estocagem em câmaras a 1°C/90% UR pode prolongar o período de conservação do produto, no entanto, é essencial a utilização de um método de descontaminação, após a colheita, que elimine ou reduza os bolores responsáveis por podridões. O tratamento hidrotérmico é uma opção de tecnologia de descontaminação sustentável bastante interessante, visto que, além do controle microbiológico e prevenção de podridões, pode também erradicar a infestação por insetos. Desse modo, nessa pesquisa, pretendeu-se (1) isolar e identificar os bolores de castanhas responsáveis por sintomas de podridão (2) determinar a resistência térmica desses bolores para indicação de tratamento térmico (binômio tempo/temperatura) pós-colheita. Das castanhas com sintomas de podridões foram isolados principalmente *Neofusicoccum parvum*, *Pseudofusicoccum stromaticum*, *Gnomoniopsis castanea* e *Pestalotiopsis sp.* As combinações de tempo X temperatura, para controle daqueles bolores, foram determinadas utilizando temperaturas nas faixas de 45 a 70°C e tempos de 15s a 70min. Concluímos que o tratamento hidrotérmico pode ser um possível método pós-colheita de controle de bolores de castanha japonesa. No entanto, para indicação das condições de tratamento no produto “in natura”, o histórico de penetração de calor também deve ser considerado.*

Palavras-chaves: castanha japonesa, tratamento térmico, podridões, bolores, fitopatógenos.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; m.oliveiralucio@gmail.com

2 Colaborador, Prof. Dr. da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP

3 Colaborador, Pesquisador Científico do Instituto Biológico, IB, Brasil

4 Colaborador, Bolsista Treinamento Técnico 2 Fapesp: Graduação em Nutrição, UNIP, Campinas-SP.

5 Orientador: Pesquisadora Científica do ITAL, Campinas-SP; fernanda@ital.sp.gov.br



ABSTRACT – *Mould contamination or fungal decay is one of the most serious post-harvest problems of the hybrids Japanese chestnuts. In Brazil the harvest occurs during the warm and rainy summer, conditions which favor further proliferation of mould. Storage at 1°C/90% RH can extend the shelf life of the product, however, it is essential to apply a decontamination method after harvest either to eliminate or reduce fungi responsible for the nuts rotten. Heat treatment is a very promising sustainable decontamination technology as it can provide the microbiological control and prevention of decay and may also eradicate the insect infestation. Thus, in this study, we aimed (1) isolate and identify the moulds chestnut responsible for rot symptoms (2) determine the thermal resistance of these moulds for the future indication of a post-harvest thermal treatment (binomial time / temperature) post-harvest. From rotten chestnuts we mostly isolated *Neofusicoccum parvum*, *Pseudofusicoccum stromaticum*, *Gnomoniopsis castanea* and *sp Pestalotiopsis*. The combinations of time X temperature to control these moulds were determined in the range from 45 to 70°C and from 15s to 70min. We conclude that heat treatment can be a possible method for post-harvest control of moulds in Japanese chestnut. However, the heat penetration history should also be considered to indicate the conditions to be applied in the “in natura” product.*

Keywords: Japanese chestnut, heat treatment, chestnut rotten, mould, phytopathogens.

1 INTRODUÇÃO

O emboloramento ou podridão fúngica é um dos mais sérios problemas de pós-colheita em híbridos de castanha japonesa. No Brasil a colheita ocorre durante o verão, quente e chuvoso, condições essas que favorecem ainda mais a proliferação de bolores. A estocagem em câmaras a 1°C/90% UR pode prolongar o período de conservação do produto, no entanto, é essencial a utilização de um método de descontaminação, após a colheita, que elimine ou reduza os bolores responsáveis por podridões. O tratamento térmico é uma opção de tecnologia de descontaminação sustentável bastante interessante, visto que, além do controle microbiológico e prevenção de podridões, pode também erradicar a infestação por insetos.

A imersão em água aquecida é uma das formas de tratamento térmico mais eficiente e mais utilizada para a prevenção da deterioração e podridões em frutas e vegetais frescos. O binômio tempo/temperatura de imersão a ser indicado depende da resistência térmica das espécies que se pretende controlar. Existe uma variação considerável de sensibilidade a altas temperaturas entre várias espécies fúngicas. Desse modo, nessa pesquisa, pretendeu-se (1) isolar e identificar os bolores de castanhas responsáveis por sintomas de podridão (2) determinar a resistência térmica desses bolores para indicação de tratamento térmico (binômio tempo/temperatura) pós-colheita.



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação dos bolores causadores de podridões

2.1.1 Amostragem

Foram coletadas 40 amostras na safra 2012/2013, em propriedades com produção comercial, nas seguintes localidades: São Bento do Sapucaí (18 amostras), Pirassununga (10 amostras) e Monte Alegre do Sul (12 amostras). Na safra 2013/2014 foram coletadas 122 amostras em: Mogi Mirim (20 amostras), Pirassununga (20 amostras), Matão (20 amostras), Santo Antonio do Pinhal (20 amostras), Monte Sião (22 amostras) e Embu Guaçu (20 amostras).

Metade das amostras de cada localidade foi proveniente de ouriços coletados das copas das árvores e, a outra metade, de ouriços coletados do chão das mesmas castanheiras. No mesmo dia da coleta, as amostras foram transportadas ao ITAL e colocadas em câmara a 2°C até serem submetidas às análises.

2.1.2 Incidência de podridão e agente causal

A presença dos sintomas foi observada nas amostras coletadas do solo e das árvores. Foi avaliada a percentagem de castanhas visivelmente mofadas e/ou com sintomas de podridões. Castanhas com sintomas de podridão foram desinfetadas e pequenos fragmentos do tecido danificado foram transferidos para Placas de Petri contendo o meio de cultura Agar Batata Dextrose (PDA) com oxitetraciclina ($50\mu\text{g mL}^{-1}$), e incubados em B.O.D. a 25°C com alternância de luz até o aparecimento das colônias.

A identificação molecular dos isolados foi feita extraindo-se o DNA dos isolados (DOYLE & DOYLE, 1987) e submetendo-os à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) localizada entre os genes codificadores dos RNAs ribossomais 18S e 28S. Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (White et al., 1990). Os produtos amplificados foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas na base de dados GenBank sediada no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), empregando-se o programa Blastn. (ALTSCHUL *et al.*, 1990). A identificação foi baseada na similaridade com sequências de espécies tipo presentes na base de dados.



2.2. Resistência térmica dos bolores causadores de sintomas de podridões

Foram conduzidos testes *in vitro* visando avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico sobre o crescimento micelial dos principais isolados da castanha. Discos de micélio foram retirados da borda das colônias fúngicas em crescimento ativo e colocados em bolsas de gaze estéril. Em um balão de três bocas de 500 mL, foram colocados 200 mL de água destilada estéril, inserindo-se em uma das bocas um termômetro digital Incotherm, em outra o agitador (Modelo: RW 20 DS32) ajustado para 450 rpm e no terceiro foram introduzidas as bolsas de gaze estéril contendo os discos de micélio. O procedimento foi utilizado para tempos na faixa de 15s a 70min.e temperaturas de 45 a 70°C, buscando-se o intervalo letal para o binômio. Atingido o tempo necessário para cada tratamento, as bolsas de gaze contendo os discos de micélio foram retiradas da água quente e, imediatamente, colocadas em água fria para cessar o efeito do tratamento térmico. Em cada placa contendo meio BDA, foi colocado um disco de micélio, incubados em B.O.D. com temperatura controlada $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e diariamente, foi avaliado se houve ou não o crescimento micelial. (Santos et al., 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Incidência de podridão e agente causal

Verificou-se que, em todas as localidades, houve maior incidência de podridões nas amostras coletadas do solo. A presença de castanhas com sintomas em amostras coletadas das copas indica que provavelmente trata-se de agente causal endofítico (Figura 1).

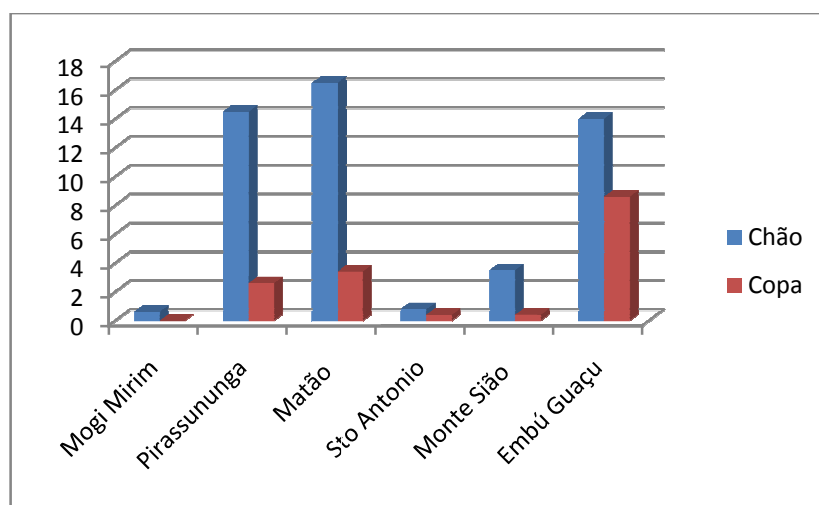


Figura 1. Porcentagem de castanhas com sintomas de podridões nas amostras coletadas, do solo e da copa, nas diferentes localidades.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

O agente causal *Neofusicoccum parvum* foi o fungo mais frequentemente isolado de castanhas com sintomas de podridão (61% das amostras de castanhas coletadas do solo e em 27% daquelas coletadas da copa), seguido por *Pseudofusicoccum stromaticum* (19% das amostras de castanhas coletadas do solo e em 7% daquelas coletadas da copa) e *Gnomoniopsis castanea* (6% das amostras de castanhas coletadas do solo e em 2% daquelas coletadas da copa). Os demais bolores foram isolados em percentagens inferiores a 5% (Figura 2).

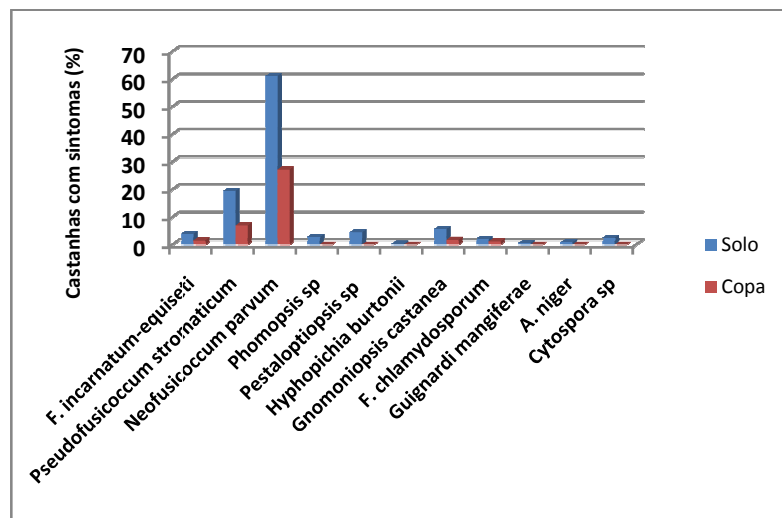


Figura 2. Porcentagem de castanhas com sintomas de podridão e o agente causal isolado do tecido danificado.

Washington et al. (1997), na Austrália, isolaram de castanhas com sintomas de podridões, *Penicillium spp.*, *Botrytis cinérea*, *Phomopsis castanea*, *Fusarium spp*, *Truncatella sp*, *Mucor sp* e *Cytospora sp*. De acordo com Osmonalieva et al (2001), *Phomopsis castanea* (Sacc) é responsável por podridões em castanhas tanto na Austrália como na Nova Zelândia. Donis-González (2008) associou sintomas de podridões de castanhas com *Penicillium spp* (*P. griseofulvum*, *P. expansum*, *P. chysogenum*), *Acrospora mirabilis*, *Botryosphaeria ribis* e *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botryotinia fuckeliana* e *Fusarium spp*. Lee et al. (2013) ao estudarem os microrganismos associados com podridões de castanhas durante a estocagem, na Coreia, isolaram mais de 24 espécies de fungos e bactérias, sendo *Botryosphaeria dothidea* e *Mucor sp* os isolados mais frequentes. *Fusarium spp*, *Penicillium spp* e *Phomopsis spp* também foram isolados.

Os fungos mais frequentemente isolados dos tecidos danificados e os sintomas observados estão representados pela Figura 3.



Figura 3. A: *Pseudofusicoccum parvum*; B: *Gnomoniopsis castanea*; C: *Neofusicoccum parvum*.

3.2 Resistência térmica dos bolores causadores de sintomas de podridões

O gráfico de log do tempo X temperatura (Figura 4) permitiu traçar linhas de tendência que definem diversas combinações de tempos e temperaturas capazes de controlar os principais causadores de podridão. As combinações letais para *Neofusicoccum parvum* e *Pseudofusicoccum parvum* foram: 48°C/45min; 50°C/20min; 55°C/30s, para *Gnomoniopsis castanea* foram: 50°C/30min; 55°C/5min; 60°C/1min, e para *Pestalotiopsis sp* foram: 48°C/15min; 50°C/5min; 55°C/30s .

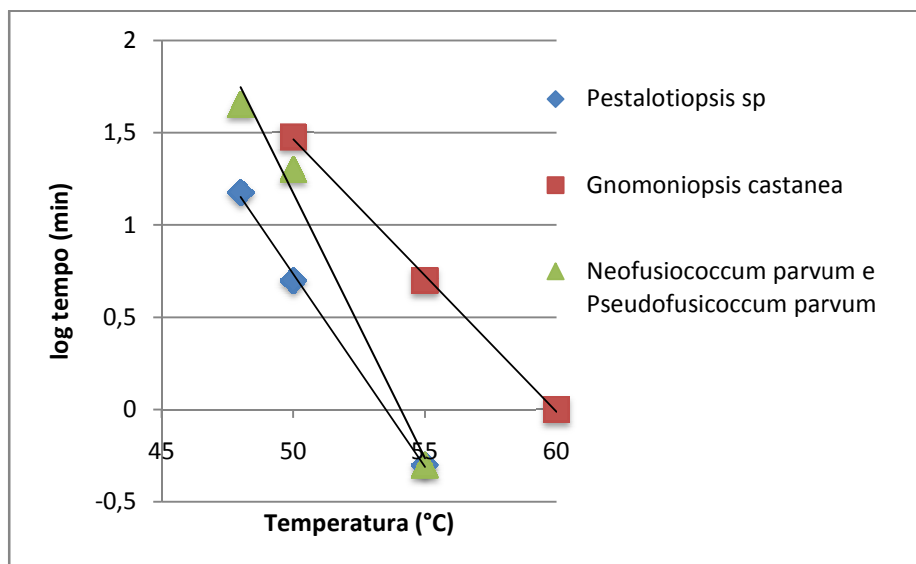


Figura 4. Binômios de letalidade dos fungos isolados de castanhas com sintomas de podridões.

Recentemente, Santos et al. (2013) utilizando a mesma metodologia que aquela adotada em nosso estudo para os testes *in vitro*, verificaram que os binômios letais para *Fusarium pallidoroseum* foram: 52°C/9min, 54°C/5min, 56°C/3min, 58°C/1min, 60° C/20s e 62°C/15s.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Os resultados obtidos indicaram que dentre os fungos estudados, a 50°C o *Gnomoniopsis castanea* é mais resistente que o *Neofusicoccum parvum* e *Pseudofusicoccum parvum* e que o *Pestalotiopsis sp* é o mais sensível.

4 CONCLUSÃO

O tratamento térmico é um método potencial de controle pós-colheita de bolores de castanha japonesa. No entanto, para indicação das combinações no produto “in natura”, o histórico de penetração de calor também deve ser considerado.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. **Basic local alignment search tool**. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition, **Burgess Publishing Company**, Minneapolis, p.241, 1972.

DONIS-GONZALEZ, I.R. **Management of microbial decay of fresh and peeled chestnuts in Michigan**. M.Sc. Thesis. Michigan State University. MI, USA, 2008

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. PHYTOCHEMICAL BULLETIN, v.19(1):11-15, 1987

LEE, S.H., PARK, C.Y., PARK, J.H., LEE, C.K., LEE, U., HWANG, M.S. Survey of Microorganisms Associated with Chestnut Nut-rot in Storage in Korea. **II European Congress on Chestnut**, 09-12. October, 2013. Debrecen-Baia Mare-Modry Kamen. Hungria, 2013

OSMONALIEVA, A., MCNIEL, D.L., STEWART, A., KLINAC, D.J., WADIA, K.D.R. *Phomopsis castanea* infection of chestnut in New Zealand. **10th Australian Agronomy Conference**. Hobart, Tasmania. The Regional Institute Ltd. Australian Society of Agronomy, 2001.

SANTOS, T.L. Influência da temperatura no controle de fungos causadores de podridões em melão. **VII Congresso Interinstitucional de Iniciação científica – CIIC**, 2013. 13 a 15 de Agosto de 2013. Campinas: ITAL 2013.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

WASHINGTON, W.S., ALLEN, A.D., AND DOOLEY, L.B. Preliminary studies on *Phomopsis castanea* and other organisms associated with healthy and rotted chestnut fruit. **Plant Pathology**, Australian, v.26, n.1, p.37-43, 1997.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. W. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc. New York, 1990.