

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Candida stellimalicola* e *Rhodotorula minuta* PARA O
BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS
CÍTRICOS**

Fernanda Barbosa Francisco de Paula

Engenheira agrônoma

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Candida stellimalicola* e *Rhodotorula minuta* PARA O
BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS
CÍTRICOS**

Fernanda Barbosa Francisco de Paula

Orientadora: Katia Cristina Kupper

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2020

P324c Paula, Fernanda Barbosa Francisco de
Candida stellimalicola e Rhodotorula minuta para o biocontrole do bolor azul em frutos cítricos /
Fernanda Barbosa Francisco de Paula. -- Jaboticabal, 2020 105 f. : il., tabs., fotos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Katia Cristina Kupper
1. Antagonismo. 2. Citrus spp.. 3. *Penicillium italicum*. 4. Biofilme.
5. Fontes nutricionais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

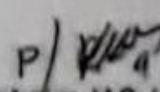
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Candida stellimalicola* E *Rhodotorula minuta* PARA O BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS CÍTRICOS

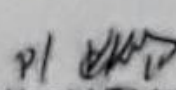
AUTORA: FERNANDA BARBOSA FRANCISCO DE PAULA

ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER (Participação Virtual) 
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agronômico de Campinas - Cordeirópolis/SP

Pesquisadora Dra. ELIANE APARECIDA BENATO RODRIGUES DA SILVA (Participação Virtual) P/ 
Centro de PD&I em Ecofisiologia e Biofísica - Laboratório de Pós-Colheita-Instituto Agronômico-IAC / Campinas/SP

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO (Participação Virtual) P/ 
Departamento de Ciências da Produção Agrícola (Produção Vegetal / Fitotecnia) / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 09 de outubro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fernanda Barbosa Francisco de Paula – Nascida em 20 de outubro de 1988, em Manaus, Amazonas, Brasil. Filha de Alcemira Barbosa de Paula e Fernando Francisco de Paula. Iniciou sua graduação em Agronomia na Universidade Federal do Amazonas- UFAM, na cidade de Manaus, AM, concluindo seu bacharelado em 2016. Durante a graduação, estagiou na Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas- ADAF, Manaus, Am, foi bolsista de iniciação científica pela Fapeam, atuando na área de pós-colheita, e também bolsista CAPES, atuando na área de qualidade de água, sob a orientação da Profa. Dra. Edivânia dos Santos Schropfer. Se formou no curso técnico em meio ambiente pelo Centro de Educação Tecnológica do Amazonas- CETAM, em 2015. Em março de 2018 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, como bolsista Capes, realizando seu projeto de pesquisa sob a orientação da Profa. Dra. Katia Cristina Kupper, no Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP.

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível”

São Francisco de Assis.

DEDICO

Este trabalho é inteiramente dedicado aos meus pais. Os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a nossa senhora Aparecida por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, me guiar no caminho certo e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, **Alcemira e Fernando**, por sempre acreditarem em mim e serem o alicerce da minha educação. Obrigada pelo amor incondicional! As minhas irmãs **Társila e Mayara**, não tenho palavras para descrever como vocês são fundamentais em minha vida. Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida. Amo vocês!

À minha orientadora Prof^a Dra^a **Katia Cristina Kupper** pelo aprendizado, oportunidade, paciência e privilégio de tê-la como orientadora. Minha eterna gratidão, por tudo!

As professoras da FCAV/UNESP, **Rita de Cássia Panizzi e a Márcia Justino Rossini Mutton**, pelas correções e sugestões no exame de qualificação.

Ao **Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária** pela oportunidade do curso de mestrado.

À **Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrárias – Câmpus de Jaboticabal**, e todos seus funcionários, principalmente ao pessoal da seção de Pós-graduação, que sempre foram muito gentis e atenciosos, principalmente **Branca, Diego e Moysés**.

Ao **Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC** pela oportunidade de realizar meus experimentos. Á todos os pesquisadores e aos funcionários **Isabel, Nidelci, Nadji, Vivian, Valéria, Maria, Rose, Anita**, pela disponibilidade, simpatia e gentileza.

Aos amigos do laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, **Alisson, Deborah, Natália, Vanessa e Lucas**, que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre com o espírito colaborativo. Obrigada pela colaboração de cada um! Sentirei muita falta de todos.

À **Citrícola Lucato** e a **Fazenda Raphael Juliano** pela doação dos frutos em todos os experimentos.

Ao **Diogo Padilha**, amigo e namorado. Sem palavras para descrever sua importância na minha trajetória.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001.

Palavras não conseguem expressar a gratidão que sinto por todos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO GERAL	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Citricultura Brasileira	3
3.2 Doenças de pós-colheita - Bolores	4
3.3 Controle	6
3.4 Controle Biológico	7
3.5 Biofilme	9
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 2- POTENCIAL DE BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS CÍTRICOS POR <i>Candida stellimalicola</i>	14
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Microrganismos.....	17
2.2 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Candida stellimalicola</i>	18
2.3 Competição por nutrientes entre <i>Candida stellimalicola</i> e <i>Penicillium italicum</i>	19
2.4 Adição de fontes nutricionais em meio de cultivo para produção de células de <i>Candida stellimalicola</i>	19

2.5 Produção de biofilme por <i>Candida stellimalicola</i>	20
2.6 Atividade antifúngica <i>in vivo</i> de <i>Candida stellimalicola</i>	21
3 RESULTADOS	22
3.1 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Candida stellimalicola</i>	23
3.2 Competição por nutrientes entre <i>Candida stellimalicola</i> e <i>Penicillium italicum</i>	30
3.3 Adição de fontes nutricionais em meio de cultivo para produção de células de <i>Candida stellimalicola</i>	33
3.4 Produção de biofilme por <i>Candida stellimalicola</i>	35
3.5 Atividade antifúngica <i>in vivo</i> de <i>Candida stellimalicola</i>	36
3.5.1 ACBL-05	36
3.5.2 ACBL-10	43
4 DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÃO.....	52
6 REFERÊNCIAS.....	53
CAPÍTULO 3 - <i>Rhodotorula minuta</i> NO BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS CÍTRICOS.....	56
RESUMO.....	56
ABSTRACT	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Microrganismos.....	59
2.2 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Rhodotorula minuta</i> contra <i>Penicillium italicum</i>	60
2.3 Adição de fonte nutricional em meio de cultivo para produção de células de <i>Rhodotorula minuta</i>	61

2.4 Competição por nutrientes entre <i>Rhodotorula minuta</i> – ACBL-23 e <i>Penicillium italicum</i>	61
2.5 Produção de biofilme por <i>Rhodotorula minuta</i> – ACBL-23.....	62
2.6 Biocontrole de bolor azul em frutos cítricos por <i>Rhodotorula minuta</i> - ACBL-23	63
3 RESULTADOS	64
3.1 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Rhodotorula minuta</i> contra <i>Penicillium italicum</i>	64
3.2 Adição de fonte nutricional em meio de cultivo para produção de células de <i>Rhodotorula minuta</i>	70
3.3 Competição por nutrientes entre <i>Rhodotorula minuta</i> - ACBL-23 e <i>Penicillium italicum</i>	71
3.4 Produção de biofilme por <i>Rhodotorula minuta</i> - ACBL-23	72
3.5 Biocontrole de bolor azul em frutos cítricos por <i>Rhodotorula minuta</i> - ACBL-23	73
4 DISCUSSÃO	80
5 CONCLUSÃO.....	83
6 REFERÊNCIAS.....	83

CAPÍTULO 1- *Candida stellimalicola* e *Rhodotorula minuta* PARA O BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS CÍTRICOS

RESUMO- A citricultura tem uma importância social e econômica para o país, especialmente, no Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, onde a atividade é predominante. Dentre as doenças de maior importância econômica que ocorrem na fase de pós-colheita dos citros, encontra-se o bolor azul, causado pelo fungo *Penicillium italicum*. Tal doença acarreta prejuízos na qualidade e na quantidade dos frutos e o controle mais comum da doença é o uso de fungicida, como o imazalil. No entanto, devido à falta de novos produtos, o uso frequente e excessivo de imazalil, durante o beneficiamento dos frutos, têm ocasionado problemas ao meio-ambiente; à saúde pública, devido à quantidade de resíduos nos frutos; além de estar favorecendo o surgimento de linhagens resistentes do fungo a esse princípio ativo. A busca por métodos alternativos de controle se faz necessária e, o uso de leveduras para controle de patógenos, que ocorrem na pós-colheita, tem sido o mais indicado. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antagonista de dois isolados ACBL-05 e ACBL-10 de *Candida stellimalicola*, e um isolado ACBL-23 de *Rhodotorula minuta* avaliados quanto: (i) à adição de fontes nutricionais em meio de cultivo da levedura e o seu efeito na sua atividade antagônica e na sua produção de células viáveis; (ii) à competição por nutrientes entre a levedura e o fitopatógenos; (iii) à produção de biofilme pelos microrganismos e, finalmente, (iv) à sua atividade antifúngica *in vivo* contra *Penicillium italicum*. Os resultados *in vitro* mostraram que, a adição de fontes nutricionais em meio de cultivo dos isolados de *C. stellimalicola* favoreceu a sua atividade antagônica e a sua produção de células viáveis. Embora *C. stellimalicola* produza biofilme, o aumento da sua produção pode, ou não, ser favorecido pela adição de uma fonte nutricional no meio de cultivo, dependendo do isolado. Neste estudo, foi observado que, a adição de cloreto de cobalto (1 mM) aumentou a produção de biofilme pelo isolado ACBL-10, porém, o acréscimo de uma fonte nutricional, em meio de cultivo, não favoreceu o aumento de biofilme para o ACBL-05. Para o isolado ACBL-23 verifica-se, que a adição de sulfato de cobre (0,2 mM) em meio de cultivo da levedura favoreceu a atividade antagônica e manteve a sua produção de células viáveis; *R. minuta*, independente da adição de fontes nutricionais, inibe a germinação de *P. italicum*; a adição de fontes de carbono sugere uma possível competição entre a levedura e o fitopatógeno; a levedura produz biofilme e a adição de sulfato de cobre (0,2 mM), em seu meio de cultivo, estimula a produção. Sob condições *in vivo* os isolados apresentaram potencial para o controle do bolor azul, porém a sua atividade antagônica depende da variedade de citros avaliada.

Palavras-chave: antagonismo, *Citrus* spp., *Penicillium italicum*

CHAPTER 1- *Candida stellimalicola* and *Rhodotorula minuta* FOR THE BIOCONTROL OF BLUE MOLD IN CITRUS FRUITS

ABSTRACT- Citriculture has a social and economic importance for the country, especially in the state of São Paulo and Triângulo Mineiro, where the activity is predominant. Among the diseases of greater economic importance that occur in the post-harvest phase of citrus, is the blue mold, caused by the *Penicillium italicum*. This disease causes losses in the quality and quantity of fruits and the most common control of the disease is the use of fungicide, such as imazalil. However, due to the lack of new products, the frequent and excessive use of imazalil, during the fruit processing, has caused problems to the environment; to public health, due to the amount of residues in the fruit; besides being favoring the appearance of resistant lineages of the fungus to this active principle. The search for alternative methods of control is necessary and the use of yeasts to control pathogens, which occur after harvest, has been the most indicated. In view of the above, the present work aimed to evaluate the antagonistic capacity of two isolates ACBL-05 and ACBL-10 of *Candida stellimalicola*, and one isolate ACBL-23 of *Rhodotorula minuta* evaluated how much: (i) the addition of nutritional sources in yeast culture medium and its effect on its antagonistic activity and on its production of viable cells; (ii) the competition for nutrients between yeast and phytopathogens; (iii) the production of biofilm by microorganisms and, finally, (iv) its *in vivo* antifungal activity against *Penicillium italicum*. The *in vitro* results showed that the addition of nutritional sources in culture medium of *C. stellimalicola* isolates favored its antagonistic activity and its production of viable cells. Although *C. stellimalicola* produces biofilm, the increase in its production may or may not be favored by the addition of a nutritional source in culture medium, depending on the isolate. In this study, it was observed that the addition of cobalt chloride (1 mM) increased the production of biofilm by the ACBL-10 isolate, however, the addition of a nutritional source in culture medium did not favor the increase of biofilm for ACBL-05. The results obtained showed that the addition of copper sulfate (0.2 mM) in yeast culture medium favored the antagonistic activity and maintained its production of viable cells; *R. minuta*, independent of the addition of nutritional sources, inhibits the germination of *P. italicum*; the addition of carbon sources suggests a possible competition between the yeast and the phytopathogen; the yeast produces biofilm and the addition of copper sulfate (0.2 mM), in its culture medium, stimulates the production. Under *in vivo* conditions, it was found that yeasts presents potential for the control of blue mold, however, it depends on the isolate and the variety of citrus evaluated.

Keywords : antagonism, *Citrus* spp., *Penicillium italicum*

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 Efeito da fonte de nitrogênio no cultivo da levedura ACBL-05 na atividade antagônica de <i>Penicillium italicum</i>	25
Tabela 2 Efeito da fonte de micronutrientes no cultivo da levedura ACBL-05 na atividade antagônica de <i>Penicillium italicum</i>	26
Tabela 3 Efeito das fontes de nitrogênio e micronutrientes, combinados ou não, no cultivo de <i>Candida stellimalicola</i> -ACBL-05 e seu efeito no crescimento micelial de <i>Penicillium italicum</i>	27
Tabela 4 Porcentagem de inibição da colônia de <i>Penicillium italicum</i> por <i>Candida stellimalicola</i> -ACBL-10, após cultivo da levedura em meio batata-dextrose acrescido de diferentes fontes nitrogenadas	28
Tabela 5 Porcentagem de inibição da colônia de <i>Penicillium italicum</i> por <i>Candida stellimalicola</i> -ACBL-10, após cultivo da levedura em meio batata-dextrose acrescido de diferentes fontes de micronutrientes	29
Tabela 6 Efeito das fontes de nitrogênio e micronutrientes, combinados ou não, no cultivo da levedura ACBL-10 e seu efeito no tamanho da colônia de <i>Penicillium italicum</i>	30
Tabela 7 Porcentagem de inibição da germinação de conídios de <i>Penicillium italicum</i> sob ação de <i>Candida stellimalicola</i> -ACBL-05 cultivada em meio ágar-água, acrescido de diferentes fontes de nutrientes	32
Tabela 8 Porcentagem de inibição da germinação de conídios de <i>Penicillium italicum</i> sob ação de <i>Candida stellimalicola</i> -ACBL-10 cultivada em meio ágar-água, acrescido de diferentes fontes de nutrientes	33

Capítulo 3

Tabela 1 Efeito das fontes de nitrogênio no cultivo da levedura ACBL-23 e seu efeito no crescimento micelial de <i>Penicillium italicum</i>	67
Tabela 2 Efeito das fontes de micronutrientes no cultivo da levedura ACBL-23 e seu efeito no crescimento micelial de <i>Penicillium italicum</i>	68
Tabela 3 Efeito das fontes de nitrogênio e micronutrientes, combinados ou não, no cultivo de <i>Rhodotorula minuta</i> - ACBL-23 e seu efeito no crescimento micelial de <i>Penicillium italicum</i>	69
Tabela 4 Efeito das melhores fontes de nitrogênio e micronutriente, combinados ou não, sobre o crescimento micelial de <i>Penicillium italicum</i>	70
Tabela 5 Porcentagem de inibição da germinação de conídios de <i>Penicillium italicum</i> sob ação de <i>Rhodotorula minuta</i> -ACBL-23 cultivada em meio ágar-água, acrescido de diferentes fontes de nutrientes	73

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1** Produção de células de *Candida stellimalicola*- ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose, acrescido, ou não, de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM), após diferentes períodos de incubação a 28 °C. 35
- Figura 2** Produção de células de *Candida stellimalicola*-ACBL-10 cultivada em meio batata-dextrose, acrescido, ou não, de cloreto de cobalto (1mM), após diferentes períodos de incubação a 28 °C 35
- Figura 3** Produção de biofilme por *Candida stellimalicola*-ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose acrescido, ou não, de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM), na presença ou na ausência de *Penicillium italicum*. 36
- Figura 4** Produção de biofilme por *Candida stellimalicola*-ACBL-10 cultivada em meio batata-dextrose acrescido, ou não, de cloreto de cobalto (1mM), na presença ou na ausência de *Penicillium italicum*. 37
- Figura 5** Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) determinada por meio do diâmetro médio das lesões de bolor azul em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de sulfato de amônio (0,02 %) e cloreto de cobalto (0,05 mM). 38
- Figura 6** Porcentagem de frutos doentes de laranja Lima, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM). 38
- Figura 7** Frutos de laranja Lima inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A- preventivamente com *Candida stellimalicola*-ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose; B- Testemunha (sem tratamento) e C- Imazalil. 39
- Figura 8** Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões de bolor azul em frutos de tangerina Murcott, após inoculação e tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada previamente em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (0,05mM) + sulfato de amônio (0,02%). 40
- Figura 9** Porcentagem de frutos doentes de tangerina Murcott, após inoculação e tratamento preventivo, ou curativo, com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada previamente em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (0,05mM) + sulfato de amônio (0,02%). 40
- Figura 10** Frutos de tangerina Murcott inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A-Tratamento preventivo de *Candida stellimalicola*- ACBL-05 previamente cultivada em meio batata-dextrose acrescido das fontes (cloreto de cobalto (0,05mM) + sulfato de amônio (0,02%)); B- Tratamento curativo de *Candida stellimalicola*- ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose acrescido de fontes; C- Testemunha (sem tratamento) e D- Imazalil. 41
- Figura 11** Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões de bolor azul em frutos de lima ácida Tahiti, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo

ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, previamente cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM). 42

Figura 12 Porcentagem de frutos doentes de lima ácida Tahiti, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo, ou curativo, com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, previamente cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM). 43

Figura 13 Frutos de lima ácida Tahiti inoculadas por *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose de forma preventiva: B- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (0,05mM)+ sulfato de amônio (0,02%), preventivo C- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, de forma curativa D- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (0,05mM)+ sulfato de amônio (0,02%), curativo E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil 43

Figura 14 Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM). 44

Figura 15 Porcentagem de frutos com sintomas ocasionados por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM). 45

Figura 16 Frutos de laranja Lima inoculados com o fungo *Penicillium italicum*, e tratados com: A- *Candida stellimalicola*- ACBL-10 cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento preventivo B- Testemunha (sem tratamento) e C- Imazalil. 45

Figura 17 Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de tangerina Murcott, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM). 46

Figura 18 Porcentagem de frutos com sintomas de bolor azul, em frutos de tangerina Murcott, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola* -ACBL-10, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM). 47

Figura 19 Frutos de tangerina Murcott inoculados por *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (1mM), após tratamento curativo B- Testemunha (sem tratamento) e C- Imazalil. 47

Figura 20 Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de lima ácida Tahiti, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM). 48

Figura 21 Porcentagem de frutos com sintomas ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de lima ácida Tahiti, após tratamento preventivo ou curativo

com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM). 49

Figura 22 Frutos de lima ácida Tahiti inoculadas com *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (1mM), após tratamento preventivo B- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento preventivo C- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, tratado de forma curativa; D- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (1mM); E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil . 49

Capítulo 3

Figura 1 Produção de células de *Rhodotorula minuta*-ACBL-23 cultivada em meio batata-dextrose, acrescido, ou não, de sulfato de cobre (0,2 mM), após diferentes períodos de incubação a 28 °C. 71

Figura 2 Produção de biofilme por *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose acrescido, ou não, de sulfato de cobre (0,2 mM), na presença ou na ausência de *Penicillium italicum*. 74

Figura 3 Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões de bolor azul em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM). 75

Figura 4. Porcentagem de frutos doentes de laranja Lima após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM). 76

Figura 5. Frutos de laranja Lima inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23 previamente cultivada em meio batata-dextrose e aplicada preventivamente; B- *Rhodotorula minuta*- ACBL-23 cultivada em meio batata-dextrose e aplicada de forma curativa; C- Testemunha (sem tratamento) e D- Imazalil. 76

Figura 6. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de tangerina Murcott, após tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM). 77

Figura 7. Porcentagem de frutos doentes de tangerina Murcott, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM). 78

Figura 8. Frutos de tangerina Murcott inoculados com *Penicillium italicum*, e tratados com: A- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento curativo; B- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose com adição de sulfato de cobre (0,2 mM), após tratamento curativo; C- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23,

previamente cultivada em meio batata-dextrose com adição de sulfato de cobre (0,2 mM), tratado de forma curativa; D- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, aplicada de forma curativa; E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil . 78

Figura 9. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de lima ácida Tahiti, após tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM). 79

Figura 10. Porcentagem de frutos doentes de lima ácida Tahiti, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM). 80

Figura 11. Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento preventivo; B- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose com adição de sulfato de cobre (0,2 mM), após tratamento preventivo; C- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose e tratado de forma curativa; D- *Rhodotorula minuta*- ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com adição de sulfato de cobre (0,2 mM); E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil . 80

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

É incontestável a importância econômica da citricultura para o Brasil, considerando que o país responde por 76% de participação no comércio mundial de suco de laranja, consolidando-se como o mais importante fornecedor global desse nobre produto. Por ser uma atividade que exige uma grande quantidade de mão de obra, especialmente, durante a colheita, o setor citrícola tem um impacto social forte para a economia dos 350 municípios de São Paulo e Triângulo Mineiro, onde a atividade é predominante, gerando um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares em todas as ramificações da cadeia produtiva (Neves & Trombin (2017); IBGE (2018).

Apesar da produção de fruta *in natura* ter uma importância relevante, é na indústria de suco de laranja que o Brasil obtém as maiores divisas, sendo responsável por 75% das exportações mundiais. Dados mostram que nos nove primeiros meses da safra 2019/2020, o país teve um aumento de 18% a mais nas exportações do suco, quando comparado com o mesmo período da safra anterior (Conab, 2020).

Na pós-colheita os prejuízos de citros são causados por alguns patógenos fúngicos, que frequentemente ocorre através de práticas inadequadas durante a condução da cultura e colheita. A ocorrência de doenças nessa fase da cultura pode acarretar na diminuição da qualidade e da produção dos frutos e, dentre essas, encontra-se o bolor azul, causado pelo fungo *Penicillium italicum* Wehmer. O uso de fungicidas, como o tiabendazol e imazalil, para o controle do bolor azul e do bolor verde (*P. digitatum*) na pós-colheita tem promovido o surgimento de linhagens resistentes aos fitopatógenos (Fisher et al. (2013); Palou et al. (2002); Zhou et al. (2014).

Os frutos de todas as variedades cítricas são suscetíveis ao bolor azul. O fungo provoca podridões moles nos frutos, recobrando-os com micélio branco e

grande número de esporos, dando a coloração azul e, à medida que envelhece, torna-se esverdeada, confundindo à primeira vista, com o bolor verde. Na fruta armazenada, a podridão pode ser transmitida de fruto a fruto por contato, já que as enzimas que provocam a podridão dissolvem a cutícula do fruto adjacente, acabando por formar uma massa de frutos podres (Mattos Junior et al., 2005).

Como ocorre com o bolor verde, a temperatura tem influência no desenvolvimento de *P. italicum*, em temperaturas baixas e ambientes ligeiramente secos, o fungo pode continuar crescendo lentamente, ao contrário de *P. digitatum* que paralisa o seu crescimento. Por isso, manifesta-se com maior frequência nos frutos armazenados em baixas temperaturas, quando comparado ao bolor verde (Mattos Junior et al., 2005).

Buscando estratégias alternativas de controle, espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de biocontrole contra fitopatógenos que ocorrem na fase de pós-colheita, não só em citros, mas também em outras culturas (Masih et al., 2001; Kupper et al., 2013; Ferraz et al., 2016; Cunha et al., 2018; Klein & Kupper, 2018).

Alguns produtos à base de leveduras já são encontrados comercialmente, como o Blossom Protect™ e o BoniProtect®, cujo o princípio ativo é a base de *Aureobasidium pullulans*, produtos esses comercializados nos EUA e Israel e na Alemanha, respectivamente; Shemer® (*Metschnikowia fructicola*), comercializado em Israel e YieldPlus® (*Cryptococcus albidus*), comercializado na África do Sul (Droby et al., 2002; Bettioli, 2012).

No entanto, o processo para o desenvolvimento de uma formulação a base de microrganismos é bastante complexo e requer muitos estudos preliminares antes mesmo de se chegar à confecção final de um bioproduto. Informações sobre as fontes nutricionais, que possam influenciar na produção de células e na atividade antagônica do microrganismo, assim como, os possíveis mecanismos de ação envolvidos no biocontrole, são muito importantes, de modo que, o produto formulado possa agir em partes mais vulneráveis e sensíveis do fitopatógeno.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antagônica de isolados de *Candida stellimalicola* e *Rhodotorula minuta* contra o fungo *Penicillium italicum*, visando o controle do bolor azul em frutos de diferentes espécies de citros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Citricultura Brasileira

A cultura de citros compreende um grande grupo de plantas, representado, na maioria, por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*C. reticulata*), limas ácidas como o Tahiti (*C. latifolia*). As laranjas são os principais frutos cítricos cultivados no mundo, e a maioria dessa produção vai para a indústria de suco. Por outro lado, a China é a principal produtora de tangerinas, destinadas basicamente para o mercado interno. Na Espanha, Turquia e México, predominam as exportações de limões e limas. Quanto à comercialização da laranja *in natura*, o direcionamento para exportação é incipiente e observa-se, tanto no mercado interno como no externo, crescente exigência para melhoria da qualidade dos frutos. No mercado interno brasileiro, nas compras de citros *in natura* destaca-se grande direcionamento de laranja, tangerina e lima ácida, para o preparo de suco fresco. Para o consumo culinário, as variedades mais importantes compreendem a lima ácida Tahiti e o limão Galego (Aguiar et al., 2014).

No cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro, a área plantada com citros diminuiu 16.956 hectares desde 2015, passando de 482.591 hectares para 465.635 hectares em 2018. As áreas com pomares de laranjas reduziram participação no cinturão citrícola, de 92% para 89%, mas as de limas ácidas e limões ganharam importância, subindo de 6% para 8%, o mesmo acontecendo com as de tangerinas, que passaram de 2% para 3% (Fundecitros, 2018).

A citricultura tem uma grande importância social, por ser uma atividade que requer muita de mão de obra, principalmente, durante a colheita, apresentando, inclusive, um grande impacto na economia dos 350 municípios de São Paulo e do triângulo mineiro (Neves & Trombin, 2017).

De acordo com Barros et al. (2016), a adequação do mercado global de suco processado aumentou a rentabilidade da atividade exportadora. A produção de suco possui concentração de oferta em duas regiões do mundo, no Estado de São Paulo (Brasil) e na Flórida (Estados Unidos). Considerando, a economia brasileira, o país responde por 34% da laranja e mais da metade do suco produzido no mundo, respondendo por 76% de participação no comércio mundial de suco e o principal fornecedor do produto (Neves & Trombin, 2017). Entre março e abril de 2020 houve um aumento no consumo de suco de laranja, próximo de 40%, pelos Estados Unidos e Europa. Esse movimento pode estar relacionado ao fato da laranja ser conhecida por ser rica em vitamina C e, também, a uma decisão do consumidor de estocar alimentos em função das incertezas da pandemia do coronavírus (Conab, 2020).

O Brasil expandiu a produção total de laranjas, bem acima da demanda destinada ao processamento de suco, o que fez o Brasil, juntamente com outros países, explicar o aumento de quase 40% da produção mundial de laranja para consumo da fruta de mesa (Barros et al., 2016).

Só no estado de São Paulo, a safra de 2018/2019 atingiu uma produção de 285,98 milhões de caixas de 40,8 kg, enquanto que, a estimativa de safra do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro era de 385,31 milhões de caixas (Fundecitrus, 2018).

3.2 Doenças de pós-colheita - Bolores

A fase de pós-colheita de citros é o período que transcorre desde a colheita dos frutos no campo o seu consumo em estado do fresco, preparado ou, transformado industrialmente. A maioria das frutas tem uma vida de armazenamento intermediária entre esses dois extremos. Somente por meio de um rigoroso controle de temperatura, umidade e atmosfera durante o

armazenamento é que se pode obter um produto de boa qualidade ao final do período. Esses parâmetros influenciam a maturação e o aparecimento de possíveis doenças que ocasionam perdas do produto armazenado. Também é importante uma adequada limpeza e desinfecção nos lugares de armazenamento, de forma a diminuir os riscos da chegada de patógenos que acompanham a fruta superficialmente (Vero et al., 2016).

As doenças que afetam os frutos na pós-colheita, sempre estão associadas às perdas de frutos comercializados no mercado *in natura*, sendo as mais importantes: o bolor azul (*Penicillium italicum*), o bolor verde (*Penicillium digitatum*), as podridões pedunculares (*Diaporthe citri* e *Lasiodiplodia* spp.), a podridão negra (*Alternaria* spp.), a podridão-parda (*Phytophthora* spp.) e a podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*) (Junior et al., 2015).

O bolor verde é a principal doença de pós-colheita dos citros, provocada por *Penicillium digitatum* e disseminada em todos os países produtores. A ocorrência depende muito das condições climáticas e da forma de manipulação dos frutos, desde o pomar até chegar ao consumidor. Sua importância é reforçada pela produção de grande número de esporos do patógeno nos tecidos superficiais afetados, que se disseminam desde o pomar até os centros de comercialização urbanos e à própria casa do consumidor. O bolor verde causa os maiores danos na pós-colheita, ocorrendo tanto no armazenamento quanto no transporte, afetando, principalmente, laranjas e tangerinas. A infecção ocorre através de ferimentos, e as injúrias atuam como porta de entrada para o patógeno. A infecção não ocorre de um fruto doente para um sadio, já que não há transmissão por contato, diferentemente do que acontece com o bolor azul (Liu et al., 2013; Nascimento et al., 2014).

O bolor azul, provocado pelo fungo *Penicillium italicum* wehmer, geralmente tem menor severidade que o bolor verde. O fungo provoca podridões moles, recoberto com micélio branco e grande números de esporos com coloração azul. À medida que envelhece, torna-se esverdeado, confundindo-se com os danos causados pelo bolor verde. O primeiro estágio da infecção é a formação de uma mancha mole, encharcada e ligeiramente descolorada, que facilita a perfuração do fruto. A lesão do *P. italicum* cresce mais devagar do que a do *P. digitatum*. O micélio branco é formado quando as lesões atingem um diâmetro entre de 6-12 mm, com esporos de coloração azul, os quais são produzidos no centro das

lesões (Plaza et al., 2003; Nascimento et al., 2014). As lesões do bolor azul diferem das ocasionadas pelo *P. digitatum* por possuir uma faixa de micélio branca em torno da área de esporulação, cercada de uma faixa definida de massa aquosa na casca dos frutos. O crescimento ótimo para *P. italicum* ocorre entre 22-24 °C, entretanto em temperaturas abaixo de 10 °C ele pode predominar sobre o *P. digitatum* (Timer et al., 2000; Nascimento et al., 2014).

No bolor azul, a faixa branca ao redor da massa de esporos azul é estreita e a faixa de tecido encharcado ao seu redor é mais predominante. Em condições de elevada umidade, as podridões moles provocam uma rápida e completa desintegração no fruto. Em ambiente seco, os frutos infectados murcham e mumificam (Nascimento et al., 2014).

As espécies de *Penicillium* sobrevivem saprofiticamente, em pomares e ambientes, sobre vários tipos de substratos orgânicos, na forma de conídios. As infecções se originam de conídios carregados pelo vento que atingem os frutos, onde penetram pelo ferimento, já o *P. italicum* também é capaz de penetrar diretamente através da cutícula. Os bolores são as doenças com maior importância econômica na pós-colheita, eles também podem ocorrer em pomares, afetando frutos em fase final de maturação. Porém, eles causam maiores prejuízos quando ocorrem na colheita, durante as operações de processamento, armazenamento e transporte. Frutos de todas as variedades e cultivares são suscetíveis (Kimati et al., 1997).

3.3 Controle

Na colheita dos frutos são necessários cuidados para não danificar os mesmos. Ferimentos causados por unhas e por ferramentas de colheita ou pontas de pedúnculos facilitam a entrada de agentes causais de podridões. Os fungos são a maior causa de descarte de frutos após a colheita. Ferimentos na casca devem ser evitados com maior rigor quando já há frutos caídos no chão ou, ainda, nas plantas do pomar com sinais de fungos (Oliveira et al., 2011).

Os frutos contaminados com os fungos (*P. italicum* e *P. digitatum*) liberam bilhões de conídios para o ambiente. Os cuidados recomendados são:

eliminação de frutos doentes, desinfestação preventiva de materiais e instalações; pulverização das plantas das plantas com fungicida; manuseio cuidadoso dos frutos durante as operações de colheita, transporte, processamento e armazenamento, visando dessa forma evitar ferimentos, que é a principal porta de entrada dos fungos (Koller, 2013).

Os conídios são facilmente levados pelo ar, por isso, se recomenda que nas casas de beneficiamento, se instale um sistema que renove constantemente o ar no ambiente e a imersão dos frutos colhidos em caldas fungicidas, além de armazenar e transportar os frutos beneficiados a baixas temperaturas (Koller, 2013; Franco & Bettioli, 2002).

O armazenamento refrigerado também constitui uma forma eficiente no atraso do desenvolvimento de doenças em frutas (Lurie & Crisoto, 2005).

O controle dos bolores é baseado principalmente no uso do fungicida imazalil o qual é aplicado nos frutos durante o beneficiamento *em packing-houses* (Fischer et al., 2013).

A seletividade, que permite a um fungicida atuar sistematicamente, aumentando sua eficiência em relação aos não-sistêmicos, é, ao mesmo tempo, causa de sua vulnerabilidade. Fungos como todo organismo vivo são geneticamente maleáveis e podem, através de mutações, tornar-se resistente ao uso frequente do fungicida, de modo que, as consequências do desenvolvimento de resistência das populações de fungos podem ser desastrosas (Bergamin & Amorim, 2011). Dessa maneira, os princípios ativos usados para o controle de doença devem ser empregados de forma alternada para que não induza o surgimento de resistência (Koller, 2013; Franco & Bettioli, 2002). Além disso, o uso intensivo de agrotóxico para o controle de doenças, de um modo geral, tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e intoxicação de agricultores (Bettioli & Morandi, 2009).

3.4 Controle Biológico

Segundo Cook & Baker (1983), o controle biológico pode ser definido, como a redução da densidade de inóculo ou das atividades produtoras de doenças de um patógeno mediante um ou mais organismos, na forma natural ou através da manipulação do ambiente, do hospedeiro ou de antagonista; ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas que atuam como agentes de biocontrole.

Procurando estratégias alternativas de controle, espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de biocontrole contra fitopatógenos que ocorrem na fase de pós-colheita, não só em citros, mas também em outras culturas (Masih et al., 2001; Liu et al., 2013; Kupper et al., 2013; Ferraz et al., 2016; Cunha et al., 2018; Klein & Kupper, 2018).

A habilidade de competir por espaço e nutriente torna as leveduras excelentes colonizadores de tecidos lesionados, pois consomem os nutrientes mais rapidamente do que os fitopatógenos, prevenindo a doença (Droby et al., 2009).

Alguns produtos à base de leveduras já são encontrados comercialmente, como o Blossom Protect™[®] (Bio-farming systems) e BoniProtect™[®] (Bio-farming systems), que possuem como princípio ativo a levedura *Aureobasidium pullulans*, Shemer™[®] (Agrogreen Minrav Infrastutures) à base da levedura *Metschnikowia fructicola* e YieldPlus™[®] (AnchorYeast, Cape Town, South Africa) o seu princípio ativo é *Cryptococcus albidus*, (Droby et al., 2002; Bettioli et al., 2012).

Os mecanismos de ação dos agentes de controle biológico de doenças de plantas podem ser divididos em: antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de defesa de plantas. Na antibiose, a produção de metabólitos pelo microrganismo antagônico tem efeito danoso sobre o patógeno. A competição refere-se à interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação ou substrato (Janisiewicz et al., 2000, Ghini & Kimati, 2002; Di Francesco et al., 2016; Carmona-Hernandez et al., 2019). Segundo Spadaro & Droby (2016), a competição por espaço e nutriente (carboidratos, nitrogênio, oxigênio) foi considerado o principal mecanismo de ação de microrganismos antagônicos contra patógenos fúngicos da pós-colheita.

Difícilmente os patógenos conseguem desenvolver resistência aos agentes de controle biológico. Alguns antagonistas agem por mais de um mecanismo, o

que dificulta ainda mais o desenvolvimento de resistência tornando quase impossível a sua ocorrência (Ghini & Kimati, 2002).

Desse modo, entender o mecanismo de ação de agentes de biocontrole é um pré-requisito para se obter isolados antagônicos mais afetivos e, para o desenvolvimento de formulações mais consistentes, que aumentem a atividade antagonista, necessários para o desenvolvimento de um produto comercial (Ferraz et al., 2018).

É importante mencionar que, um sistema de biocontrole é composto de uma interação de três vias entre o hospedeiro, patógeno e levedura, todos afetados por fatores ambientais. Para que o uso de agentes de biocontrole de levedura e outras alternativas sejam utilizados, comercialmente, é necessário analisar a eficácia e o desempenho no controle de doenças pós-colheita (Liu et al., 2013). Dentre as vantagens, na utilização de produtos de biocontrole, destaca-se à baixa agressão ao meio ambiente, uma melhor aceitação por parte dos consumidores, devido as leveduras serem utilizadas na produção de alimentos (Ferraz, 2014).

3.5 Biofilme

Os microrganismos podem existir como células individuais que flutuam ou nadam, independentemente, em um líquido, ou, podem estar ligados uns aos outros desde que haja uma superfície sólida. Essa agregação complexa de microrganismos é chamada de biofilme (O'toole et al.; 2000; Tortora et al., 2017).

Para a colonização das frutas, os microrganismos antagônicos devem ter propriedades específicas que facilitem sua adesão, colonização e multiplicação. Na maioria dos casos, essas características estão associadas à formação de biofilmes (Chi et al., 2015). Uma das principais questões é a fixação inicial de microrganismos, uma vez que é o primeiro passo para a formação do biofilme.

Foi encontrada relação entre bagas de uva e biofilme na capacidade de formação e colonização de feridas pelas leveduras *Metschnikowia pulcherrima* e *Wickerhamomyces anomalous*, que foram eficazes contra deterioração do mofo cinzento. Quando essas leveduras foram comparadas com *Saccharomyces*

cerevisiae, foi verificado que a mesma apresentou menor colonização do ferimento; menor capacidade de formação de biofilme e, conseqüente, de menor controle do *Botrytis cinerea* (Parafati et al., 2015). Os biofilmes atuam como barreiras que se situam entre a superfície da lesão hospedeira e o fitopatógeno.

A capacidade dos agentes de controle biológico de formar biofilme criando uma barreira mecânica interposta entre a superfície da lesão e o patógeno tem sido proposto como um possível mecanismo de biocontrole para algumas leveduras antagônicas (Vero et al., 2013; Spadaro & Droby, 2016; Klein & Kupper, 2018).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, A. T. E.; Gonçalves, C.; Paterniani, M.E.A.G.Z.; Tucci, M.L.S.; Castro, C.E.F. 2014. **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. (Boletim IAC, nº 200) 7 ed. Ver. e atual. Campinas: Instituto Agrônômico.

Barros, A.M; Barros, J. R. M; Cypriano, M.P. 2016. **O mercado da citricultura no Brasil e as suas novas perspectivas**. Associação nacional dos exportadores de sucos cítricos.

Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. 2009. **Biocontrole de Doenças de Plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, E-book no formato PDF.

Bettiol, W. 2012. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Embrapa Meio Ambiente, p. 99-101.

Bergamin Filho, Armando; AMORIM, L.; R. 2011. **Importância das doenças de plantas**. In: *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Editora Ceres.

Carmona-Hernandez, S.; Reyes-Pérez, J.J.; Chiquito- Contreras, R.G.; Rincon-Enriquez, G.; Cerdan-Cabrera, C.R.; Hernandez-Montiel. 2019. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A Review. **Agronomy**. p.1-15.

Companhia nacional de abastecimento - CONAB. Análise mensal- laranja. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro> > Acesso em: 24/08/2019.

Cook, R. J.; Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: **American Phytopathological Society**. p 539.

Cunha, T; Ferraz, L.P; Wehr, P.P, Kupper, K.C. (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, 276, 20-27.

Chi, M.; Li, G.; Liu, Y.; Liu, G.; Li, M.; Zhang, X.; Liu, J. 2015. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological control**, 90, 113-119.

Di Francesco, A.; Martini, C.; Mari, M. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action. **European Journal of Plant Pathology**. 145, 711-717.

Droby, S.; Vinokur, V.; Weiss, B.; Cohen, L.; Daus, A.; Goldschmidt, E.E.; Porat, R. 2009. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, V. 52, p. 137-145.

Droby, S.; Vinokur, V.; Weiss, B.; Cohen, L.; Daus, A.; Goldschmidt, E.E.; Porat, R. 2002. Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. **Biological Control**, v. 92, p. 393-399.

Ferraz, L.P. 2014. **Estudo dos mecanismos de ação de leveduras envolvidos no biocontrole de doenças de pós-colheita em citros**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) - Unesp, Jaboticabal.

Ferraz, L.P.; Cunha, T.; Silva, A.C.; Kupper, K.C. 2016. Biocontrol Ability and Putative Mode of Action of Yeasts Against *Geotrichum citri-aurantii* in Citrus Fruit. **Microbiological Research**, v. 188, p. 72-79.

Ferraz, L. P.; Cunha, T.; Kupper, K. C. 2018. Mecanismo de ação de isolados de leveduras envolvidos no biocontrole de *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde em frutos cítricos. **Citrus Research & Technology**, 39, e-1033.

Fischer, I. H.; Palharini, M. C. A.; Spósito, M. B.; Amorim, L. 2013. Doenças pós-colheita em laranja "Pera" produzida em sistema orgânico e convencional e resistência de *Penicillium digitatum* a fungicidas, **Summa Phytopatology**, v. 39, p. 28-34.

Fundecitrus - Fundo de Defesa da Citricultura, et al. 2018. **Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: retrato dos pomares em março de 2017**. Fundecitrus, 111p.

Franco, D.A. S.; Bettiol, W. 2002. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, V.24, n.2, p. 569-572.

Ghini, R.; Kimati, H. 2002. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**, Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/13231>> Acesso em: 12/10/2019.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola** (2018). Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>> Acessos em 07/01/2019.

Janisiewicz, W.J.; Tworkoski, T.J.; Sharer, C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Biological Control**. Vol.90, n° 11.

Junior, G.J.S.; Behlau, F.; Bassanezi, R.B.; Lopes, S.A. 2015. **Doenças em espécies florestais e frutíferas**. Capítulo- Doenças limitantes na citricultura Brasileira: manejo atual e perspectivas. Viçosa, MG: Grupo de estudos avançados em fitopatologia.

Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, L.E.A. 1997. **Manual de fitopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres Ltda.

Koller, O. L. 2013. (Org.) **Citricultura catarinense**. Florianópolis: Epagri. p.208-209.

Kupper, K.C.; Cervantes, A.L.L.; Klein, M.N.; Silva, A.C. 2013. Avaliação de micro-organismos antagonistas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 20-31. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000200011>. > Acesso em: 05/06/2019.

Klein, M.N.; Kupper, K.C. 2018. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, p. 1-10. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.008>. > Acesso em: 12/04/2019.

Lurie, S.; Crisosto, C. H. 2005. Chilling injury in peach and nectarine. **Postharvest Biology and Technology**, v. 37, n. 3, p.195-208.

Liu, J.; Sui, Y.; Wisniewski, M.; Droby, S.; & Liu, Y. 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, 167, 153–161.

Masih, E.I.; Slezacek-deschaumes, S.; Marmaras, I.; AIT-BARKA, E.; VERNET, G.; Charpentier, C.; Adholeya, A.; Paul, B. 2001. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p. 227-232.

Mattos Junior, D.De.; Negri, J.D.De.; Pio, R.; Pompeu Junior, J. 2005. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, Cap. 18. p. 522-523.

Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento- MAPA. Cultura de Citros. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus> >. Acesso em: 22 out. 2019.

Nascimento, L.M.; Kluge, R.A.; Del Aguila, J.S. 2014. **Colheita e pós-colheita de citros**. 1 ed. São Paulo: Rio de Janeiro: Livre Expressão.

Neves, M.F.; E Trombin V.G. 2017. **Anuário da citricultura 2017**. 1° Edição. CitrusBr.

Oliveira, R. P.; Scivittaro, W. B. 2011. Cultivo de citros sem sementes. IN: Cantillano, R. F. F.; Ueno, B.; Mattos, M. L. T. Pelotas, RS: **Embrapa clima temperado**.

O'toole, G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. **Annual reviews microbial**. v. 54, p. 49-74. DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.49.

Palou, L.; Usall, J.; Muñoz, J.A.; Smilanick, J.L.; Viñas, I. 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Post.Biol. Technol.** v. 24, p. 93–96.

Parafati, L.; Vitale, A.; Restuccia, C.; & Cirvilleri, G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isoalted yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, 47, 85–92.

Plaza, P.; Usall, J.; Teixido, N.; Vinas, I. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 94, n. 4, p. 594-554, 2003.

Timer, L. W.; Garnsey, S. M.; Graham, J. H. **Compendium of postharvest diseases**. 2. ed. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2000.

Tortora, G. J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2017. **Microbiologia**. 12º edição. Porto Alegre, RS. Artmed Editora Ltda.

Vero, S.; Garmendia, G.; Gonzalez, N. B.; Bentancur, O.; & Wisniewski, W. 2013. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). **FEMS Yeast Research**, 13, 189–199.

Vero, S.; Garmendia, G.; Sangorrin, M.; Vargas, M. 2016. Controle biológico de doenças em pós-colheita. IN: DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, Bernardo et al. **Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa. E-book no formato PDF

Spadaro, D.; Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, 47, 39-49.

Zhou, Y.; Deng, L.; Zeng, K. 2014. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit. **Crop Protection**, v. 63, p. 89–96.

CAPÍTULO 2 - POTENCIAL DE BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS CÍTRICOS POR *Candida stellimalicola*

RESUMO- Dentre as doenças de maior importância econômica que ocorrem na fase de pós-colheita dos citros, encontra-se o bolor azul, causado pelo fungo *Penicillium italicum*. Tal doença acarreta prejuízos na qualidade e na quantidade dos frutos e o controle mais comum da doença é o uso de fungicida, como o imazalil. No entanto, devido à falta de novos produtos, o uso frequente e excessivo de imazalil, durante o beneficiamento dos frutos, têm ocasionado problemas ao meio-ambiente; à saúde pública, devido à quantidade de resíduos nos frutos; além de estar favorecendo o surgimento de linhagens resistentes do fungo a esse princípio ativo. A busca por métodos alternativos de controle se faz necessária e, o uso de leveduras para controle de patógenos, que ocorrem na pós-colheita, tem sido o mais indicado, uma vez que, esses microrganismos não deixam resíduos no fruto e colonizam ativamente os ferimentos, os quais são portas de entrada para esses fitopatógenos. De modo a conhecer melhor a capacidade antagonista de *Candida stellimalicola*, dois isolados ACBL-05 e ACBL-10 foram avaliados quanto: (i) à adição de fontes nutricionais em meio de cultivo da levedura e o seu efeito na sua atividade antagônica e na sua produção de células viáveis; (ii) à competição por nutrientes entre a levedura e o fitopatógenos; (iii) à produção de biofilme pelos microrganismos e, finalmente, (iv) à sua atividade antifúngica *in vivo* contra *Penicillium italicum*. Os resultados *in vitro* mostraram que, a adição de fontes nutricionais em meio de cultivo dos isolados de *C. stellimalicola* favoreceu a sua atividade antagônica e a sua produção de células viáveis. Embora *C. stellimalicola* produza biofilme, o aumento da sua produção pode, ou não, ser favorecido pela adição de uma fonte nutricional no meio de cultivo, dependendo do isolado. Neste estudo, foi observado que, a adição de cloreto de cobalto (1mM) aumentou a produção de biofilme pelo isolado ACBL-10, porém, o acréscimo de uma fonte nutricional, em meio de cultivo, não favoreceu o aumento de biofilme para o ACBL-05. Sob condições *in vivo*, verificou-se que, a levedura apresenta potencial para o controle do bolor azul, porém, depende do isolado e da variedade de citros avaliados. O isolado ACBL-10 apresentou maior controle do bolor azul em frutos de laranja Lima, enquanto que, ACBL-05 controlou melhor a doença em frutos de tangerina Murcott.

Palavras-chave: biofilme, competição por nutrientes, fontes nutricionais

CHAPTER 2 - BIOCONTROL POTENTIAL OF BLUE MOLD IN CITRUS FRUITS BY *Candida stellimalicola*

ABSTRACT- Among the diseases of greatest economic importance that occur in the post-harvest phase of citrus, one finds the blue mold, caused by the *Penicillium italicum*. This disease causes damages in the quality and quantity of the fruits and the most common control of the disease is the use of fungicide, such as imazalil. However, due to the lack of new products, the frequent and excessive use of imazalil, during the fruit processing, has caused problems to the environment; to public health, due to the amount of residues in the fruit; besides being favoring the emergence of fungus resistant strains to this active principle. The search for alternative methods of control is necessary and the use of yeasts to control pathogens, which occur after harvest, has been the most indicated, since these microorganisms do not leave residues in the fruit and actively colonize the wounds, which are gateways to these phytopathogens. In order to better understand the antagonistic capacity of *Candida stellimalicola*, two isolates ACBL-05 and ACBL-10 were evaluated: (i) the addition of nutritional sources to the yeast culture medium in the antagonistic activity and in the production of viable cells by the antagonist; (ii) the competition for nutrients between yeasts and fungus; (iii) the production of biofilm by microorganisms and, finally, (iv) the *in vivo* antifungal activity of the yeasts against *Penicillium italicum*. The *in vitro* results showed that the addition of nutritional sources in culture medium of *C. stellimalicola* isolates favored its antagonistic activity and its production of viable cells. Although *C. stellimalicola* produces biofilm, the increase in its production may or may not be favored by the addition of a nutritional source in culture medium, depending on the isolate. In this study, it was observed that the addition of cobalt chloride (1mM) increased the production of biofilm by the ACBL-10 isolate, however, the addition of a nutritional source in culture medium did not favor the increase of biofilm for ACBL-05. Under *in vivo* conditions, it was found that yeast presents potential for the control of blue mold, however, it depends on the isolate and the variety of citrus evaluated. The ACBL-10 isolate showed greater control of blue mold in Lime orange fruits, while ACBL-05 controlled the disease better in Murcott mandarin fruits.

Keywords: biofilm, competition for nutrients, nutritional sources

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por 76% da produção mundial de suco de laranja. Em termos nacionais, a atividade citrícola apresenta grande impacto na economia de 350 municípios do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, além dos benefícios sociais por meio de empregos diretos e indiretos, uma vez que, a atividade exige uma grande quantidade de mão de obra, especialmente durante a colheita (Neves & Trombin, 2017).

No entanto, ocorrem doenças na fase de pós-colheita dos citros, as quais podem acarretar na diminuição da quantidade e qualidade dos frutos e, dentre essas, encontra-se o bolor azul, causada por *Penicillium italicum* wehmer.

O fungo *P. italicum* provoca uma podridão mole nos frutos que é recoberta por micélio branco e grande número de esporos, na coloração azul. Em geral, as lesões apresentam uma faixa de micélio branco em torno da área de esporulação, cercada de uma faixa definida de massa aquosa na casca dos frutos. À medida que envelhecem as lesões tornam-se esverdeada, podendo ser confundidas com os sintomas ocasionados por *P. digitatum*, agente causal do bolor verde. O crescimento ótimo para *P. italicum* ocorre entre 22-24 °C, entretanto, o seu desenvolvimento pode ocorrer em temperaturas abaixo de 10 °C (Nascimento et al., 2014).

Essa doença pode ser prevenida por meio de uma colheita cuidadosa, de forma a minimizar a ocorrência de injúrias nos tecidos dos frutos, assim como pelo uso de fungicidas, como imazalil e tiabendazol, os quais têm sido eficientes na diminuição das perdas de frutos ocasionados por esse patógeno (Sun et al., 2013). No entanto, devido ao uso excessivo desses produtos, têm surgido linhagens resistentes do fitopatógeno a esses princípios ativos (Palou et al., 2002; Zhou et al., 2014).

Buscando estratégias alternativas de controle, espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de biocontrole contra fitopatógenos que ocorrem na fase de pós-colheita, não só em citros, mas também em outras culturas (Masih et al., 2001; Kupper et al., 2013; Ferraz et al., 2016; Cunha et al., 2018; Klein & Kupper, 2018). Alguns produtos à base de leveduras já são encontrados comercialmente, como o Blossom Protect™[®] (Bio-farming systems) utilizado

para o controle de *Erwinia amylovora* em pomáceas e ornamentais e BoniProtect® (Bio-farming systems) para controle de *Botrytis*, *Penicillium* e *Monilia* em pomáceas, que possuem como princípio ativo a levedura *Aureobasidium pullulans*, Shemer® (Agrogreen Minrav Infrastutres) para o controle de *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* em citros, *Penicillium expansum* em frutos de caroço, *Botrytis cinérea* e *Rhizopus stolonifer* em uva e morango, à base da levedura *Metschnikowia fructicola* e Yield Plus® (AnchorYeast, Cape Town, South Africa) para o controle de patógenos de pós colheita (*Botrytis* e *Penicillium*) em maçã e citros, e o seu princípio ativo é *Cryptococcus albidus*, (Droby et al., 2002; Bettiol, 2012).

Os isolados de *Candida stellimalicola* ACBL-05 e ACBL-10 foram obtidos de folha e flor de laranja Pera, respectivamente, do município de Leme. O isolado ACBL-05 apresentou eficiência de controle do bolor azul, quando aplicado de forma curativa e preventiva em frutos de laranja Pera. ACBL-10 apresentou 83% de controle da doença, quando frutos da mesma variedade foram tratados com a levedura de forma preventiva (Cunha, 2013).

No entanto, o processo para o desenvolvimento de uma formulação a base de microrganismos é complexo e requer muitos estudos preliminares antes mesmo de se chegar à confecção final do bioproduto. Portanto, esse estudo teve por objetivo avaliar: (i) a adição de fontes nutricionais em meio de cultivo de *C. stellimalicola* (ACBL-05 e ACBL-10) na atividade antagônica e na produção de células viáveis pela levedura; (ii) a produção de biofilme por *C. stellimalicola* e, (iii) avaliar a atividade antifúngica *in vivo* de *C. stellimalicola* contra *P. italicum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Os isolados ACBL-05 e ACBL-10 de *Candida stellimalicola* e o isolado de *P. italicum* pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de

Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros
Sylvio Moreira / IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil.

2.2 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de *Candida stellimalicola*

Este estudo teve por objetivo verificar a adição de fontes nutricionais em meio de cultivo dos isolados (ACBL-05 e ACBL-10) de *C. stellimalicola* o seu efeito na atividade antagônica contra *P. italicum*. Foram utilizados como fontes de nitrogênio: uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), nitrato de amônio (NH_4NO_3), triptona e nitrato de potássio (KNO_3) nas concentrações de 0,02; 0,1 e 0,5% (g/v). As fontes de micronutrientes testadas corresponderam a: boro (ácido bórico - H_3BO_4), cobre (sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), manganês (sulfato de manganês - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cobalto (cloreto de cobalto - $\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), ferro (cloreto de ferro - FeCl_3), zinco (sulfato de zinco - ZnSO_4) e molibdato (molibdato de amônio- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), com concentrações finais de 0,2; 0,05 e 1 mM (metodologia adaptada de Wiyono et al., 2008).

Frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido BD (batata-dextrose) estéril + fontes de nitrogênio e ou de micronutrientes, acrescidos de uma alíquota de 1 mL de suspensão da levedura (1×10^7 células/ mL) foram submetidos à agitação constante a 28 °C, em incubadora tipo shaker, por 72 horas. Em seguida, os caldos cultivados foram filtrados em papel de filtro Whatman® n.1 estéril e, posteriormente, amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL de BDA fundente. Em seguida, os meios foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, um disco de meio de cultivo (0,5 cm de diâmetro), contendo o fitopatógeno (7 dias de idade), foi transferido para o centro das placas. As testemunhas foram constituídas por placas de BDA contendo apenas o patógeno. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 27 °C durante 9 dias e a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia do patógeno, em dois sentidos perpendiculares.

As fontes de nitrogênio e de micronutrientes, que se mostraram mais eficientes quanto à inibição da colônia de *P. italicum*, foram, posteriormente, utilizadas em mistura de modo a otimizar a atividade antagônica dos isolados das leveduras

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 5 repetições.

2.3 Competição por nutrientes entre *Candida stellimalicola* e *Penicillium italicum*

Para o estudo da competição por nutrientes entre os isolados da levedura e o fitopatógeno, foram utilizadas diferentes fontes de nitrogênio (leucina, fenilalanina, prolina, sulfato de amônio e nitrato de amônio, a 0,5 e 1%) e de carbono (sacarose, maltose, galactose e frutose, a 0,5 e 1,0%) (Zhang et al., 2011). Quanto ao micronutriente foi utilizado cloreto de cobalto a 1 mM e 0,05 mM para ACBL-10 e ACBL-05, respectivamente. Para tal, uma alíquota de 10 µL da suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) juntamente com 10 µL da suspensão de esporos do fitopatógenos (1×10^5 conídios/mL) foram depositados em áreas demarcadas de lâminas previamente preparadas com ágar-água mais a adição das diferentes fontes de nutrientes. As testemunhas foram constituídas do patógeno sozinho ou, com a levedura em meio ágar-água sem nutrientes. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, em fotoperíodo 12/12h, a 25 °C, por 17 horas.

A germinação do fitopatógeno foi paralisada através da aplicação de azul láctico. A avaliação foi realizada através da contagem de esporos germinados ou não germinados, em um total de 100 conídios ao acaso, efetuando-se o cálculo da porcentagem de conídios germinados. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à largura do conídio. Utilizou-se de um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 6 repetições.

2.4 Adição de fontes nutricionais em meio de cultivo para produção de células de *Candida stellimalicola*

Esse ensaio teve por finalidade verificar o efeito de cloreto de cobalto (0,05 mM) e sulfato de amônio (0,02%) para a levedura ACBL-05 e do cloreto de cobalto (1 mM) para a levedura ACBL-10 em meio de cultura, na produção de células viáveis. Tais fontes foram selecionadas a partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores.

Uma alíquota de 1 mL da suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) foi transferida para frascos contendo 50 mL de meio líquido BD contendo as melhores fontes de nutrientes para cada levedura. Como testemunha, as leveduras foram cultivadas em meio BD sem adição do nutriente. As culturas foram incubadas a 28 °C em incubadoras tipo shaker a 150 rpm.

Amostras de 1 mL de cada cultura, referente a cada isolado da levedura, foram coletadas em diferentes tempos: 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 126, 128, 132, 138, 144, 168 e 192 horas. Para a ACBL-10 foram coletadas amostras, também, nos períodos de 216 e 240 horas.

Posteriormente, as culturas foram submetidas às diluições decimais e o plaqueamento foi realizado em placas de Petri contendo meio BDA. A avaliação foi realizada pela contagem de unidades formadoras de colônias após 48 horas do plaqueamento. A densidade populacional da levedura foi expressa em \log_{10} UFC/mL.

2.5 Produção de biofilme por *Candida stellimalicola*

Para verificar a produção de biofilme pela levedura, utilizou-se da metodologia de cristal violeta (CV) descrita por O'toole & Kolter (1998). Um mililitro de suspensão de *C. stellimalicola* – ACBL-05 e ACBL-10 (1×10^7 células/mL) ou de *P. italicum* (1×10^5 conídios/mL) foi transferido para frasco contendo 50 mL de meio BD e, incubados a 28 °C, sob agitação constante a 150 rpm. O período de incubação foi de 120, 150 e 192 horas, para o fitopatógeno, ACBL-05 e ACBL-10, respectivamente.

Após o período estabelecido para cada organismo, alíquotas de 100 μ L foram transferidas, simultaneamente, para tubos Falcon (com capacidade para 50mL) contendo 10 mL de meio BD. Os tratamentos para a levedura ACBL-05

corresponderam: 1) meio BD + levedura; 2) meio BD + levedura, com adição de cloreto de cobalto (0,05 mM) + sulfato de amônio (0,02%); 3) meio BD + levedura + fitopatógeno; 4) meio BD + levedura com adição de cloreto de cobalto (0,05 mM) + sulfato de amônio (0,02%)+ fitopatógeno; 5) meio BD + fitopatógeno. Para a levedura ACBL-10 os tratamentos corresponderam: 1) meio BD + levedura; 2) meio BD + levedura com adição de cloreto de cobalto (1 mM); 3) meio BD + levedura + fitopatógeno; 4) meio BD + levedura com adição de cloreto de cobalto (1 mM) + fitopatógeno; 5) meio BD + fitopatógenos. Como controle (branco) foi utilizado apenas o meio BD. As culturas foram incubadas a 28 °C e sob agitação constante a 150 rpm durante 150 e 192 horas para ACBL-05 e ACBL-10, respectivamente, considerando a fase estacionária de cada isolado de *C. stellimalicola*.

Para a quantificação do biofilme, o meio foi suavemente removido, os tubos lavados com 0,9% de NaCl e submetidos a uma solução de 0,1% de CV. Após 30 minutos, o CV não ligado foi removido e lavado três vezes com água destilada. O CV em cada tubo foi solubilizado pela adição de 10 mL de álcool 70% e a absorbância foi medida a 590 nm (UV / Vis Spectrometer Lambda Bio; Perkin Elmer). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 5 repetições.

2.6 Atividade antifúngica *in vivo* de *Candida stellimalicola*

Para este estudo foi realizado um ensaio de controle do bolor azul por *Candida stellimalicola* em frutos de laranja Lima (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerina (*C. reticulata* Blanco; *C. deliciosa* Tenore) e lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tan) que não sofreram tratamentos prévios na pós-colheita. Inicialmente, os frutos foram lavados com detergente neutro, e desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio (0,2% por 2 minutos). Após secagem, os mesmos foram feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas demarcadas e esterilizadas, a uma profundidade de 3 mm.

Em seguida, os frutos foram tratados com 20 µL de suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) contendo ou não cloreto de cobalto (0,05 mM) +

sulfato de amônio (0,02%) para a levedura ACBL-05 e contendo, ou não, cloreto de cobalto (1mM) para o isolado ACBL-10.

Os tratamentos dos frutos ocorreram 24 h antes ou 24 h depois da inoculação do fitopatógeno. Para inoculação, alíquotas de 20 µl da suspensão de *P. italicum* (1×10^4 conídios/mL) foram depositadas na região do ferimento.

Para o tratamento químico foi utilizado o fungicida Imazalil (2 mL/L). O controle negativo correspondeu aos frutos tratados apenas com água destilada e esterilizada.

Após os tratamentos e inoculação, os frutos foram armazenados em caixas de propileno com tampa (40x30x15 cm) e, incubados a 10 ± 3 °C e $90 \pm 3\%$ umidade relativa (UR).

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por três repetições, com 20 frutos por repetição. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre o tamanho médio das lesões ocasionadas por *P. italicum*, foi efetuado o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que é expressa pela plotagem da proporção de doença em porcentagem versus o tempo (Bergamin Filho & Amorim, 1996). A AACPD foi determinada pela fórmula descrita por Shaner & Finney (1977):

$$\text{AACPD} = \sum^{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i)/2] * [(T_{i+1} - T_i)]; \text{ onde:}$$

n – é o número de observações/avaliações;

Y_i – proporção da doença na “i”- ésima observação/avaliação;

T_i – é o tempo em dias na “i”- ésima observação/avaliação.

O início da avaliação da severidade foi realizado 40 dias após a inoculação em frutos de laranja Lima e tangerina Murcott, enquanto que, para os frutos de lima ácida Tahiti, a avaliação se deu 27 dias após a inoculação do fitopatógeno.

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística AgroEstat e a comparação das médias foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de *Candida stellimalicola*

Os dados referentes ao efeito da adição de fontes de nitrogênio e micronutrientes em meio de cultivo da levedura na atividade antagônica de *C. stellimalicola* (ACBL-05 e ACBL-10) contra *P. italicum* encontram-se nas Tabelas 1 a 6.

Os dados obtidos com o isolado ACBL-05 mostram que, a adição de fontes de nutrientes no cultivo da levedura, como cloreto de cobalto (0,05 mM), sulfato de amônio (0,02%) e nitrato de amônio (0,1%) apresentaram os melhores resultados, com porcentagens de inibições da colônia do *P. italicum* de 37, 56 e 65%, respectivamente, quando comparado com o tratamento testemunha (Tabelas 1 e 2). A combinação das fontes sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM) proporcionou inibições da colônia do fungo de 81,33% (Tabela 3).

Ao se avaliar o efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de ACBL-10, verificou-se que, a levedura previamente cultivada em meio BD acrescido de nitrato de amônio (0,1%) proporcionou 66% de inibição da colônia de *P. italicum* (Tabela 4).

Os resultados mostraram, ainda, que a maioria das fontes de micronutrientes, independente da concentração, quando adicionada ao meio de cultivo da levedura, favoreceu o antagonismo contra o fitopatógeno, com valores de inibição da colônia do fungo que variaram de 33 (molibdato a 1 mM) a 75% (cloreto de cobalto a 1mM) (Tabela 5). A combinação das melhores fontes de nitrogênio (Nitrato de amônio 0,1%) e micronutriente (sulfato de manganês 0,05% e/ou cloreto de cobalto 1mM) em meio de cultivo da levedura favoreceram a inibição da colônia do patógeno, com valores de inibições que variaram de 44 a 72% em relação à testemunha. No entanto, quando cloreto de cobalto (1 mM) foi utilizado sozinho, a porcentagem de controle foi maior inibindo em torno de 80% a colônia de *P. italicum* (Tabela 6).

Tabela 1 Efeito da fonte de nitrogênio no cultivo da levedura ACBL-05 na atividade antagônica de *Penicillium italicum*. Incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio da colônia (cm)	% inibição em relação à testemunha
ACBL-05 + Sulfato de amônio 0,5%	2,82 a	- 25,89
ACBL-05 + Triptona 0,1%	2,39 ab	- 6,69
Testemunha	2,24 abc	-
ACBL-05 + Sulfato de amônio 0,1%	1,97 abcd	12,06
ACBL-05 + Uréia 0,5%	1,83 abcd	18,31
ACBL-05 + Nitrato de potássio 0,02%	1,57 bcd	29,92
ACBL-05 + Triptona 0,02%	1,46 bcd	34,83
ACBL-05 + Nitrato de amônio 0,5%	1,34 bcd	40,18
ACBL-05 + Uréia 0,02%	1,32 bcd	41,08
ACBL-05 + Nitrato de amônio 0,02%	1,30 bcd	41,97
ACBL-05 + Uréia 0,1%	1,22 bcd	45,54
ACBL-05 + Triptona 0,5%	1,20 bcd	46,43
ACBL-05 + Nitrato de potássio 0,5%	1,08 cd	51,79
ACBL-05 + Nitrato de potássio 0,1%	1,02 cd	54,47
ACBL-05 + Sulfato de amônio 0,02%	0,98 d	56,25
ACBL-05 + Nitrato de amônio 0,1%	0,78 d	65,18

(¹) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 2 Efeito da fonte de micronutrientes no cultivo da levedura ACBL-05 na atividade antagônica de *Penicillium italicum*. Incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio da colônia (cm)	% inibição de em relação à testemunha
Testemunha	2,32 a	-
ACBL-05 + sulfato de cobre 0,05 mM	2,13 ab	8,19
ACBL 05+ cloreto de ferro 0,05 mM	2,05 abc	11,64
ACBL-05 + Sulfato de manganês 0,05 mM	2,04 abc	12,07
ACBL-05 + cloreto de ferro 0,2 mM	2,02 abcd	12,94
ACBL-05 + sulfato de manganês 0,2 mM	2,01 abcde	13,37
ACBL-05 + molibdato 1 mM	2,01 abcde	13,37
ACBL-05 + cloreto de ferro 1 mM	2,00 abcde	13,8
ACBL-05 + ácido bórico 1 mM	1,97 abcde	15,09
ACBL-05 + sulfato de manganês 1 mM	1,92 abcdef	17,25
ACBL-05 + sulfato de cobre 0,2 mM	1,92 abcdef	17,25
ACBL-05 + sulfato de cobre 1 mM	1,88 abcdefg	18,97
ACBL-05 + ácido bórico 0,2 mM	1,81 bcdefg	21,99
ACBL-05 + cloreto de cobalto 0,2 mM	1,80 bcdefg	22,42
ACBL-05 + Sulfato de zinco 0,05 mM	1,78 bcdefg	23,26
ACBL-05 + sulfato de zinco 0,2 mM	1,68 bcdefg	27,59
ACBL 05 + molibdato 0,05 mM	1,66 bcdefg	28,45
ACBL 05+ ácido bórico 0,05 mM	1,57 defg	32,33
ACBL 05+ molibdato 0,2 mM	1,57 defg	32,33
ACBL 05 + sulfato de zinco 1 mM	1,56 efg	32,76
ACBL 05 + cloreto de cobalto 1mM	1,47 fg	36,44
ACBL 05 + cloreto de cobalto 0,05 mM	1,46 g	37,07

(¹) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 3 Efeito das fontes de nitrogênio e micronutrientes, combinados ou não, no cultivo de *Candida stelimallicola*-ACBL-05 e seu efeito no crescimento micelial de *Penicillium italicum*. Incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	% inibição em relação à testemunha
Testemunha	2,21 a	-
ACBL-05 + cloreto de cobalto 1 mM	1,62 b	51,03
ACBL-05 + nitrato de amônio 0,1% + cloreto de cobalto 1 mM	1,57 bc	49,45
ACBL-05 + sulfato de amônio 0,02% + cloreto de cobalto 1 mM	1,39 bcd	66,75
ACBL-05 + cloreto de cobalto 0,05 mM	1,29 bcd	72,67
ACBL -05 + nitrato de amônio 0,1 %	1,27 bcd	74,49
ACBL-05 + sulfato de amônio 0,02%	1,20 cd	78,14
ACBL-05 + Nitrato de amônio 0,1% + cloreto de cobalto 0,05 mM	1,19 cd	78,82
ACBL-05 + sulfato de amônio 0,02% + cloreto de cobalto 0,05 mM	1,14 d	81,33

(¹) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Tabela 4 Porcentagem de inibição da colônia de *Penicillium italicum* por *Candida stellimalicola*-ACBL-10, após cultivo da levedura em meio batata-dextrose acrescido de diferentes fontes nitrogenadas. Incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio da colônia (cm)	% inibição em relação à testemunha
ACBL-10 + triptona 0,02%	1,58 a ⁽¹⁾	-4,12
Testemunha	1,56 a	-
ACBL- 10 + nitrato de potássio 0,5%	1,56 a	0,00
ACBL-10 + Nitrato de amônio 0,5%	1,54 a	1,55
ACBL-10 + sulfato de amônio 0,1%	1,53 a	4,13
ACBL-10 + triptona 0,1%	1,49 ab	10, 83
ACBL-10 + nitrato de amônio 0,02%	1,46 ab	14,95
ACBL-10 + triptona 0,5%	1,44 ab	18,05
ACBL-10 + Uréia 0,1%	1,44 ab	18,05
ACBL-10 + sulfato de amônio 0,02%	1,42 ab	20,62
ACBL-10 + Uréia 0,5%	1,40 ab	23,20
ACBL-10 + sulfato de amônio 0,5%	1,39 ab	18,56
ACBL-10 + Nitrato de potássio 0,1%	1,30 ab	32,48
ACBL-10 + Nitrato de potássio 0,02%	1,15 ab	54,13
ACBL-10 + uréia 0,02%	1,14 ab	54,13
ACBL-10+ Nitrato de amônio 0,1%	1,05 b	65,98

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Tabela 5 Porcentagem de inibição da colônia de *Penicillium italicum* por *Candida stellimalicola*-ACBL-10, após cultivo da levedura em meio batata-dextrose, acrescido de diferentes fontes de micronutrientes e sob incubação das culturas a 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio da colônia (cm)	% inibição em relação à testemunha
Testemunha	3,23 a ⁽¹⁾	-
ACBL-10+ sulfato de manganês 1 mM	2,46 ab	23,84
ACBL 10+ molibdato 1 mM	2,17 bc	32,82
ACBL-10 + ácido bórico 0,05 mM	2,11 bc	34,68
ACBL-10 + molibdato 0,2 mM	1,86 bcd	45,42
ACBL-10 + sulfato de zinco 0,2 mM	1,75 bcde	45,83
ACBL-10 + molibdato 0,05 mM	1,58 cdef	51,09
ACBL-10 + sulfato de zinco 1 mM	1,54 cdef	52,33
ACBL-10+ sulfato de manganês 0,2 mM	1,46 cdef	54,08
ACBL-10 + cloreto de ferro 0,2 mM	1,35 cdef	58,21
ACBL- 10 + ácido bórico 1 mM	1,34 cdef	58,52
ACBL- 10 + sulfato de cobre 0,05 mM	1,18 def	63,16
ACBL-10 + cloreto de cobalto 0,2 mM	1,15 def	64,4
ACBL-10 + cloreto de ferro 1 mM	1,14 def	64,71
ACBL-10 + sulfato de cobre 0,2 mM	1,11 def	66,26
ACBL-10 + sulfato de cobre 1 mM	1,09 def	67,81
ACBL 10+ sulfato de zinco 0,05 mM	1,04 def	65,64
ACBL 10+ cloreto de cobalto 0,05 mM	1,03 def	68,12
ACBL 10+ ácido bórico 0,2 mM	0,97 ef	69,97
ACBL 10 + cloreto de ferro 0,05 mM	0,96 ef	70,28
ACBL10+sulfato de manganês 0,05mM	0,85 f	73,69
ACBL 10 + cloreto de cobalto 1mM	0,81 f	74,93

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 6 Efeito das fontes de nitrogênio e micronutrientes, combinados ou não, no cultivo da levedura ACBL-10 e seu efeito no tamanho da colônia de *Penicillium italicum*. Incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio da colônia (cm)	% inibição em relação à testemunha
Testemunha	4,68 a ⁽¹⁾	-
ACBL-10 + Nitrato de amônio 0,1%	3,37 b	43,81
ACBL-10 + nitrato de amônio 0,1% + sulfato de manganês 0,05 mM	2,63 c	50,65
ACBL-10+sulfato de manganês 0,05 mM	2,31c	28,00
ACBL-10 + Nitrato de amônio 0,1% + cloreto de cobalto 1 mM	1,33 d	71,59
ACBL-10 + cloreto de cobalto 1 mM	0,95 d	79,71

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

3.2 Competição por nutrientes entre *Candida stellimalicola* e *Penicillium italicum*

Os resultados do estudo de competição por nutrientes entre *C. stellimalicola* e *P. italicum*, avaliados pela germinação do fitopatógeno encontram-se nas Tabela 7 e 8. Os dados mostraram que, quando se adicionou a fonte sacarose (1%) ao meio de cultivo do isolado ACBL-05, a porcentagens de inibição da germinação de conídios foi de 47,58 %, quando comparado com o tratamento testemunha (85% de conídios de *P. italicum* germinados), enquanto que as demais fontes e concentrações apresentaram taxas de inibições que variaram de 5,14 a 44,38%, não diferindo, estatisticamente, da testemunha. Tal resultado sugere que o fungo compete com a levedura apenas por essa fonte de carbono (Tabela 7).

Ao se adicionar as fontes leucina (1%) e cloreto de cobalto (1 mM) ao meio de cultivo do isolado ACBL-10, as porcentagens de inibição da germinação de conídios foram de 51 e 71%, respectivamente, enquanto que as demais fontes e concentrações apresentaram taxas de inibições que variaram de 34 a 49%, diferindo estatisticamente do tratamento testemunha. A levedura cultivada em meio ágar-água, sem adição de nutrientes, proporcionou 76% de inibição da germinação de conídios de *P. italicum*. Portanto, independentemente da fonte, *C. stellimalicola*-ACBL-10 inibe a germinação, mostrando que a competição por nutrientes não é um mecanismo de ação desse isolado de levedura.

Tabela 7 Porcentagem de inibição da germinação de conídios de *Penicillium italicum* sob ação de *Candida stellimalicola*-ACBL-05 cultivada em meio ágar-água, acrescido de diferentes fontes de nutrientes. Incubação das culturas à 25 °C, em um período de 17 horas.

Tratamentos	% conídios germinados <i>P. italicum</i>	% inibição em relação a testemunha
Testemunha	84,50 a ⁽¹⁾	-
ACBL-05 + Prolina 1%	80,16 ab	5,14
ACBL-05 + Sulfato de amônio 0,5 %	70,83 ab	16,18
ACBL-05	68,83 ab	18,55
ACBL- 05 + Fenilalanina 0,5%	68,67 ab	18,74
ACBL-05+ Nitrato de amônio 0,5%	67,17 ab	20,51
ACBL-05 + Galactose 0,5%	67,00 ab	20,72
ACBL-05 + Sulfato de amônio 1%	66,67 ab	21,11
ACBL-05 + Frutose 1%	66,50 ab	21,31
ACBL-05 + Frutose 0,5 %	66,00 ab	21,9
ACBL-05 +Galactose 1 %	65,67 ab	22,29
ACBL-05 + Maltose 0,5%	65,00 ab	23,08
ACBL-05 + Prolina 0,5%	62,83 ab	25,65
ACBL-05 + Sacarose 0,5%	61,83 ab	26,83
ACBL-05 + Maltose 1%	59,83 ab	29,2
ACBL-05+ Leucina 1%	58,67 ab	30,57
ACBL-05 + Nitrato de amônio 1%	56,50 ab	33,14
ACBL-05 + Leucina 0,5%	54,33 ab	35,71
ACBL-05 + Cloreto de cobalto 0,05 mM	50,50 ab	40,24
ACBL-05 + Fenilalanina 1%	47,00 ab	44,38
ACBL-05 + Sacarose 1%	44,33 b	47,58

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 8 Porcentagem de inibição da germinação de conídios de *Penicillium italicum* sob ação de *Candida stellimalicola*-ACBL-10 cultivada em meio ágar-água, acrescido de diferentes fontes de nutrientes. Incubação das culturas à 25 °C, em um período de 17 horas.

Tratamentos	% conídios germinados <i>P. italicum</i>	% inibição em relação a testemunha
Testemunha	81,23 a ⁽¹⁾	-
ACBL-10 + Galactose 0,5%	75,16 ab	7,48
ACBL-10 + Maltose 1%	72,16 ab	11,17
ACBL-10 + Sacarose 1%	71,00 abc	12,6
ACBL-10 + Galactose 1%	69,33 abcd	14,65
ACBL-10+ Maltose 0,5%	68,66 abcd	15,48
ACBL-10 + Prolina 1%	66,33 abcde	18,35
ACBL-10 + Sacarose 0,5%	65,00 abcdef	19,99
ACBL-10 + Fenilalanina 1%	61,16 abcdef	20,71
ACBL-10 + Frutose 0,5 %	57,50 abcdef	29,22
ACBL-10 +Nitrato de amônio 1 %	56,83 abcdef	30,04
ACBL-10 + Fenilalanina 0,5%	55,66 abcdef	31,48
ACBL-10 + Leucina 0,5%	53,66 bcdef	33,95
ACBL-10 + Sulfato de amônio 1%	51,50 bcdef	36,60
ACBL-10 + Prolina 0,5%	44,66 cdefg	45,00
ACBL-10+ Sulfato de amônio 0,5%	43,00 defg	47,07
ACBL-10 + Frutose 1%	41,33 efg	49,12
ACBL-10 + Nitrato de amônio 0,5%	41,33 efg	49,12
ACBL-10 + Leucina 1%	39,66 fg	51,18
ACBL-10 + Cloreto de cobalto 1 mM	23,66 g	70,88
ACBL-10	19,66 g	75,8

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

3.3 Adição de fontes nutricionais em meio de cultivo para produção de células de *Candida stellimalicola*

Os dados do efeito do meio de cultivo e do período de incubação na produção de células de *Candida stellimalicola*-ACBL-05 encontram-se na Figura 1. A curva de crescimento do isolado ACBL-05 variou em função da adição das fontes nutricionais em meio de cultivo da levedura. Com ou sem adição das fontes, a fase exponencial iniciou a partir das 12 horas de incubação do microrganismo, porém, variou quanto ao pico de produção de células, que foi de 144 e 168 horas, quando a levedura foi cultivada na presença e ausência das fontes, respectivamente. A levedura cultivada em meio com adição das fontes apresentou uma fase estacionária mais bem definida que foi de 144-168 horas. A fase de declínio do isolado, independente da adição de fontes nutricionais foi de 192 horas.

O isolado ACBL-10, cultivado em meio de cultivo com ou sem adição de cloreto de cobalto (1 mM) apresentou a maior produção de células (fase exponencial) no período 168 horas, entrando a seguir na sua fase estacionária que foi até 216 horas e, a partir daí entrou na fase de declínio. A fase lag da levedura, quando cultivada na ausência do micronutriente, foi num período menor do que 12 horas, porém, não foi possível uma definição melhor. No entanto, a levedura cultivada em meio acrescido de cloreto de cobalto mostrou uma a fase lag mais definida, ocorrendo num período de 12 horas (Figura 2).

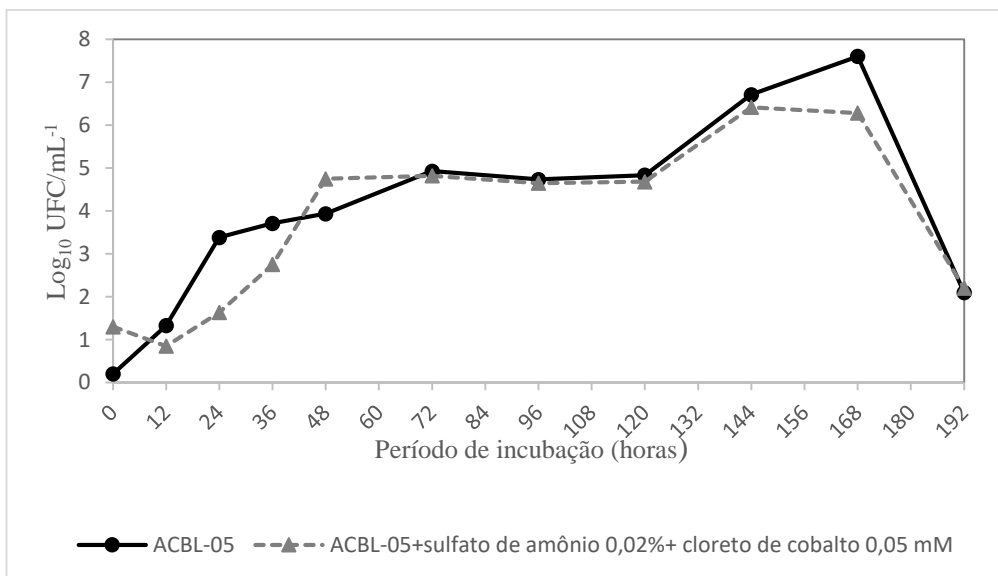


Figura 1. Produção de células de *Candida stellimalicola*- ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose, acrescido, ou não, de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM), após diferentes períodos de incubação a 28 °C.

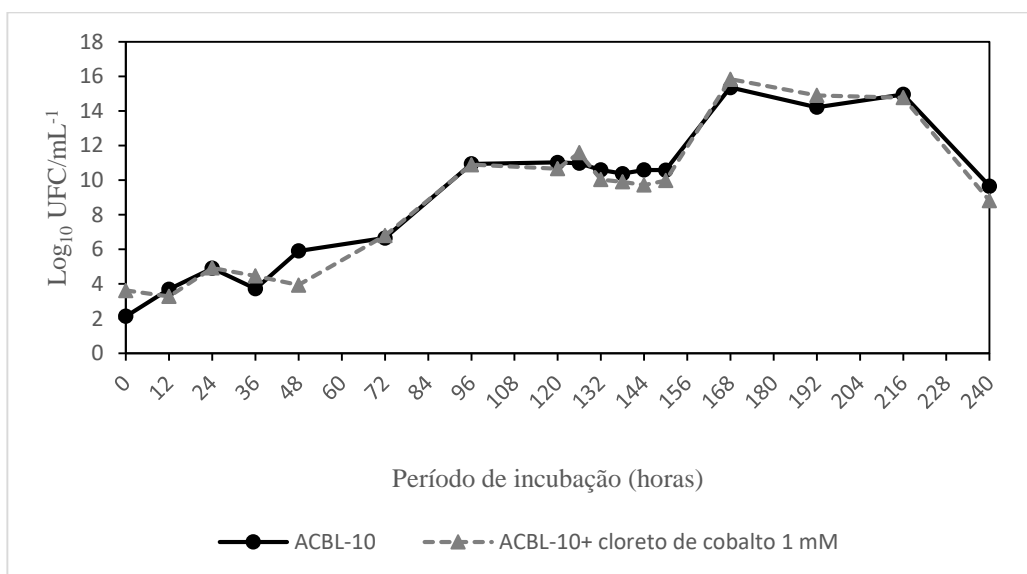


Figura 2. Produção de células de *Candida stellimalicola*-ACBL-10 cultivada em meio batata-dextrose, acrescido, ou não, de cloreto de cobalto (1 mM), após diferentes períodos de incubação a 28 °C.

3.4 Produção de biofilme por *Candida stellimalicola*

Os dados apresentados na Figura 3 mostram que o isolado ACBL-05 produz biofilme, porém quando cultivada em meio acrescido de sulfato de amônio (0,02%) mais cloreto de cobalto (0,05 mM) essa produção diminui. A quantidade de biofilme produzido reduz ainda mais na presença do fitopatógeno, independente se o meio de cultivo da levedura está, ou não, acrescido das fontes nutricionais. Os dados mostram, ainda, que o patógeno não produz biofilme.

Com relação à produção de biofilme pelo isolado ACBL-10 de *C. stellimalicola*, os dados encontram-se na Figura 4.

Verifica-se que, que o isolado produz biofilme, no entanto, quando na presença do micronutriente (cloreto de cobalto 1 mM) essa produção aumenta, significativamente, em torno de 3 vezes mais. Porém, na presença do patógeno, ocorre uma diminuição da produção de biofilme, independente da adição da fonte em meio de cultivo da levedura.

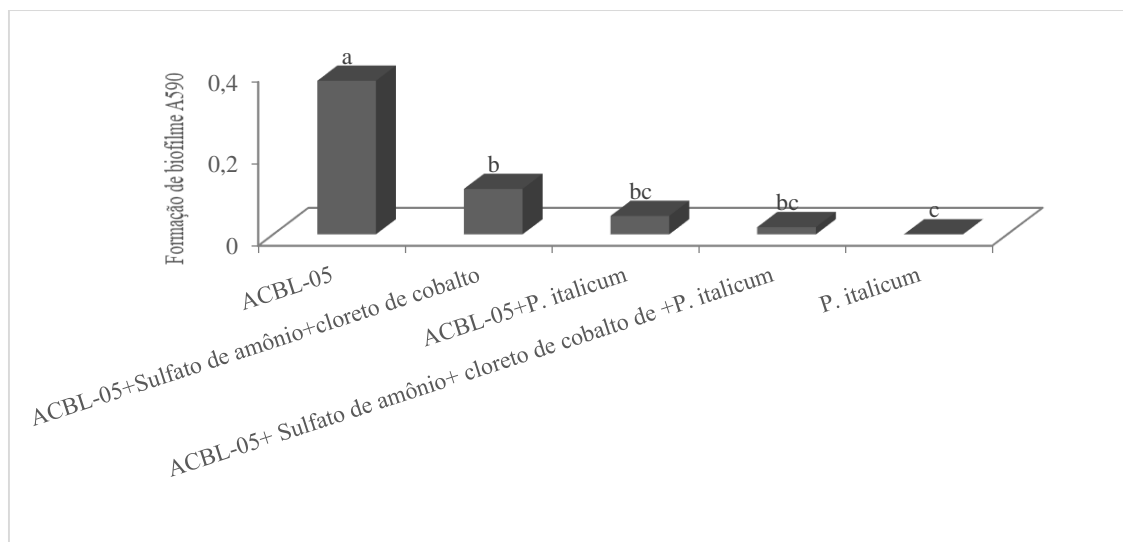


Figura 3. Produção de biofilme por *Candida stellimalicola*-ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose acrescido, ou não, de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM), na presença ou na ausência de *Penicillium italicum*.

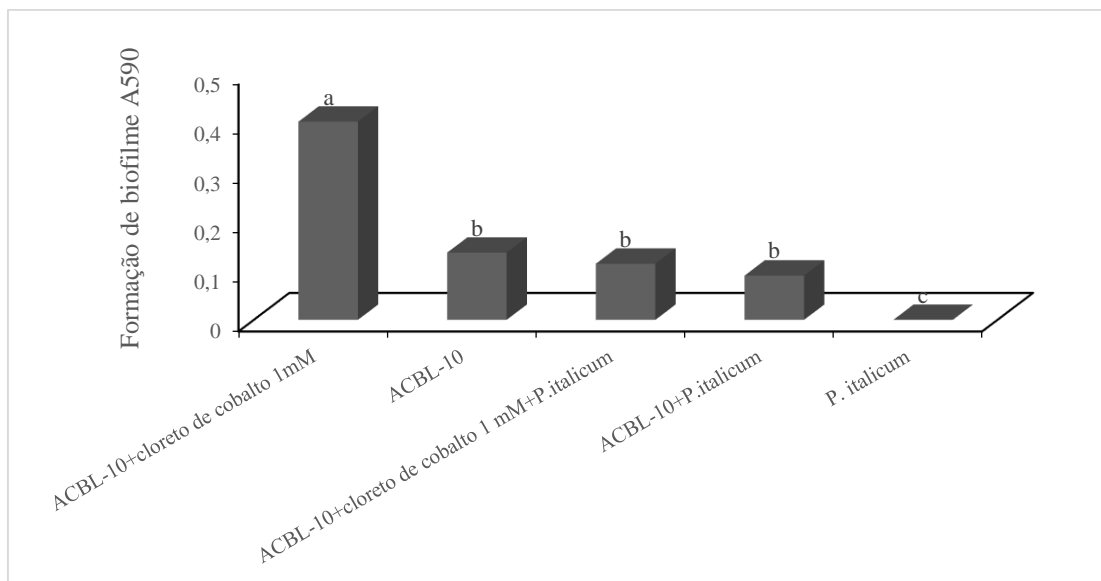


Figura 4. Produção de biofilme por *Candida stellimalicola*-ACBL-10 cultivada em meio batata-dextrose acrescido, ou não, de cloreto de cobalto (1 mM), na presença ou na ausência de *Penicillium italicum*.

3.5 Atividade antifúngica *in vivo* de *Candida stellimalicola*

3.5.1 ACBL-05

Os frutos tratados preventivamente com o isolado *C. stellimalicola* ACBL-05, cultivado em meio BD sem a adição das fontes de nutrientes, proporcionaram os menores tamanhos de lesões de bolor azul, não diferindo, estatisticamente, do tratamento químico. Os demais tratamentos apresentaram valores de lesões intermediários, não diferindo dos melhores tratamentos e nem da testemunha (Figura 5).

Com relação aos dados de incidência da doença as menores porcentagens de frutos doentes ocorreram quando a levedura foi aplicada de forma preventiva, proporcionando 45% de controle não diferindo do tratamento com imazali com 100% de frutos assintomáticos (Figura 6 e 7).

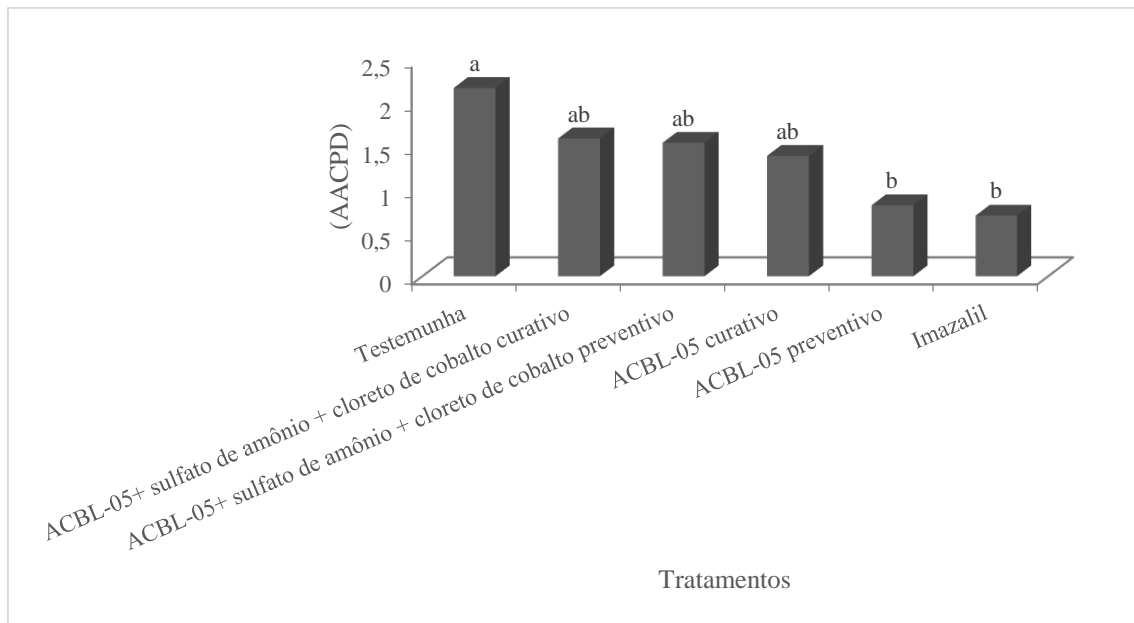


Figura 5. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) determinada por meio do diâmetro médio das lesões de bolor azul em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de sulfato de amônio (0,02 %) e cloreto de cobalto (0,05 mM).

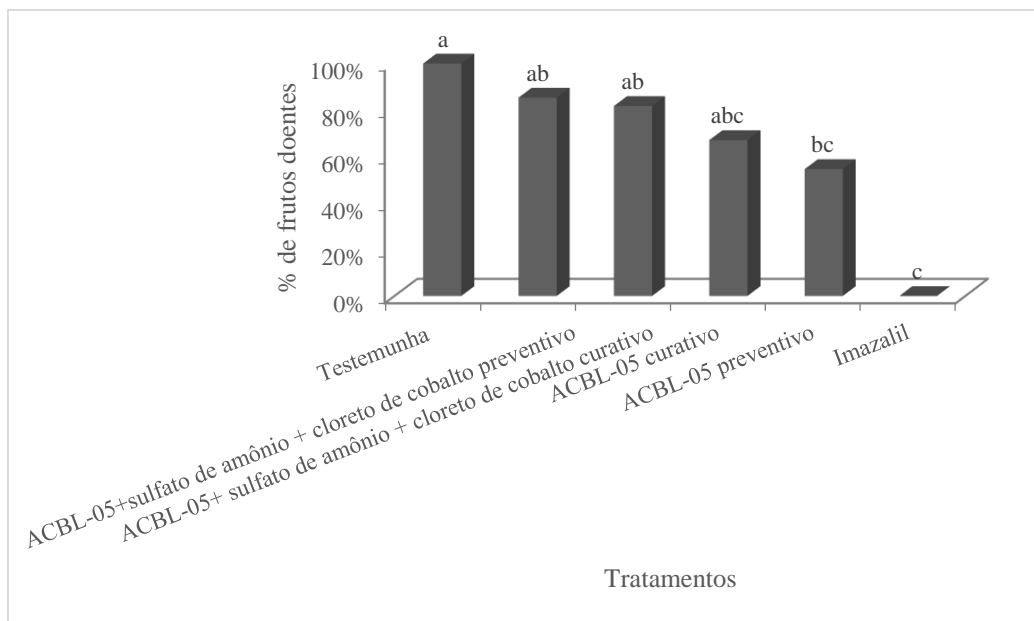


Figura 6. Porcentagem de frutos doentes de laranja Lima, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM).



Figura 7. Frutos de laranja Lima inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A- preventivamente com *Candida stellimalicola*-ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose; B- Testemunha (sem tratamento) e C- Imazalil.

Quando se avaliou a severidade da doença em frutos de tangerina Murcott, os melhores tratamentos foram: ACBL-05 (cultivado em meio BD com adição de sulfato de amônio e cloreto de cobalto) aplicado tanto de forma preventiva como curativa e, imazalil. Tais tratamentos diminuíram, significativamente, o tamanho das lesões de bolor azul em relação ao tratamento testemunha (Figura 8).

Pelos dados de incidência da doença, verifica-se que, frutos tratados com a levedura, previamente cultivada em meio BD com a adição das fontes de nutrientes, proporcionaram 50 e 53% de controle, quando o tratamento ocorreu de forma preventiva e curativa, respectivamente (Figura 9). Os melhores resultados de controle da doença encontram-se ilustrados na Figura 10.

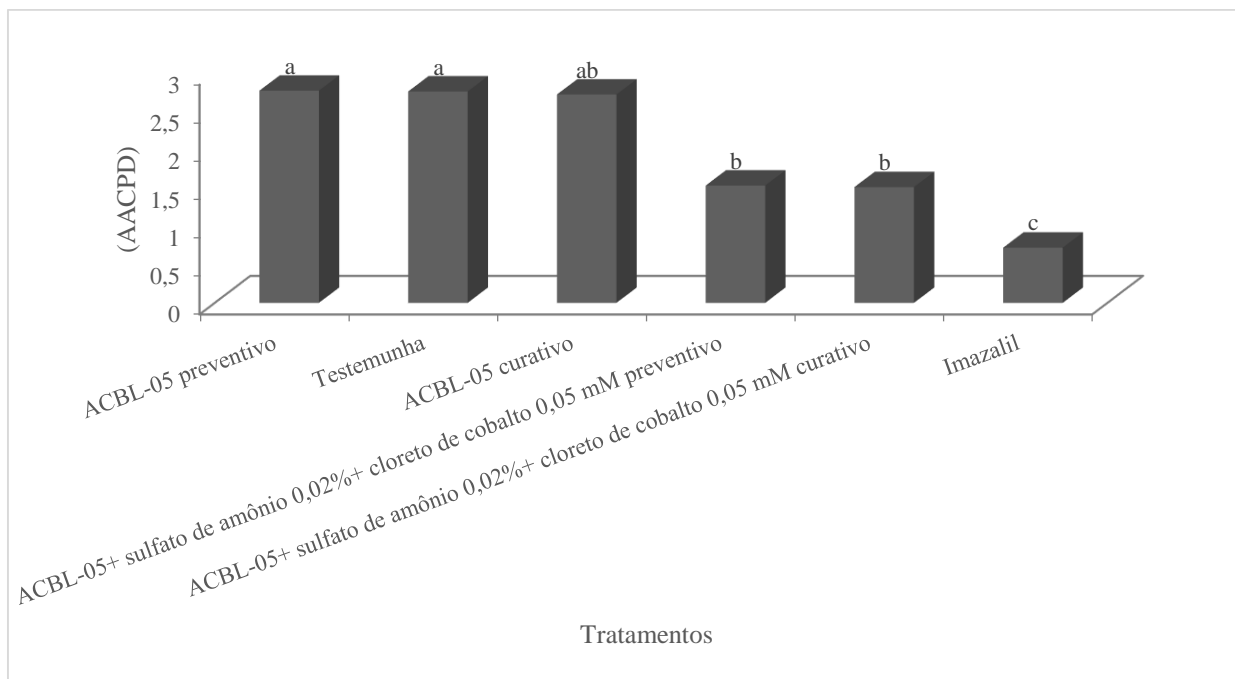


Figura 8. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões de bolor azul em frutos de tangerina Murcott, após inoculação e tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada previamente em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (0,05 mM) + sulfato de amônio (0,02%).

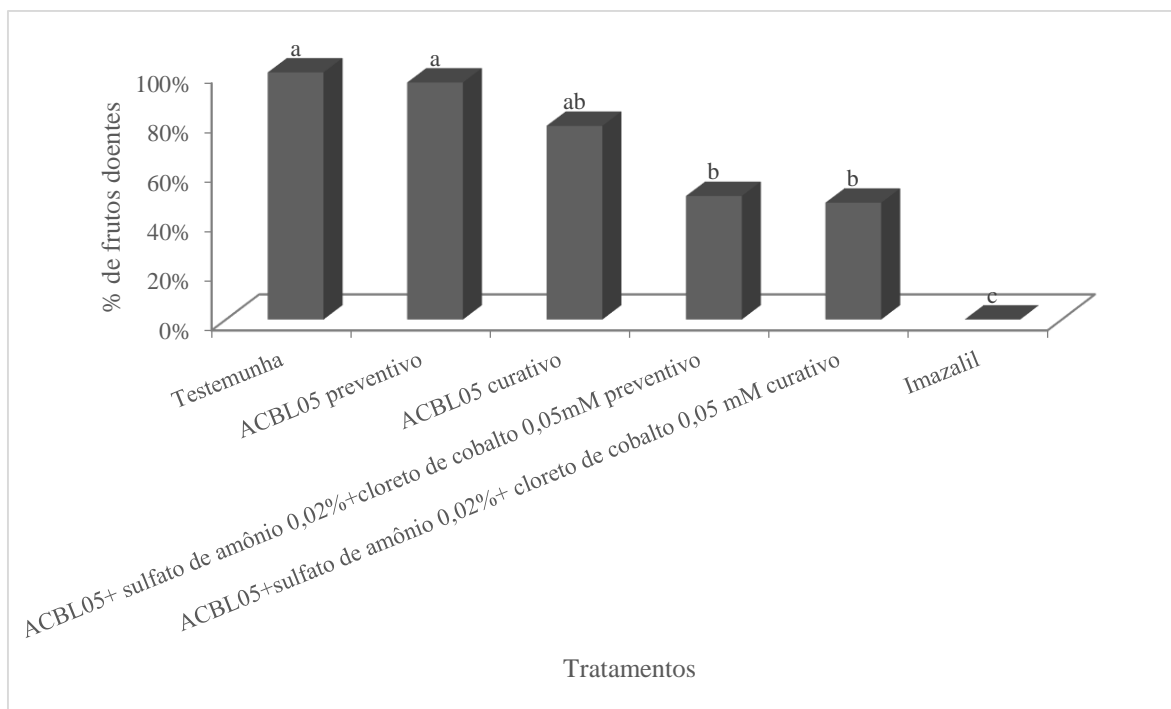


Figura 9. Porcentagem de frutos doentes de tangerina Murcott, após inoculação e tratamento preventivo, ou curativo, com *Candida stellimalicola*-ACBL-05,

cultivada previamente em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (0,05 mM) + sulfato de amônio (0,02%).



Figura 10. Frutos de tangerina Murcott inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A-Tratamento preventivo de *Candida stellimalicola*- ACBL-05, previamente cultivada em meio batata-dextrose, acrescido das fontes (cloreto de cobalto (0,05 mM) + sulfato de amônio (0,02%)); B- Tratamento curativo de *Candida stellimalicola*- ACBL-05 cultivada em meio batata-dextrose acrescido de fontes; C- Testemunha (sem tratamento) e D- Imazalil.

Com relação aos dados de controle de bolor azul em frutos de lima ácida Tahiti, os melhores tratamentos foram: frutos tratados com imazalil e com a levedura ACBL-05 (cultivada em meio BD) aplicada de forma preventiva, sendo que esse último não diferiu estatisticamente da aplicação da levedura, cultivada em meio BD + fontes (cloreto de cobalto (0,05 mM) + sulfato de amônio a 0,02%) e aplicada curativamente, esses tratamentos diminuíram, significativamente, o tamanho das lesões em relação ao tratamento testemunha (Figura 11). Em relação à avaliação da incidência da doença, todos os tratamentos avaliados não proporcionaram controle da doença, com 95 e 100% de frutos doentes (Figura 12 e 13).

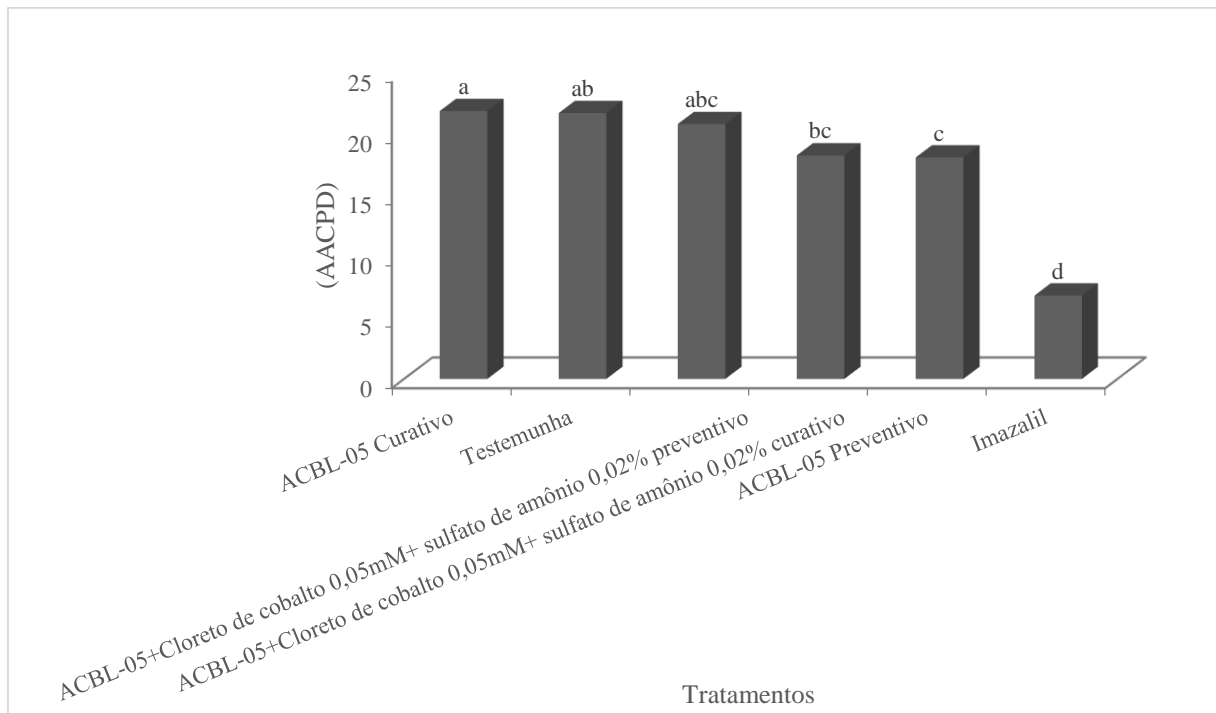


Figura 11. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões de bolor azul em frutos de lima ácida Tahiti, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, previamente cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM).

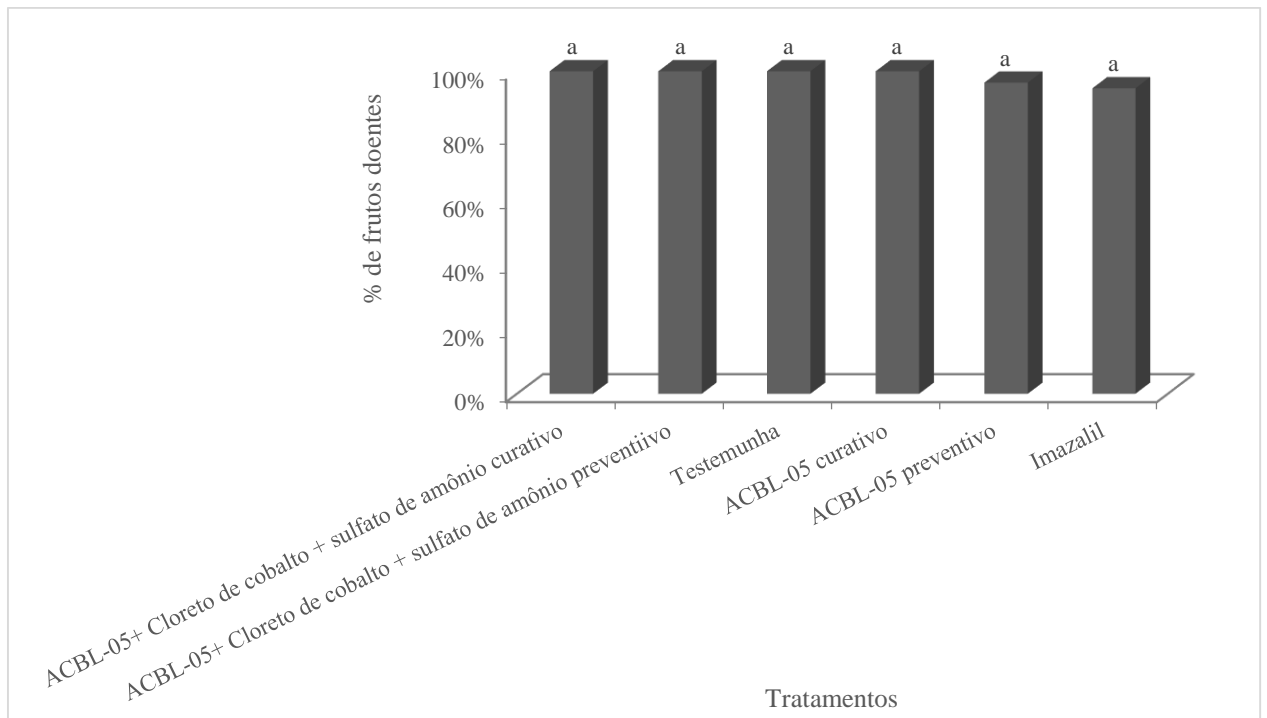


Figura 12. Porcentagem de frutos doentes de lima ácida Tahiti, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo, ou curativo, com *Candida stellimalicola*-ACBL-05, previamente cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de sulfato de amônio (0,02%) e cloreto de cobalto (0,05 mM).

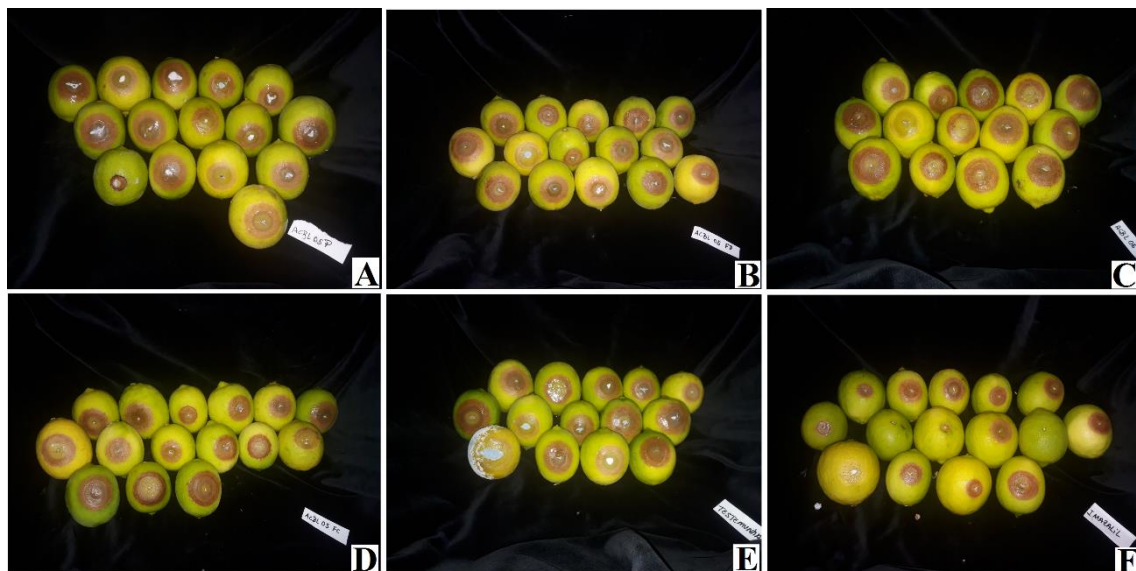


Figura 13. Frutos de lima ácida Tahiti inoculadas por *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose de forma preventiva: B- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (0,05 mM)+ sulfato de amônio (0,02%), preventivo C- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, de forma curativa D- *Candida stellimalicola*-ACBL-05, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (0,05 mM)+

sulfato de amônio (0,02%), curativo E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil .

3.5.2 ACBL-10

Com relação aos resultados de controle de bolor azul pelo isolado ACBL-10, os dados mostraram que, ao se avaliar a severidade da doença em frutos de laranja Lima, os melhores tratamentos foram: ACBL-10 (cultivada em meio BD sem adição de cloreto de cobalto) aplicada de forma preventiva e o tratamento com imazalil, os quais diminuiram, significativamente, o tamanho das lesões em relação ao tratamento testemunha, não diferindo, estatisticamente, entre si. Os dois tratamentos, também, não diferiram estatisticamente das aplicações da levedura com a adição de cloreto de cobalto (1 mM) aplicados tanto de forma curativa como preventiva (Figura 14). Em relação à avaliação da incidência da doença, a levedura aplicada preventivamente e o produto químico (imazalil) proporcionaram 75% e 100% de frutos assintomáticos, respectivamente (Figura 15). Os melhores resultados *in vivo* encontram-se na Figura 16.

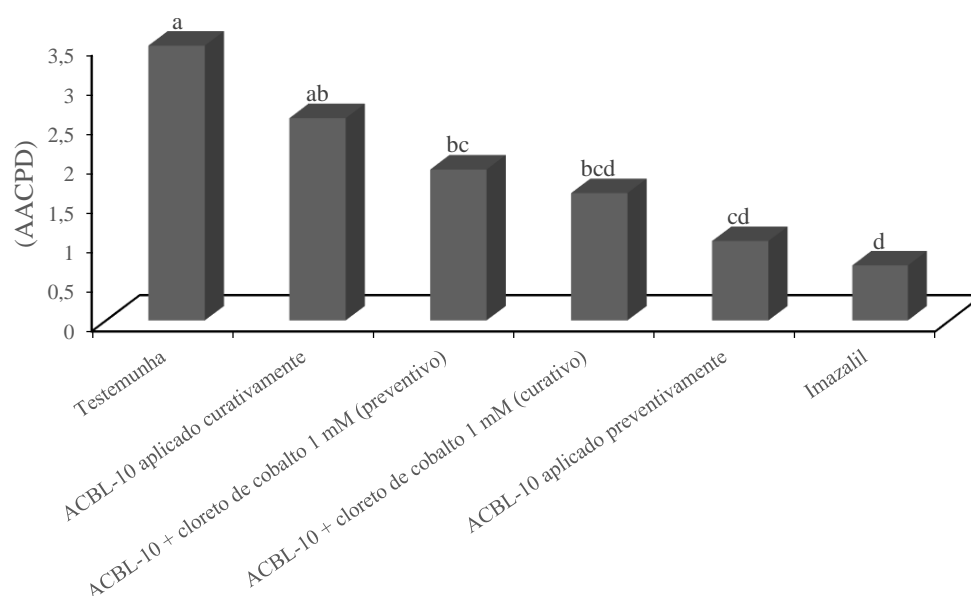


Figura 14. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-

10, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de cloreto de cobalto (1 mM).

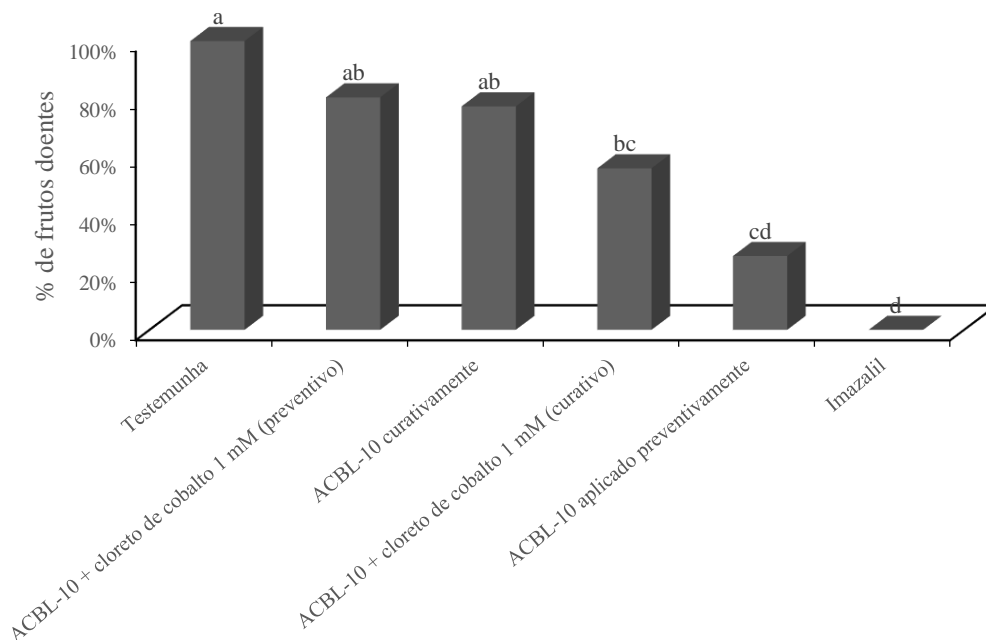


Figura 15. Porcentagem de frutos com sintomas ocasionados por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (1 mM).



Figura 16. Frutos de laranja Lima inoculados com o fungo *Penicillium italicum*, e tratados com: A- *Candida stellimalicola*- ACBL-10 cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento preventivo B- Testemunha (sem tratamento) e C- Imazalil.

Na avaliação da severidade da doença em frutos de tangerina Murcott, todos os tratamentos contendo a levedura não diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. Frutos tratados com o fungicida imazalil foi o que proporcionou os menores tamanho de lesões, embora não tenha diferido dos tratamentos com a levedura, previamente cultivada na presença de cloreto de cobalto (1 mM) e aplicada preventivamente e curativamente (Figura 17). Em relação à avaliação da incidência da doença, a levedura com adição do cloreto de cobalto (1 mM) quando aplicada de forma curativa e o produto químico (imazalil) proporcionaram 45% e 96% de frutos assintomáticos, respectivamente (Figura 18 e 19).

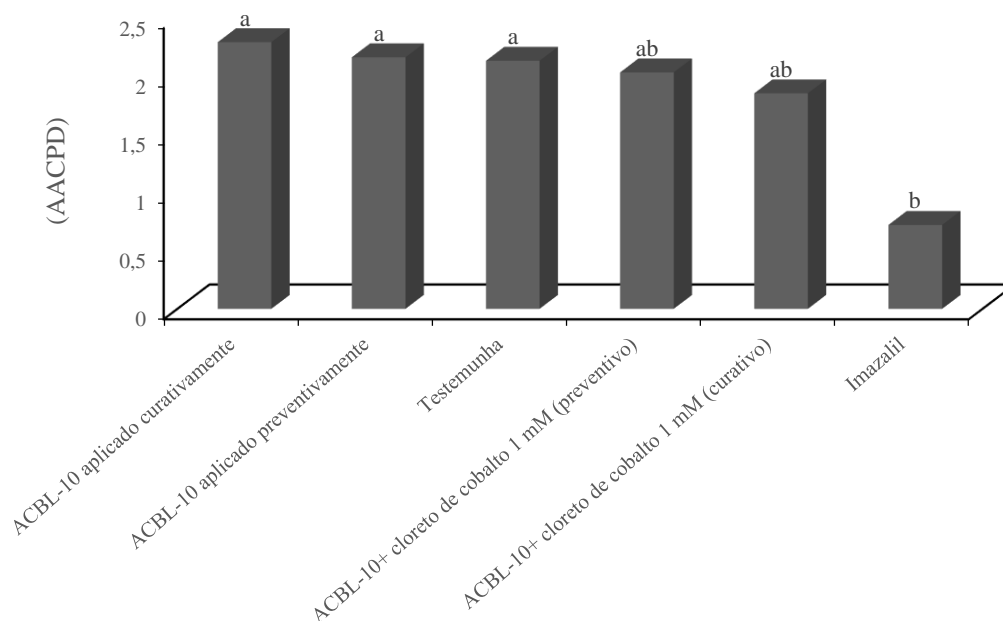


Figura 17. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de tangerina Murcott, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM).

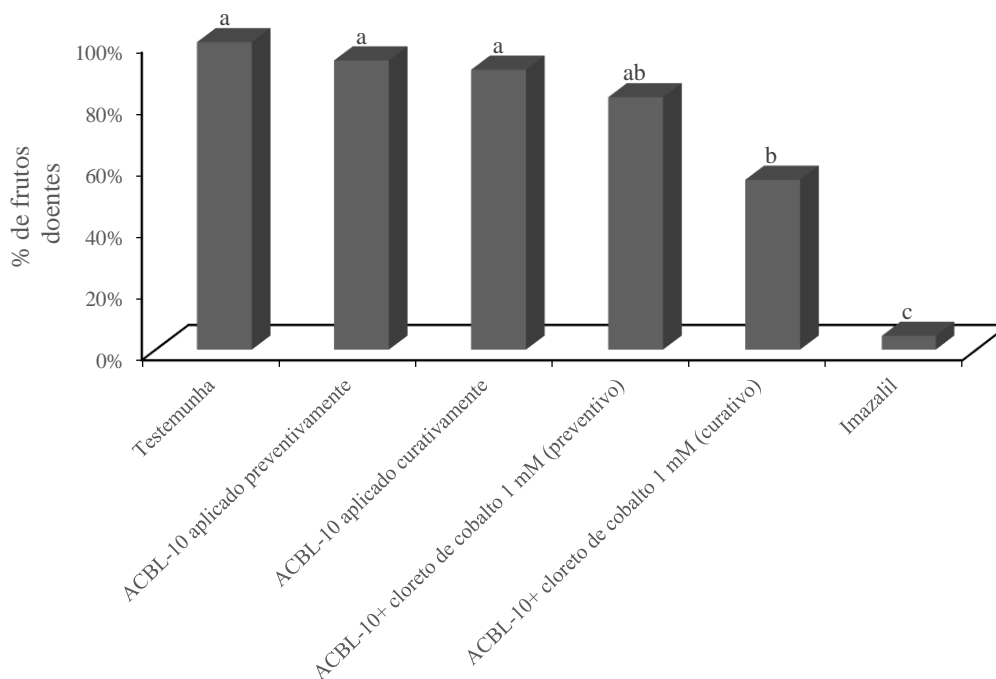


Figura 18. Porcentagem de frutos com sintomas de bolor azul, em frutos de tangerina Murcott, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (1mM).

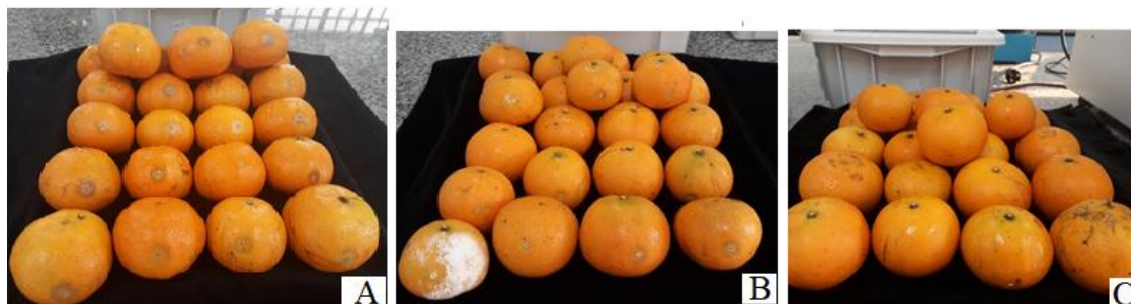


Figura 19. Frutos de tangerina Murcott inoculados por *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (1mM), após tratamento curativo B- Testemunha (sem tratamento) e C- Imazalil.

Quando se avaliou a severidade do bolor azul em frutos de lima ácida Tahiti, os melhores tratamentos foram: ACBL-10 (cultivada em meio BD sem adição de cloreto de cobalto) aplicada de forma preventiva e o fungicida imazalil,

os quais diminuíram, significativamente, o tamanho das lesões em relação ao tratamento testemunha. Ambos diferiram entre si, sendo as menores lesões de bolor azul encontradas nos frutos tratados com o produto químico. O tratamento preventivo da levedura, previamente cultivada em BD sem acréscimo da fonte, também, não diferiu estatisticamente dos tratamentos contendo a levedura previamente cultivada em meio acrescido de cloreto de cobalto (1mM), independente da forma de aplicação, curativa ou preventiva (Figura 20). Não houve diferença entre os tratamentos, quando se avaliou a incidência da doença, com porcentagens de frutos doentes que variaram de 95 a 100% (Figuras 21 e 22).

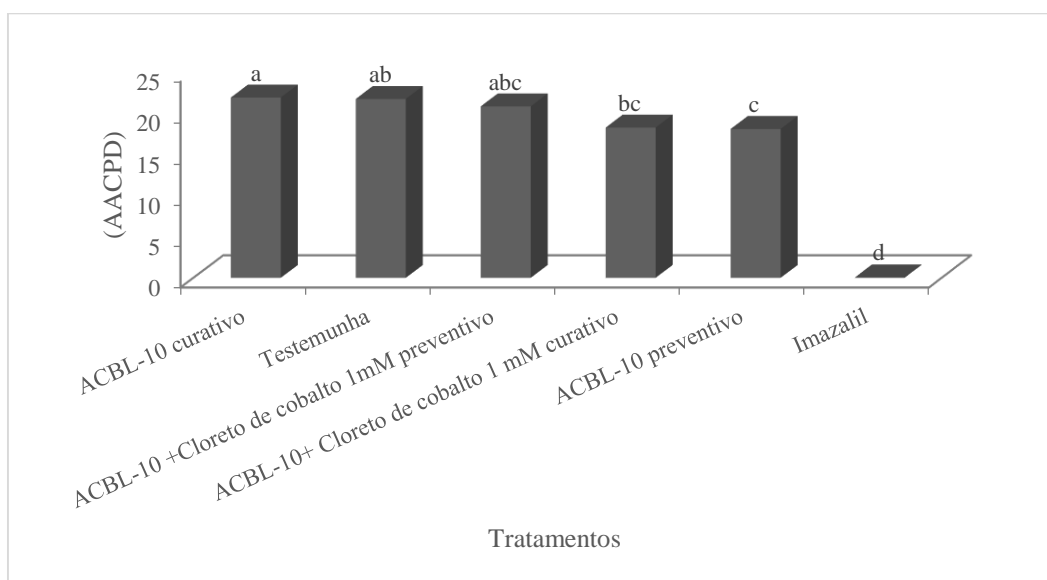


Figura 20. Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de lima ácida Tahiti, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, como ou sem adição de cloreto de cobalto (1 mM).

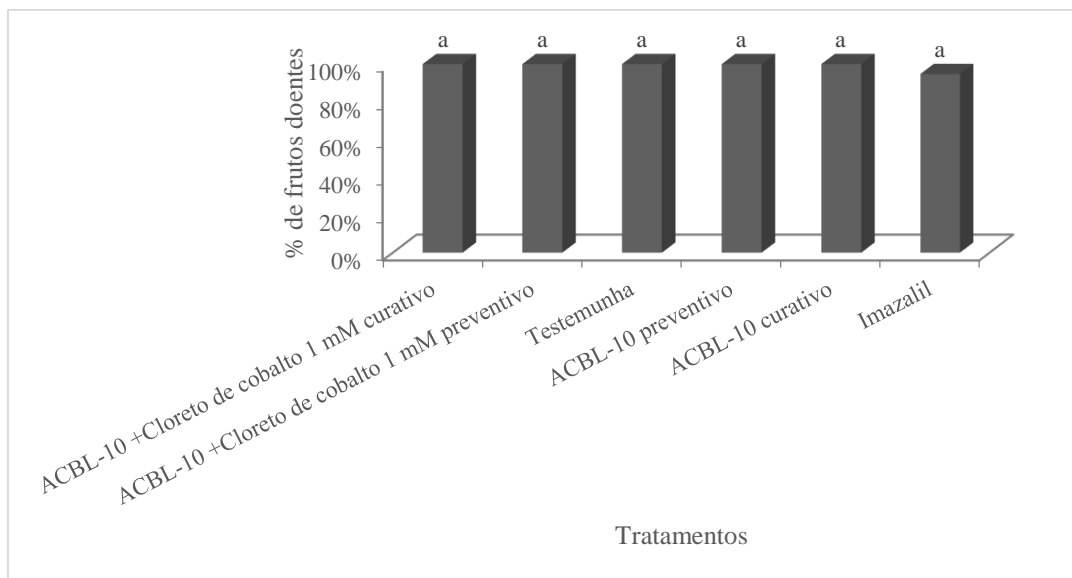


Figura 21. Porcentagem de frutos com sintomas ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de lima ácida Tahiti, após tratamento preventivo ou curativo com *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de cloreto de cobalto (1 mM).

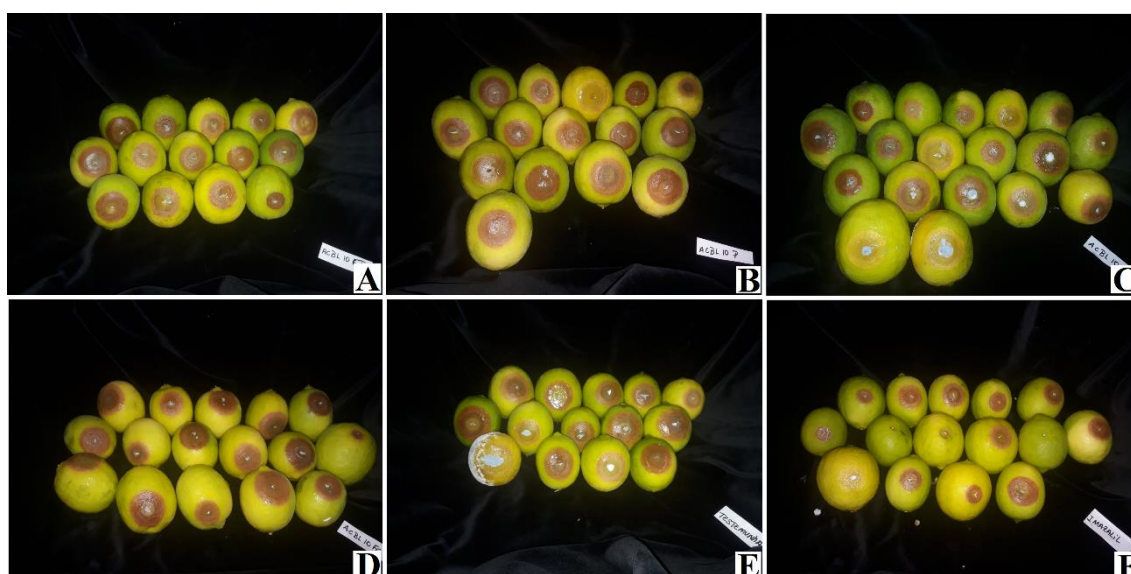


Figura 22. Frutos de lima ácida Tahiti inoculadas com *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (1 mM), após tratamento preventivo B- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento preventivo C- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, tratado de forma curativa; D- *Candida stellimalicola*-ACBL-10, cultivada em meio batata-dextrose, com adição de cloreto de cobalto (1 mM); E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil

4 DISCUSSÃO

Esse estudo teve por objetivo avaliar a atividade antagônica de dois isolados de *Candida stellimalicola* ACBL-05 e ACBL-10 contra o fungo *P. italicum*.

Os ensaios *in vitro* mostraram que, dependendo das fontes nutricionais adicionadas ao meio de cultivo do antagonista, pode haver uma maior ou menor resposta do antagonismo. A adição do micronutriente cloreto de cobalto (1 mM) em meio de cultivo da levedura ACBL-10 melhorou a atividade antagônica, provocando reduções de 80% no tamanho da colônia do fitopatógeno. Para o isolado ACBL-05, o cultivo prévio do microrganismo em meio BD acrescido de uma fonte de micronutriente (cloreto de cobalto a 0,05 mM) combinado com uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio a 0,02%) favoreceu a atividade antagônica da levedura, reduzindo o tamanho da colônia de *P. italicum* em 81%. Wiyono et al. (2008) evidenciaram que a adição de sulfato de manganês, sulfato de zinco e ácido bórico junto a *Pseudomonas fluorescens*, potencializou a atividade de biocontrole da bactéria contra *Pythium ultimum*. De acordo com Klein & Kupper (2018), meios de cultivo acrescidos dos diferentes micronutrientes: cloreto de cobalto, molibdato de amônio e ácido bórico, todos a 1 mM, melhoraram a ação antagônica da levedura *Aureobasidium pullulans* contra o *Geotrichum citri-aurantii*. Zhang et al. (2011) testaram algumas fontes de carbono como: sacarose, frutose e glicose em diferentes concentrações, de maneira a otimizar a atividade antagônica de *Pichia guilliermondii* contra *Botrytis cinerea* e os autores verificaram que, as concentrações de 0,5 e 1%, aumentaram a atividade antagonística da levedura, *in vivo* e *in vitro*.

Além de se estudar as melhores fontes nutricionais que possam ser adicionadas em meio de cultura do antagonista para favorecer o biocontrole, compreender os seus mecanismos de ação poderá ajudar não só quanto ao critério de seleção de isolados, como também, poderá melhorar o desempenho do microrganismo no controle de doenças. Dentre os mecanismos de ação de leveduras, já relatados na literatura, encontram-se a competição por espaço e nutrientes (Cunha et al., 2018; Di Francesco et al, 2017); produção de enzimas

hidrolíticas (Zhang et al., 2011; Ferraz et al., 2016); produção de proteases (Zhang et al., 2012); produção de compostos voláteis e livre de células (Di Francesco et al., 2015); além de poderem atuar como um agente indutor de respostas de defesa da planta (Guo et al., 2014).

No respectivo trabalho, foi observado que o isolado ACBL-10 não compete com o patógeno pelas fontes nutricionais, inibindo a germinação dos conídios do fungo em meio ágar-água, sem adição de nutrientes. É importante mencionar que a adição de leucina (1%) ou de cloreto de cobalto (1 mM) ao meio ágar-água proporcionou inibições de germinação do fungo de 51 e 71%, respectivamente, enquanto que, a levedura sem adição de nutrientes apresentou uma porcentagem de inibição de 76%, sugerindo que, a competição de nutrientes não é uma estratégia de controle utilizada pelo antagonista (ACBL-10). Resultados similares foram obtidos por Cunha et al. (2018), onde segundo os autores, oito isolados de leveduras testados inibiram a germinação de conídios de *P. italicum* independente da concentração de glicose testada. Zhang et al. (2011), também, verificaram que *P. guilliermondii* inibiu a germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e o desenvolvimento da podridão cinzenta em maçãs. No entanto, para o isolado ACBL-05 foi possível verificar, pelos resultados obtidos neste estudo, que levedura compete com o fungo pela fonte de carbono (sacarose a 1%), sugerindo que, para esse isolado, a competição por nutrientes possa ser um mecanismo de ação contra o fitopatógeno. Esses resultados corroboram com outros autores. Bautista-Rosales et al. (2013) verificaram que a competição por nutrientes foi o mecanismo de ação da levedura *Meyerozyma caribbica* no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, quando a sacarose foi usada como fonte de carbono e Yu & Lee (2015) relataram que a levedura *Pseudomonas putida*-JBC17 inibiu, significativamente, a germinação de conídios de *P. digitatum*, pela competição de fontes nutricionais.

Com relação aos estudos sobre a produção de biofilme, a utilização do micronutriente cloreto de cobalto (1 mM) em meio de cultivo (batata-dextrose) além de favorecer a produção de células de *C. Stellimalicola* (ACBL-10), aumentou três vezes mais a produção de biofilme pela levedura e proporcionou uma maior definição dos períodos correspondentes à curva de crescimento do microrganismo. Diferente do isolado ACBL-05 que mostrou um aumento significativo na formação de biofilme quando cultivada em meio batata-dextrose

sem acréscimo de fonte nutricional. Parte desse estudo corrobora com outros autores, segundo Klein & Kupper (2018), a adição de sulfato de amônio (1%) no meio de cultura aumentou a produção de biofilme por *Aureobasidium pullulans* e sua atividade antagônica contra *G. citri-aurantii*. Para Estevam (2019), quando *Sporobolomyces koalae* foi cultivada em meio Sabouraud, com a adição de sulfato de cobre e/ou de sacarose, houve maior produção de biofilme pela levedura.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* mostraram que a eficiência de controle dos isolados de *C. stellimalicola* dependeu da variedade de citros utilizada. Tratamento preventivo de ACBL-10 sobre frutos de laranja Lima diminuiu, significativamente, o tamanho das lesões de bolor azul e proporcionou 75 % de frutos sadios. Para frutos de tangerina Murcott, a levedura proporcionou 45% de frutos assintomáticos, porém, tal resultado só foi obtido, quando o isolado foi previamente cultivado em meio BD com adição de cloreto de cobalto (1 mM) e aplicado de forma curativa. A eficiência de controle de *C. stellimalicola*-ACBL-05 em frutos de laranja Lima, foi um pouco mais baixa, quando comparado com ACBL-10, apresentando apenas 45% de controle do bolor azul quando aplicada de forma preventiva. Os tratamentos dos frutos de tangerina Murcott com a levedura ACBL-05, cultivada previamente em meio BD com a adição de fontes nutricionais, forneceram 50 e 53% de controle, quando aplicado de forma preventiva e curativa, respectivamente. Nenhum dos isolados de levedura apresentou eficiência de controle de bolor azul em frutos de lima ácida Tahiti.

Parte dos resultados, obtido neste estudo, corrobora com outros autores, segundo Luo et al (2012), frutos cítricos tratados com a levedura *P. membranefaciens* apresentaram 72 e 86% de controle do bolor azul e bolor verde, respectivamente. Os autores sugeriram, ainda que, a competição por espaço e nutriente foi um dos principais mecanismos de ação adotado pela levedura. Lu et al. (2013), demonstraram que pulverizações com a levedura *Rhodopodium paludigenum* na pré-colheita reduziram a quantidade dos bolores (verde e azul) em frutos de tangerina na pós-colheita.

Embora a adição de cloreto de cobalto (1 mM) em meio de cultivo de *C. stellimalicola*-ACBL-10 tenha favorecido o biocontrole, sob condições *in vitro*, com inibições no tamanho da colônia e da germinação dos conídios do fitopatógeno de 80 e 71%, respectivamente, sob condições *in vivo*, tal fato não

se manteve. O biocontrole com a levedura, previamente cultivada em meio com adição dessa fonte e, aplicada de forma curativa proporcionou apenas 45% de frutos sadios, quando comparado com a utilização da levedura cultivada em meio sem adição de uma fonte de micronutriente, onde a proporção de controle foi maior. Esses resultados não corroboram com os obtidos por Klein & Kupper (2018), segundo os autores, a adição de sulfato de amônio (1%) no meio de cultivo da levedura *A. pullulans* aumentou a atividade antagônica contra a *G. citri-aurantii* (podridão azeda).

Embora os resultados obtidos nesse trabalho tenham sido extremamente importantes, de modo, a dar uma posição quanto à potencialidade de controle dos isolados de *C. stellimalicola* contra *P. italicum*, outros trabalhos devem ser realizados, como por exemplo, verificar a melhor concentração de células viáveis da levedura a ser aplicada, durante o controle do bolor azul, assim como, tentar compreender melhor a resposta de controle do antagonista em função da variedade dos frutos cítricos avaliada.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- a) Sob condições *in vitro*, a adição de fontes nutricionais em meio de cultivo dos isolados de *C. stellimalicola* favoreceu a atividade antagônica e a produção de células viáveis da levedura;
- b) *C. stellimalicola* produz biofilme, porém, dependendo do isolado o aumento da sua produção pode, ou não, ser favorecido pela adição de uma fonte nutricional no meio de cultivo. A adição de cloreto de cobalto (1mM) aumentou a produção de biofilme pelo isolado ACBL-10;
- c) *C. stellimalicola* apresenta potencial para o controle do bolor azul, porém, depende do isolado e da variedade de citros utilizada;
- d) O isolado ACBL-10 apresentou maior controle do bolor azul em frutos de laranja Lima, enquanto que, ACBL-05 quando cultivada com nutrientes foi

melhor para a tangerina Murcott, com porcentagens de controle da doença de 75 e 50%, respectivamente.

6 REFERÊNCIAS

Barbosa, J.C.; Maldonado JR., W. 2015. Experimentação agrônômica & AgroEstat: Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos, Jaboticabal: gráfica multipress Ltda, p. 396.

Bautista-Rosales, P. U.; Calderon-Santoyo, M.; Servín-Villegas, R.; Ochoa-Álvarez, N. A.; Ragazzo-Sánchez, J. A. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 65, n. 3, p. 293–301.

Bergamin Filho, A.; Amorim, L. 1996. Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico. São Paulo. Ed. Ceres, p. 299.

Cunha, T. 2013. **Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros**. 151 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) - Unesp, Jaboticabal.

Cunha, T.DA.; Ferraz, L.P.; Wehr, P.P.; Kupper, K.C. 2018. Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 276, p. 20-27. DOI: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2018.03.019.

Di Francesco, A.; Roberti, R.; Martini, C.; Baraldi, E.; Mari, M. 2015. Activities of *Aureobasidium pullulans* cell filtrates against *Monilinia laxa* of peaches. **Microbiological Research**, v.181, p.61–67. DOI: 10.1016 / j.micres.2015.09.003.

Di Francesco, A.; Ugolini, L.; D`Aquino, S.; Pagnotta, E. Mari, M. 2017. Biocontrol of *monilinia laxa* by *Aereobasidium pullulans* strains: Insights on competition for nutrients and space. **International Journal of food Microbiology** v. 248, p. 32-38. DOI: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2017.02.007.

Droby, S.; Vinokur, V.; Weiss, B.; Cohen, L.; Daus, A.; Goldschmidt, E.E.; Porat, R. 2002. Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. **Biological Control**, v. 92, p. 393-399. DOI: 10.1094 / PHYTO.2002.92.4.393.

Estevam, D.M.D.P. 2019. **Sporobolomyces koalae como um novo agente de controle biológico**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) - Unesp, Jaboticabal. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/11449/183202> > Acesso em: 10/11/2019.

Ferraz, L.P.; Cunha, T.; Silva, A.C.; Kupper, K.C. 2016. Biocontrol Ability and Putative Mode of Action of Yeasts Against *Geotrichum citri-aurantii* in Citrus Fruit. **Microbiological Research**, v. 188, p. 72–79. DOI:10.1016 / j.micres.2016.04.012.

Guo, J.; Fang, W.; Lu, H.; Zhu, R.; Lu, L.; Zheng, X.; Yu, T. 2014. Inhibition of green mold disease in mandarins by preventive applications of methyl jasmonate and antagonistic yeast *Cryptococcus laurentii*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 88, p. 72–78. DOI: 10.1016 / j.postharvbio.2013.09.008.

Klein, M.N.; Kupper, K.C. 2018. Biofilm production by *Aereobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, p. 1-10, DOI: 10.1016 / j.fm.2017.07.008.

Kupper, K.C.; Cervantes, A.L.L.; Klein, M.N.; Silva, A.C. 2013. Avaliação de micro-organismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 20-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000200011>.

Lu, L.; Ye, C.; Guo, S.; Sheng, K.; Shao, L.; Zhou, T.; Yu, T.; Zheng, X. 2013. Preharvest application of antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum* induced resistance against postharvest diseases in mandarin orange. **Biological Control**, v. 67, p. 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.07.016>.

Luo, Y.; Zeng, K.; Ming, J. 2012. Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 120-127. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.11.031.

Masih, E.I.; Slezack-deschaumes, S.; Marmaras, I.; Ait-barka, E.; Vernet, G.; Charpentier, C.; Adholeya, A.; Paul, B. 2001. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p. 227-232. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10808.x>.

Mattos Junior, D.; De Negri, J.D.DE.; Pio, R.; Pompeu Junior, J. 2005. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Cap. 18. p. 522-523.

Nascimento, L.M.; Kluge, R.A.; Del Aguila, J.S. **Colheita e pós-colheita de citros**. 1 ed. São Paulo: Rio de Janeiro: Livre Expressão, 2014.

Neves, M. F.; Trombin, V.G. 2017. **Anuário de citricultura 2017**. 1º Ed. São Paulo: Citrusbr, Disponível em: < <http://www.citrusbr.com.br> >. Acesso em: 22 maio 2019.

O'toole, G.A.; Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol Microbiol**, v. 30, p. 295–304. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>.

O'toole, G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. **Annual reviews microbial.** v. 54, p. 49-74. DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.49.

Palou, L.; Usa, J.; Muñoz, J.A.; Smilanick, J.L.; Viñas, I. 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p. 93–96. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00178-8).

Shaner, G.; Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization in the expression of slow- mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056.

Sun, X.; Ruan, R.; Lin, L.; Zhu, C.; Zhang, T.; Wang, M.; Li, H.; Yu, D. 2013. Genomewide investigation into DNA elements and ABC transporters involved in imazalil resistance in *Penicillium digitatum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 348, p. 11–18. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12235>.

Wiyono, S.; Schulz, D.F.; Wolf, G.A. 2008. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. **Biological Control**, v. 46, p. 348–357. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.020>.

Yu, S. M.; & Lee, Y. H. 2015. Genes involved in nutrient competition by *Pseudomonas putida* JBC17 to suppress green mold in postharvest satsuma mandarin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 898–906.

Zhang, D.; Spadaro, D.; Garibaldi, A.; Gullino, L.M. 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological control**, v. 57, p. 193–201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.02.011>.

Zhang, D.; Spadaro, D.; Valente, S.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. 2012. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p.453–464. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.016>.

Zhou, Y.; Deng, L.; Zeng, K. 2014. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranae faciens* by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit. **Crop Protection**, v. 63, p. 89–96, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.015>.

CAPÍTULO 3- *Rhodotorula minuta* NO BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS CÍTRICOS

RESUMO- A eficiência de biocontrole de *Rhodotorula minuta* ACBL-23 foi avaliada contra *Penicillium italicum*, agente causal do bolor azul em frutos cítricos, e suas interações foram estudadas *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo foi avaliado a adição de fontes nutricionais (uréia, sulfato de amônio, nitrato de amônio, triptona, nitrato de potássio nas concentrações de 0,02; 0,1 e 0,5% (g/v); as fontes de micronutrientes, como, ácido bórico, sulfato de cobre, sulfato de manganês, cloreto de cobalto, cloreto de ferro; sulfato de zinco e molibdato de amônio, com concentrações finais de 0,05, 0,2 e 1 mM) em meio de cultivo de *Rhodotorula minuta* (ACBL-23) e o efeito na sua atividade antagônica e na produção de células viáveis. Verificou-se a competição por nutrientes (leucina, fenilalanina, prolina, a 0,5 e 1%; sacarose, maltose, galactose e frutose a 0,5 e 1,0% e o sulfato de cobre a 0,2 mM) entre *R. minuta* e *P. italicum*; a produção de biofilme pela levedura e, finalmente, o biocontrole de bolor azul em frutos cítricos por *R. minuta*. Pelos resultados obtidos, verificou-se que, a adição de sulfato de cobre (0,2 mM) em meio de cultivo da levedura favoreceu a atividade antagônica e manteve a sua produção de células viáveis; *R. minuta*, independente da adição de fontes nutricionais, inibe a germinação de *P. italicum*; a adição de fontes de carbono sugere uma possível competição entre a levedura e o fitopatógeno; a levedura produz biofilme e a adição de sulfato de cobre (0,2 mM), em seu meio de cultivo, estimula a produção; o isolado ACBL-23 apresenta potencial para o controle do bolor azul, porém a sua atividade antagônica depende da variedade de citros avaliada. Somente frutos de laranja Lima, inoculados com o fitopatógeno e tratados com a levedura, apresentaram um menor desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: biofilme, competição, fonte nutricional, *Penicillium italicum*

CHARPER 3- *Rhodotorula minuta* IN THE BIOCONTROL OF BLUE MOLD IN CITRUS FRUITS

ABSTRACT- The biocontrol efficiency of *Rhodotorula minuta* ACBL-23 was evaluated against *Penicillium italicum*, the causal agent of blue mold in citrus fruits, and its interactions were studied *in vitro* and *in vivo*. In this study the addition of nutritional sources (urea, ammonium sulfate, ammonium nitrate, tryptone, potassium nitrate in concentrations of 0.02; 0.1 and 0.5% (w/v) was evaluated; the micronutrient sources such as boric acid, copper sulfate, manganese sulfate, cobalt chloride, iron chloride; zinc sulfate and ammonium molybdate, with final concentrations of 0.05, 0.2 and 1 mM) in *Rhodotorula minuta* culture medium (ACBL-23) and the effect on its antagonistic activity and production of viable cells. Competition for nutrients (leucine, phenylalanine, proline, 0.5 and 1%; sucrose, maltose, galactose and fructose at 0.5 and 1.0% and copper sulphate at (0.2 mM) between *R. minuta* and *P. italicum* was verified; biofilm production by yeast and, finally, blue mold biocontrol in citrus fruits by *R. minuta*. The results obtained showed that the addition of copper sulfate (0.2 mM) in yeast culture medium favored the antagonistic activity and maintained its production of viable cells; *R. minuta*, independent of the addition of nutritional sources, inhibits the germination of *P. italicum*; the addition of carbon sources suggests a possible competition between the yeast and the phytopathogen; the yeast produces biofilm and the addition of copper sulfate (0.2 mM), in its culture medium, stimulates the production; the ACBL-23 isolate presents potential for the control of blue mold, but its antagonistic activity depends on the variety of citrus evaluated. Only Lime orange fruits inoculated with the phytopathogen and treated with yeast, presented a lower amount of disease.

Keywords : biofilm, competition, nutritional source, *Penicillium italicum*

1 INTRODUÇÃO

A atividade citrícola apresenta grande impacto na economia dos municípios do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, tendo uma grande importância social (Neves & Trombin, 2017).

No mercado interno brasileiro, nas compras de frutos *in natura* destaca-se grande direcionamento de laranja, tangerina e lima ácida (Aguilar et al, 2014). No entanto, os frutos são acometidos por várias doenças que ocorrem na fase de pós-colheita, sendo as mais importantes o bolor azul e o bolor verde, causados, respectivamente, pelos fungos *Penicillium italicum* e *P. digitatum*; as podridões pedunculares (*Diaporthe citri* e *Lasiodiplodia* spp.); a podridão negra (*Alternaria* spp.); a podridão-parda (*Phytophthora* spp.) e a podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*) (Junior et al., 2015). Para a comercialização de frutos cítricos, observa-se, tanto no mercado interno como no externo, uma crescente exigência quanto à qualidade dos frutos.

No caso do bolor azul, em particular, a doença ocorre em todas as regiões produtoras de citros. Na fruta armazenada, a doença pode ser transmitida através do contato, já que as enzimas que provocam a podridão dissolvem a cutícula do fruto adjacente. O fitopatógeno cresce melhor em temperatura abaixo de 10 °C (Mattos Junior et al., 2005).

Essa doença pode ser prevenida por meio de uma colheita cuidadosa, de forma a minimizar a ocorrência de injúrias nos tecidos dos frutos, assim como pelo uso de fungicidas, como imazalil e tiabendazol, os quais têm sido eficientes na diminuição das perdas de frutos ocasionados por esse patógeno (Sun et al., 2013). Segundo Bergamin & Amorim (2011), fungos como todo organismo vivo, podem sofrer mutações, tornando-se resistentes, pelo uso excessivo e frequente desses fungicidas.

Estratégias alternativas de controle visam não só manter a alta produtividade de frutos, mas também, diminuir os impactos negativos gerados pelo uso frequente desses produtos químicos para o controle de doenças (Moura et al., 2019).

Segundo Droby et al., (2009) a habilidade de competir por espaço e nutriente torna as leveduras excelentes colonizadores de tecidos lesionados, pois consomem os nutrientes mais rapidamente do que os fitopatógenos, prevenindo a doença.

Dentre as vantagens, na utilização de produtos de biocontrole, destaca-se à baixa agressão ao meio ambiente, uma melhor aceitação por parte dos consumidores, devido as leveduras serem utilizadas na produção de alimentos (Ferraz, 2014).

O isolado ACBL-23 (*Rhodotorula minuta*) foi obtido de folhas de laranja Lima no município de Cordeirópolis/SP. Segundo Cunha (2013), a levedura foi eficiente no controle da podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*), quando aplicada de forma preventiva e curativa, em frutos de laranja Pera.

No entanto, o processo para o desenvolvimento de uma formulação a base de microrganismos é complexo e requer muitos estudos preliminares antes mesmo de se chegar à confecção final do bioproduto. Diante deste contexto, de modo a compreender melhor como a levedura atua no biocontrole, o estudo teve por objetivo avaliar: (i) a adição de fontes nutricionais em meio de cultivo da levedura *R. minuta* (ACBL-23) e o efeito na sua atividade antagônica e na produção de células viáveis; (ii) a competição por nutrientes entre *R. minuta* e *P. italicum*; (iii) a produção de biofilme pelo isolado ACBL23 e, (iv) o biocontrole de bolor azul em frutos cítricos por *R. minuta*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Para esse estudo foi utilizado o isolado ACBL-23 de *Rhodotorula minuta* e o fitopatógeno *P. italicum*, ambos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira / IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil.

2.2 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de *Rhodotorula minuta* contra *Penicillium italicum*

Esse estudo teve por objetivo verificar a adição de fontes nutricionais em meio de cultivo de *R. minuta*-ACBL-23 e seu efeito na atividade antagônica contra *P. italicum*. Foram utilizados como fontes de nitrogênio: uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), nitrato de amônio (NH_4NO_3), triptona e nitrato de potássio (KNO_3) nas concentrações de 0,02; 0,1 e 0,5% (g/v). As fontes de micronutrientes testadas corresponderam a: boro (ácido bórico - H_3BO_4), cobre (sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), manganês (sulfato de manganês - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cobalto (cloreto de cobalto - $\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), ferro (cloreto de ferro - FeCl_3), zinco (sulfato de zinco - ZnSO_4) e molibdato (molibdato de amônio - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), com concentrações finais de 0,2; 0,05 e 1 mM, respectivamente (metodologia adaptada de Wiyono et al., 2008).

Frascos do tipo Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido BD (batata-dextrose) estéril + fontes de nitrogênio e de micronutrientes, acrescidos de uma alíquota de 1 mL de uma suspensão de levedura (1×10^7 células/ mL) foram submetidos à agitação constante a 28 °C, em incubadora tipo shaker, por 72 horas. Em seguida, os caldos cultivados foram filtrados em papel filtro Whatman® n.1 estéril e, posteriormente, amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL de BDA fundente. Em seguida, os meios foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, um disco de meio de cultivo (0,5 cm de diâmetro), contendo o fitopatógeno com 7 a 10 dias de crescimento, foi transferido para o centro das placas. As testemunhas foram constituídas por placas de BDA contendo apenas o patógeno. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 27 °C durante 9 dias e a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia do patógeno em dois sentidos perpendiculares.

As fontes de nitrogênio e de micronutrientes, que se mostraram mais eficientes quanto à inibição da colônia de *P. italicum*, foram, posteriormente, utilizadas em mistura de modo a otimizar a atividade antagônica dos isolados das leveduras. As fontes, também, foram avaliadas sozinhas (sem a adição das

leveduras) quanto à inibição do crescimento micelial do patógeno, utilizando-se da mesma metodologia.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 5 repetições.

2.3 Adição de fonte nutricional em meio de cultivo para produção de células de *Rhodotorula minuta*

Após resultados obtidos no ensaio anterior, esse ensaio teve por objetivo avaliar a adição de sulfato de cobre (0,2 mM), em meio de cultivo, na produção de células viáveis da levedura.

Para tal, uma alíquota de 1 mL da suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) foi transferida para frascos com 50 mL de meio líquido batata-dextrose (BD) contendo sulfato de cobre (0,2 mM). Como testemunha, a levedura foi cultivada em meio BD sem adição do nutriente. As culturas foram incubadas em incubadoras tipo shaker, 150 rpm a 28 °C.

Amostras de 1 mL de cada cultura foram coletadas em diferentes tempos: 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 126, 128, 132, 138, 144, 168 e 192 horas. Posteriormente, as culturas foram submetidas às diluições decimais e plaqueamento foi feito em meio batata-dextrose-ágar (BDA), conforme cada tratamento. A avaliação foi feita pela contagem de unidades formadoras de colônias após 48 horas do plaqueamento. A densidade populacional da levedura foi expressa em \log_{10} UFC/mL.

2.4 Competição por nutrientes entre *Rhodotorula minuta*– ACBL-23 e *Penicillium italicum*

Para o estudo da competição por nutrientes entre a levedura e o fitopatógeno, foram utilizadas diferentes fontes de nitrogênio (leucina, fenilalanina, prolina, a 0,5 e 1%), de carbono (sacarose, maltose, galactose e

frutose, a 0,5 e 1,0%) (Zhang et al., 2011) e o micronutriente (sulfato de cobre a 0,2 mM).

Para tal, uma alíquota de 10 μ L da suspensão da levedura (1×10^7 células/mL), juntamente com 10 μ L da suspensão do fitopatógeno (1×10^5 conídios/mL) foram depositados em áreas demarcadas de lâminas de microscopia, previamente preparadas com ágar-água mais a adição das diferentes fontes de nutrientes. As testemunhas foram constituídas do fungo sozinho, ou com a levedura, em meio ágar-água sem nutrientes. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, com fotoperíodo 12/12h a 25 °C, por 17 horas.

A germinação do fitopatógeno foi paralisada através da aplicação de azul lático. A avaliação foi realizada através da contagem de conídios germinados ou não germinados, em um total de 100 conídios ao acaso, efetuando-se o cálculo da percentagem de germinação. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à largura do conídio. Utilizou-se de um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 6 repetições.

2.5 Produção de biofilme por *Rhodotorula minuta* – ACBL-23

Para verificar a produção de biofilme pela levedura, utilizou-se da metodologia de cristal violeta (CV) descrita por O'toole & kolter (1998). Um mililitro de suspensão de *R. minuta* – ACBL-23 (1×10^7 células/mL) ou de *P. italicum* (1×10^5 conídios/mL) foi transferido para frasco contendo 50 mL de meio BD e, incubados a 28 °C, sob agitação constante a 150 rpm durante 120 e 132 horas, para o fitopatógeno e a levedura, respectivamente.

Após o período estabelecido para cada organismo, alíquotas de 100 μ L de cada cultivo (fitopatógeno e levedura) foram transferidas para tubos Falcon (com capacidade para 50mL) contendo 10 mL de meio BD, de acordo com os respectivos tratamentos: 1) meio BD + levedura; 2) meio BD + levedura com adição de sulfato de cobre (0,2 mM); 3) meio BD + levedura + fitopatógeno; 4) meio BD + levedura com adição de sulfato de cobre (0,2 mM) + fitopatógeno; 5)

meio BD + fitopatígeno. Como controle (branco) foi utilizado apenas o meio BD. As culturas foram incubadas a 28 °C e sob agitação constante a 150 rpm durante 132 horas, de modo a considerar a fase estacionária de *Rhodotorula minuta* - ACBL-23.

Para a quantificação da produção de biofilme, o meio foi suavemente removido, os tubos lavados com 0,9% de NaCl e submetidos a uma solução de 0,1% de CV. Após 30 minutos, o CV não ligado foi removido e lavado três vezes com água destilada. O CV em cada tubo foi solubilizado pela adição de 10 mL de álcool 70% e a leitura da absorbância foi realizada a 590 nm (UV / Vis Spectrometer Lambda Bio; Perkin Elmer). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 5 repetições.

2.6 Biocontrole de bolor azul em frutos cítricos por *Rhodotorula minuta*-ACBL-23

Frutos de laranja Lima (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerina (*C. reticulata* Blanco; *C. deliciosa* Tenore) e lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tan), não submetidos a tratamentos prévios na pós-colheita, foram lavados com detergente neutro e desinfestados, superficialmente, com hipoclorito de sódio (0,2% por 2 minutos). Após secagem dos frutos, os mesmos foram feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas demarcadas e esterilizadas, a uma profundidade de 3 mm.

Em seguida, os frutos foram tratados com 20 µL de suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) contendo, ou não, sulfato de cobre (0,2 mM).

Os tratamentos dos frutos foram realizados 24 h antes (preventivo) e 24 h depois (curativo) da inoculação do fitopatógenos. Para inoculação, alíquotas de 20 µl da suspensão de *P. italicum* (1×10^4 conídios/mL) foram depositadas na região do ferimento.

Para o tratamento químico foi utilizado o fungicida Imazalil (2 mL/L). O controle negativo correspondeu aos frutos tratados apenas com água destilada e esterilizada.

Após a inoculação, os frutos foram armazenados em caixas de propileno com tampa (40x30x15 cm) e, incubados a 10 ± 3 °C e $90 \pm 3\%$ umidade relativa (UR).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições, com 20 frutos por repetição. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre o tamanho médio das lesões ocasionadas por *P. italicum*, foi efetuado o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que é expressa pela plotagem da proporção de doença em porcentagem versus o tempo (Bergamin Filho & Amorim, 1996). A AACPD foi determinada pela fórmula descrita por Shaner & Finney (1977):

$$\text{AACPD} = \sum^{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i)/2] * [(T_{i+1} - T_i)]; \text{ onde:}$$

n – é o número de observações/avaliações;

Y_i – proporção da doença na “i”- ésima observação/avaliação;

T_i – é o tempo em dias na “i”- ésima observação/avaliação.

O início da avaliação da severidade foi realizado 40 dias após a inoculação em frutos de laranja Lima e tangerina Murcott, enquanto que, para os frutos de lima ácida Tahiti, a avaliação se deu 27 dias após a inoculação do fitopatógeno.

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística AgroEstat e a comparação das médias foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.RESULTADOS

3.1 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de *Rhodotorula minuta* contra *Penicillium italicum*

Os resultados obtidos nos estudos sobre a adição de fontes de nitrogênio e micronutrientes em meio de cultivo da levedura e seu efeito na atividade antagônica contra *P. italicum*, mostram que o nitrato de potássio (0,1%), como fonte de nitrogênio, afetou, significativamente, o crescimento micelial, inibindo 59% o tamanho da colônia do fungo (Tabela 1).

A adição dos micronutrientes em meio de cultivo da levedura, sulfato de manganês e sulfato de cobre, ambos na concentração de 0,2 mM, apresentaram os melhores resultados, com porcentagens de inibições da colônia de *P. italicum* de 32,31 e 40%, respectivamente, quando comparados com a testemunha (fungo cultivado em meio BD sem fonte nutricional) (Tabela 2).

A combinação das melhores fontes de nitrogênio (nitrato de potássio 0,1%) e micronutriente (sulfato de manganês 0,2 e/ou sulfato de cobre 0,2 mM) em meio de cultivo da levedura favoreceram a inibição da colônia do patógeno, com valores de inibições que variaram de 18 a 33% em relação à testemunha. No entanto, quando o sulfato de cobre (0,2 mM) foi utilizado sozinho apresentou maior controle, inibindo em torno de 75% a colônia de *P. italicum* (Tabela 3).

Nenhuma das fontes de nutrientes testadas afetou o crescimento micelial de *P.italicum* quando testados diretamente sobre o patógeno (sem a levedura), demonstrando que tais nutrientes não têm efeito antifúngico sobre o patógeno (Tabela 4).

Tabela 1 Efeito das fontes de nitrogênio no cultivo da levedura ACBL-23 e seu efeito no crescimento micelilal de *Penicillium italicum*, sob incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	% inibição em relação à testemunha
ACBL-23 + triptona 0,5%	2,16 a	-26,4
ACBL- 23 + uréia 0,02%	2,11 a	-3,86
ACBL- 23 + nitrato de amônio 0,5%	2,05 ab	-10,38
ACBL-23 + sulfato de amônio 0,1%	2,04 ab	-9,46
ACBL-23 + Uréia 0,1%	1,98 ab	-2,37
Testemunha	1,96 ab	-
ACBL-23 + nitrato de amônio 0,1%	1,95 ab	1,19
ACBL-23 + triptona 0,02%	1,91 ab	11,63
ACBL-23 + triptona 0,1%	1,88 ab	23,86
ACBL-23 + sulfato de amônio 0,5%	1,86 ab	1,19
ACBL-23 + nitrato de amônio 0,02%	1,82 ab	7,13
ACBL-23 + nitrato de potássio 0,02%	1,72 ab	26,71
ACBL-23 + sulfato de amônio 0,02%	1,62 ab	29,38
ACBL-23 + uréia 0,5%	1,60 ab	37,39
ACBL-23+ Nitrato de potássio 0,1%	1,36 b	59,06

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 2 Efeito das fontes de micronutrientes no cultivo da levedura ACBL-23 e seu efeito no crescimento micelial de *Penicillium italicum*, sob incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	% inibição em relação à testemunha
ACBL- 23 + cloreto de ferro 0,2 mM	2,32 a	-18,97
ACBL-23+ sulfato de zinco 1 mM	2,24 ab	-14,87
ACBL 23+ cloreto de ferro 1 mM	2,17 abc	-11,28
ACBL-23 + cloreto de ferro 0,05 mM	2,00 abc	-4,61
ACBL-23 + molibdato 1 mM	1,98 abc	-2,56
ACBL-23 + cloreto de cobalto 0,05 mM	1,95 abc	-1,53
Testemunha	1,94 abc	-
ACBL-23 + molibdato 0,05 mM	1,91 abcd	0,52
ACBL-23 + sulfato de manganês 0,05 mM	1,89 abcd	2,06
ACBL-23+ molibdato 0,2 mM	1,86 abcd	3,08
ACBL- 23 + ácido bórico 1 mM	1,84 abcd	4,68
ACBL- 23 + sulfato de cobre 1 mM	1,82 abcd	5,65
ACBL-23 + ácido bórico 0,05 mM	1,81 bcde	6,67
ACBL-23 + cloreto de cobalto 1 mM	1,74 bcde	7,18
ACBL-23 + ácido bórico 0,2 mM	1,73 bcde	11,29
ACBL-23+ sulfato de manganês 1 mM	1,72 bcde	11,8
ACBL 23+ sulfato de zinco 0,05 mM	1,72 cde	11,8
ACBL 23+ sulfato de cobre 0,05 mM	1,67 cde	14,36
ACBL 23+ sulfato de zinco 0,2 mM	1,65 cde	15,39
ACBL 23 + cloreto de cobalto 0,2 mM	1,64 cde	15,9
ACBL 23 + sulfato de manganês 0,2 mM	1,32 de	32,31
ACBL 23 + sulfato de cobre 0,2 mM	1,17 e	40

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Tabela 3 Efeito das fontes de nitrogênio e micronutrientes, combinados ou não, no cultivo de *Rhodotorula minuta*- ACBL-23 e seu efeito no crescimento micelial de *Penicillium italicum*, sob incubação das culturas à 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	% inibição em relação à testemunha
Testemunha	4,39 a	-
ACBL-23 + sulfato de manganês 0,2 mM	3,61 ab	17,77
ACBL-23 + nitrato de potássio 0,1%+ sulfato de cobre 0,2 mM	3,35 ab	23,7
ACBL-23 + nitrato de potássio 0,1%+ sulfato de manganês 0,2 mM	3,27 b	25,52
ACBL-23 + nitrato de potássio 0,1%	2,94 b	33,03
ACBL -23 + sulfato de cobre 0,2 mM	1,10 c	74,95

(¹) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 4 Efeito das melhores fontes de nitrogênio e micronutriente, combinados ou não, sobre o crescimento micelial de *Penicillium italicum*, sob incubação das culturas a 27 °C, em um período de 9 dias.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	% inibição em relação à testemunha
Nitrato de amônio 0,05%	4,78 a	-8,88
Testemunha	4,39 ab	-
Nitrato de potássio 0,1% + sulfato de cobre 0,2 mM	3,30 bc	24,83
Sulfato de cobre 0,2 mM	3,27 c	25,52
Nitrato de potássio 0,1% + sulfato de manganês 0,2 mM	3,27 c	25,52
Nitrato de potássio 0,1%	2,94 cd	33,03
Cloreto de cobalto 0,05 mM	2,36 cde	46,25
Sulfato de amônio 0,02% + cloreto de cobalto 0,05 mM	2,30 cde	47,61
Sulfato de amônio 0,02%	2,04 def	53,54
Sulfato de manganês 0,2 mM	1,76 ef	59,91
Sulfato de amônio 0,02% + cloreto de cobalto 1 mM	1,58 ef	64,01
Nitrato de amônio 0,05% + cloreto de cobalto 0,05 mM	1,37 ef	68,8
Nitrato de amônio 0,05% + cloreto de cobalto 1 mM	1,23 f	71,99
Cloreto de cobalto 1 mM	1,12 f	74,49

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

3.2 Adição de fonte nutricional em meio de cultivo para produção de células de *Rhodotorula minuta*

O efeito direto de sulfato de cobre (0,2 mM) na produção de células da levedura foi avaliado utilizando meio BD, em diferentes períodos de incubação. Os meios de cultivo testados, contendo ou não, o micronutriente manteve, praticamente, o mesmo comportamento de crescimento da levedura. A sua fase exponencial começou por volta das 12 horas, o pico da produção de células em 120 horas, e a fase estacionária entre 126-132 horas (Figura 1).

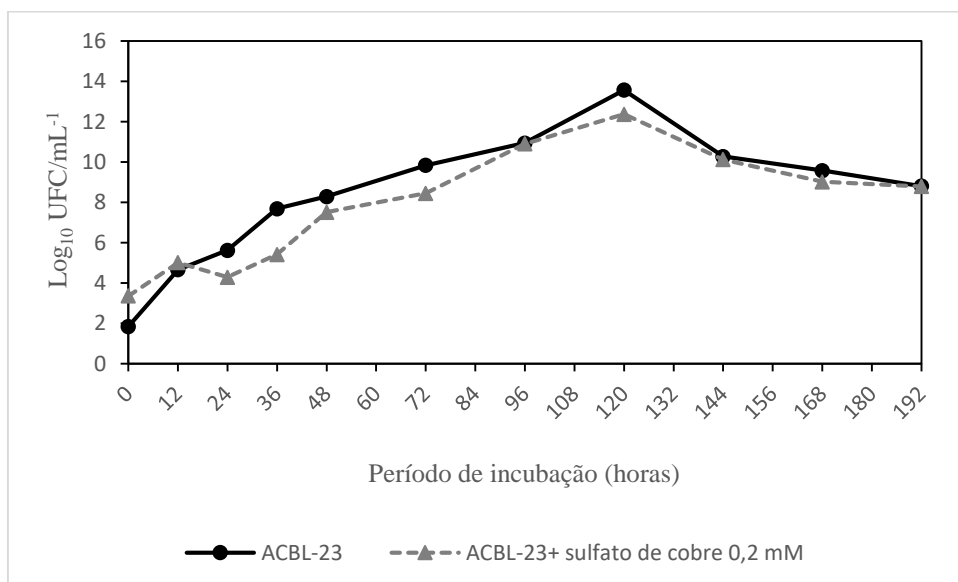


Figura 1 Produção de células de *Rhodotorula minuta* -ACBL-23 cultivada em meio batata-dextrose, acrescido, ou não, de sulfato de cobre (0,2 mM), após diferentes períodos de incubação a 28 °C.

3.3 Competição por nutrientes entre *Rhodotorula minuta*- ACBL-23 e *Penicillium italicum*

Os dados referentes ao estudo de competição por nutrientes entre *R. minuta* ACBL-23 e *Penicillium italicum* encontram-se na Tabela 5. Pode se verificar que a levedura sozinha, independente da adição da fonte de carbono, nitrogênio e micronutriente, foi capaz de inibir 75% a germinação de conídios de *P. italicum*. Com exceção das fontes de carbono, galactose (1%) e frutose (0,5%) que não diferiram significativamente do tratamento testemunha, ou seja, não provocaram inibições significativas na germinação de conídios do fungo, todas as demais junto com a levedura inibiram a germinação do fitopatógeno, com valores de inibições que variaram de 26 a 73%. Pode se sugerir que, a adição de fontes nutricionais específicas pode provocar maior competição entre os microrganismos envolvidos, principalmente, no que diz respeito às fontes de carbono (Tabela 5).

Tabela 5 Porcentagem de inibição da germinação de conídios de *Penicillium italicum* sob ação de *Rhodotorula minuta*-ACBL-23 cultivada em meio ágar-água, acrescido de diferentes fontes de nutrientes. sob incubação das culturas à 25 °C, em um período de 17 horas.

Tratamentos	% conídios germinados <i>P. italicum</i>	% inibição em relação a testemunha
Testemunha (apenas <i>P.italicum</i>)	85,00 a ⁽¹⁾	-
ACBL-23 + Galactose 1%	70,83 ab	16,68
ACBL-23 + Frutose 0,5%	65,67 abc	22,75
ACBL-23 + Maltose 1%	63,17 bcd	25,69
ACBL-23 + Maltose 0,5%	52,83 bcde	37,85
ACBL-23+ Sacarose 0,5%	51,00 bcde	40,00
ACBL-23 + Galactose 0,5%	50,67 bcde	40,39
ACBL-23 + Sacarose 1%	50,17 bcdef	40,98
ACBL-23 + Prolina 0,5%	48,83 cde	42,56
ACBL-23 + Frutose 1 %	47,00 cdef	44,71
ACBL-23 +Leucina 1 %	43,17 defg	49,22
ACBL-23 + Leucina 0,5%	39,17 efgh	53,92
ACBL-23 + Fenilalanina 0,5%	32,33 efgh	61,97
ACBL-23 + Sulfato de cobre 0,2 mM	27,00 fgh	68,24
ACBL-23 + Fenilalanina 1%	26,83 fgh	68,45
ACBL-23+ Prolina 1%	23,17 gh	72,75
ACBL-23	21,33 h	74,91

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

3.4 Produção de biofilme por *Rhodotorula minuta*- ACBL-23

Os dados da adição de uma fonte de micronutriente, em meio de cultivo da levedura, na produção de biofilme por *R. minuta*, encontram-se ilustrados na Figura 2. Os resultados mostraram que a levedura produz biofilme e a adição de

uma fonte de micronutriente (sulfato de cobre a 0,2 mM), em seu meio de cultivo, estimula a produção.

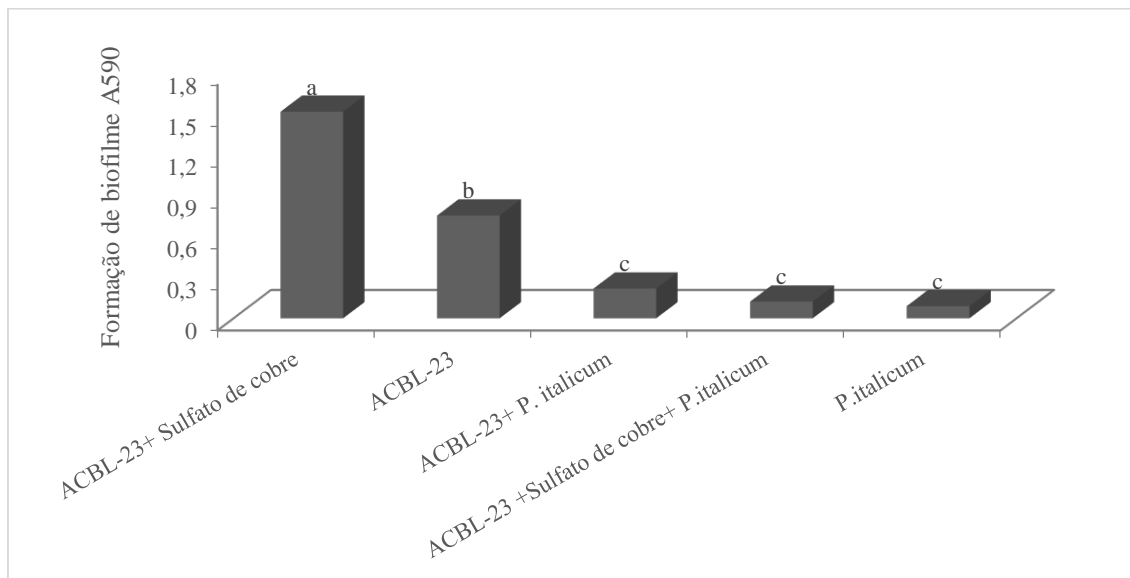


Figura 2 Produção de biofilme por *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose acrescido, ou não, de sulfato de cobre (0,2 mM), na presença ou na ausência de *Penicillium italicum*.

3.5 Biocontrole de bolor azul em frutos cítricos por *Rhodotorula minuta*-ACBL-23

Com relação à avaliação da severidade da doença em frutos de laranja Lima, os menores tamanhos das lesões de bolor azul ocorreram nos frutos tratados com a levedura aplicada de forma preventiva, com ou sem adição de sulfato de cobre em seu meio de cultivo, não diferindo estatisticamente dos tratamentos com fungicida e com a levedura aplicada de forma curativa e previamente cultivada em meio com adição da fonte (Figura 3).

Os dados de avaliação de incidência da doença revelaram que a aplicação preventiva ou curativa da levedura, cultivada previamente em meio de cultivo

sem adição do micronutriente (sulfato de cobre a 0,2 mM) proporcionaram 45% de frutos assintomáticos diferindo, estatisticamente do tratamento com imazalil que apresentou 100% de controle. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha (Figura 4 e 5).

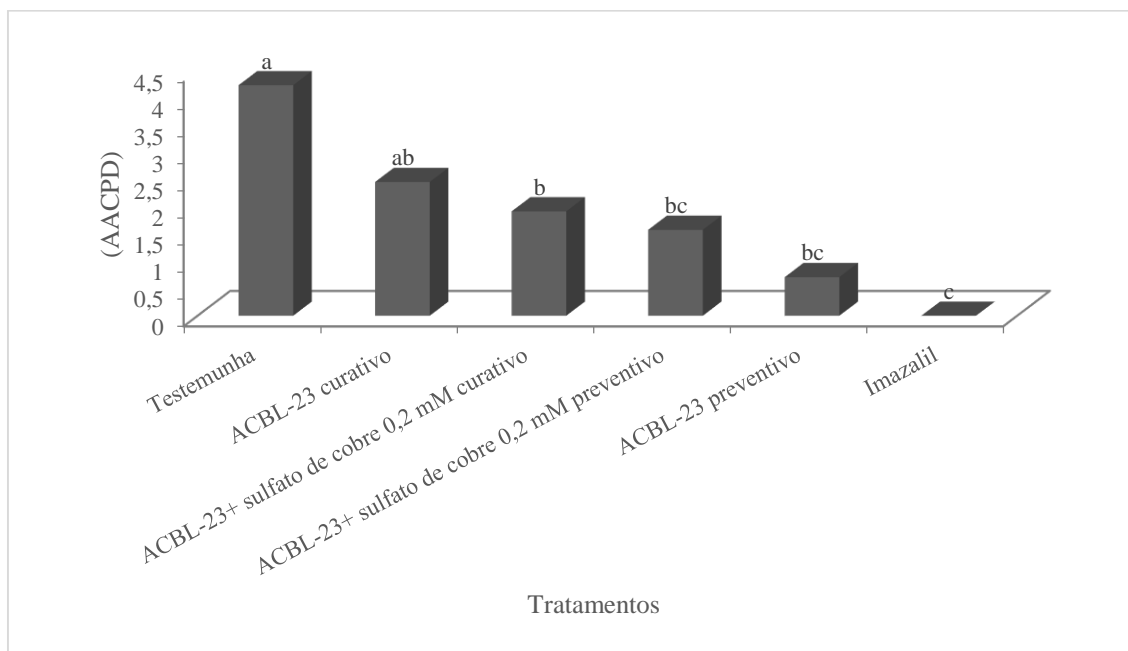


Figura 3 Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões de bolor azul em laranja Lima, após tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM).

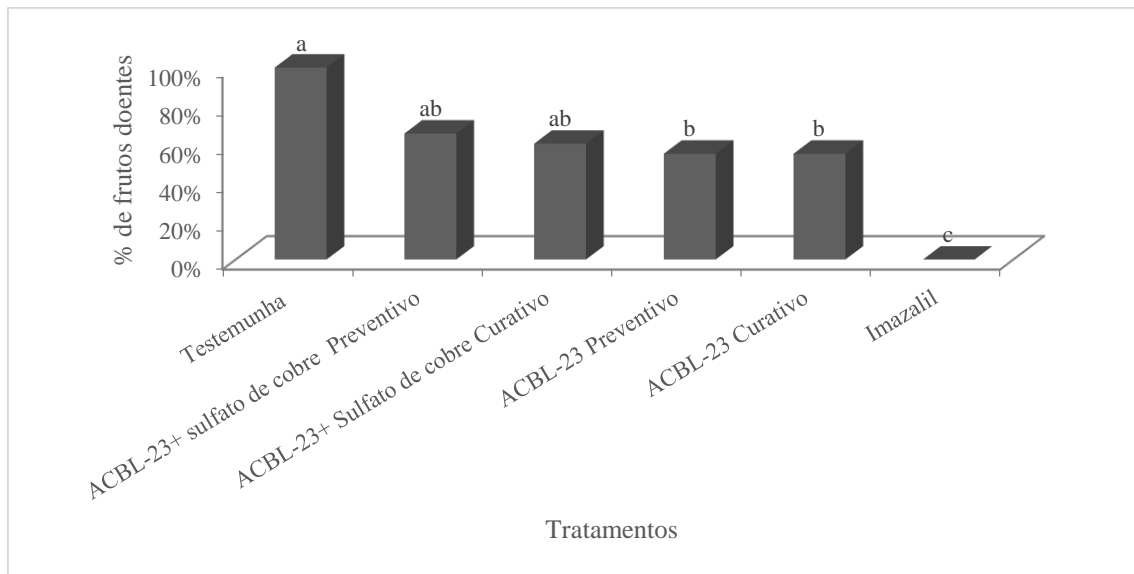


Figura 4 Porcentagem de frutos doentes de laranja Lima após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM).

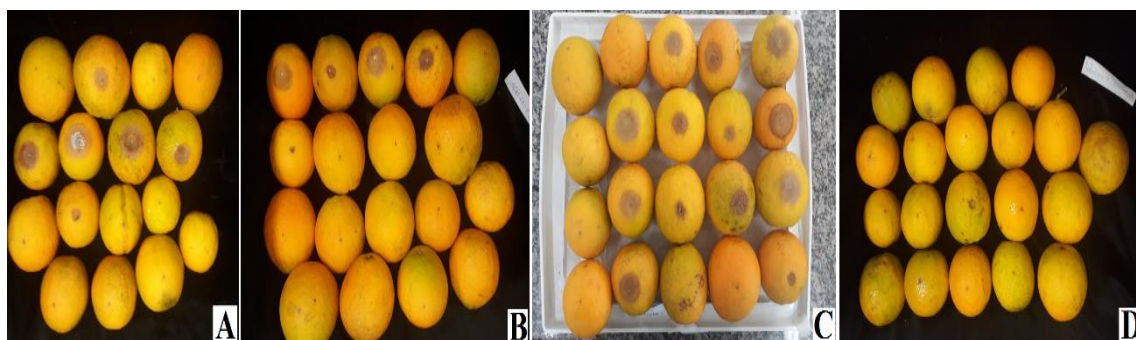


Figura 5 Frutos de laranja Lima inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Rhodotorula minuta*- ACBL-23 previamente cultivada em meio batata-dextrose e aplicada preventivamente; B- *Rhodotorula minuta*- ACBL-23 cultivada em meio batata-dextrose e aplicada de forma curativa; C- Testemunha (sem tratamento) e D- Imazalil.

Com relação à avaliação da severidade de bolor azul em frutos de tangerina Murcott, os menores tamanhos de lesão ocorreram nos frutos tratados com o fungicida imazalil. A levedura, independente do seu meio de cultivo e forma de aplicação não controlou a doença (Figura 6).

Os dados de incidência da doença mostraram que os tratamentos com a levedura apresentaram de 90 a 98% de frutos doentes, enquanto que o fungicida apresentou proporcionou 100% de frutos sadios (Figura 7 e 8).

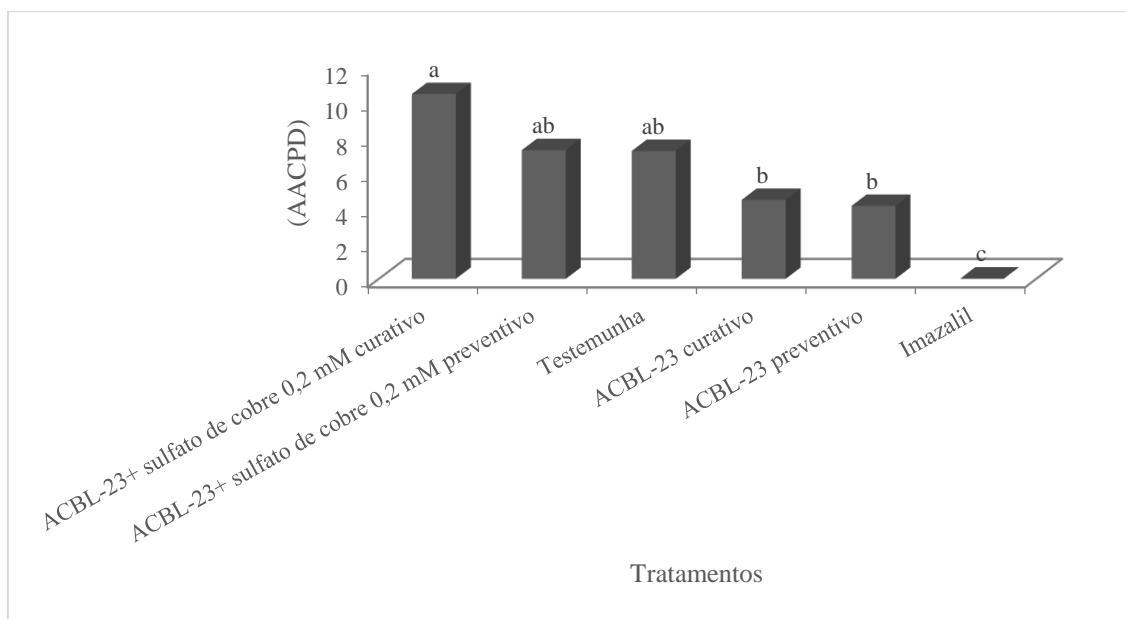


Figura 6 Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de tangerina Murcott, após tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM).

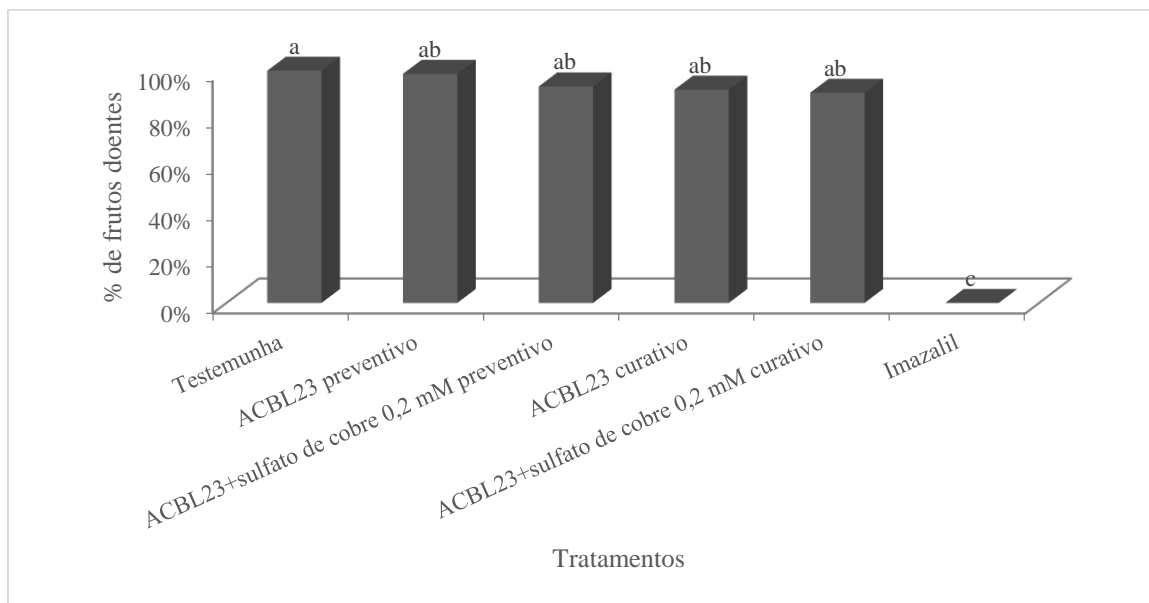


Figura 7 Porcentagem de frutos doentes de tangerina Murcott, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM).

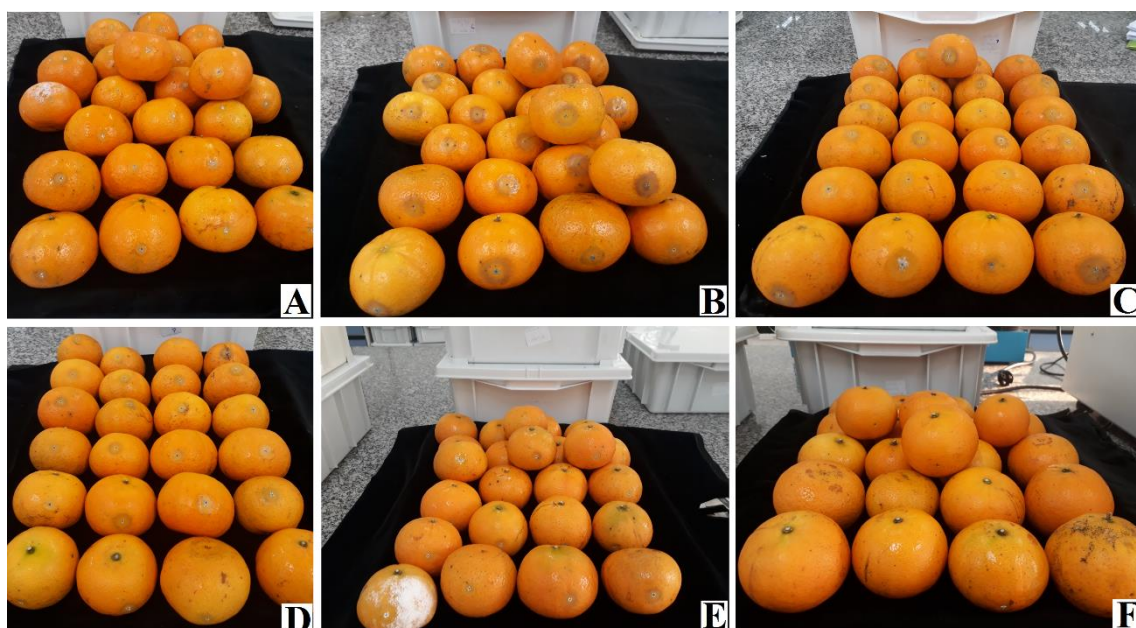


Figura 8 Frutos de tangerina Murcott inoculados com *Penicillium italicum*, e tratados com: A- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento curativo; B- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose com adição de sulfato de cobre (0,2 mM), após tratamento curativo; C- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose com adição de sulfato de cobre (0,2 mM), tratado de forma curativa; D- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, aplicada de forma curativa; E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil .

Com relação à avaliação da severidade da doença em frutos de lima ácida Tahiti, os menores tamanhos de lesões de bolor azul foram observados quando os frutos foram tratados com o fungicida imazalil e com a levedura, previamente cultivada em meio BD sem acréscimo da fonte de micronutriente (sulfato de cobre a 0,2 mM) e aplicada de forma preventiva, ambos diferiram significativamente da testemunha. Os demais tratamentos com a levedura não diminuíram o tamanho das lesões de bolor azul, não diferindo, estatisticamente, da testemunha (Figura 9). Quando se avaliou a incidência de bolor verde em frutos de lima ácida Tahiti, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados, onde todos apresentaram 100% de frutos doentes (Figura 10).

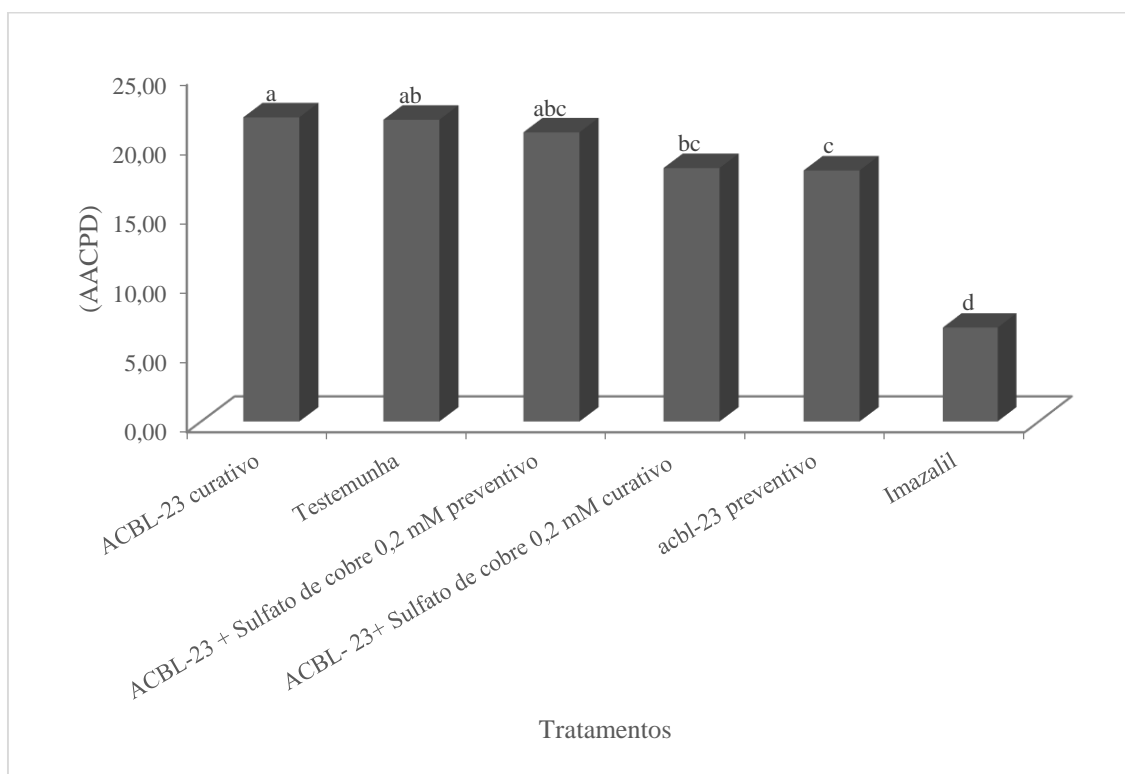


Figura 9 Área abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), determinada pelo diâmetro médio das lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de lima ácida Tahiti, após tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM).

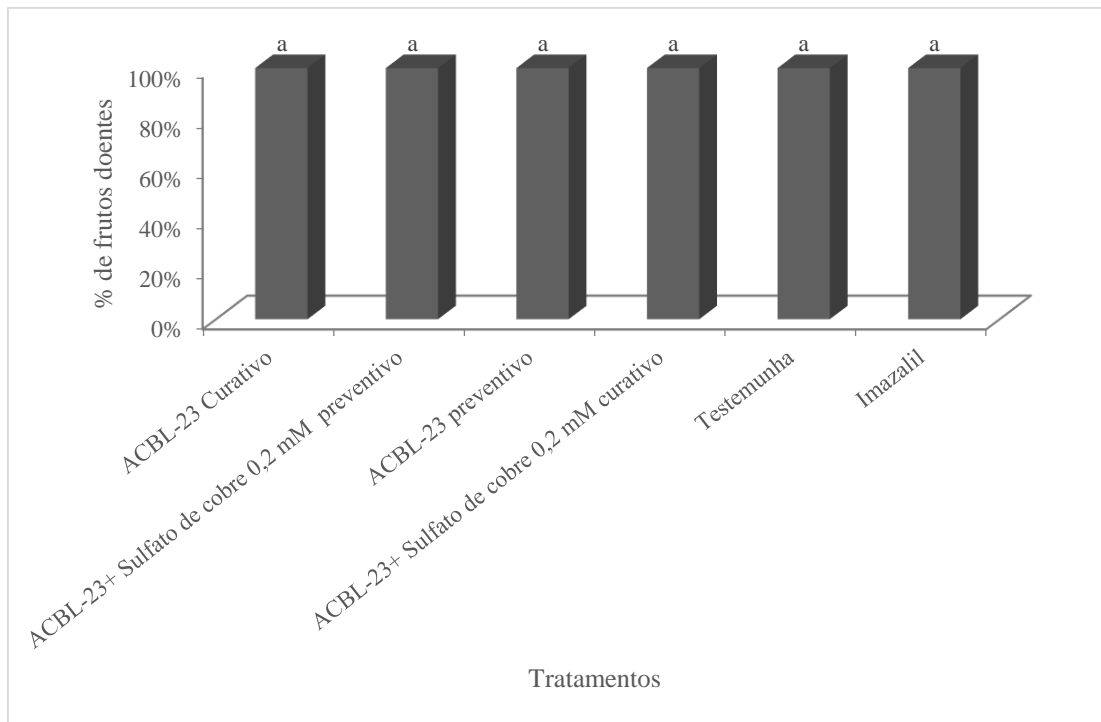


Figura 10 Porcentagem de frutos doentes de lima ácida Tahiti, após inoculação com *Penicillium italicum* e tratamento preventivo ou curativo com *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com ou sem adição de sulfato de cobre (0,2 mM).

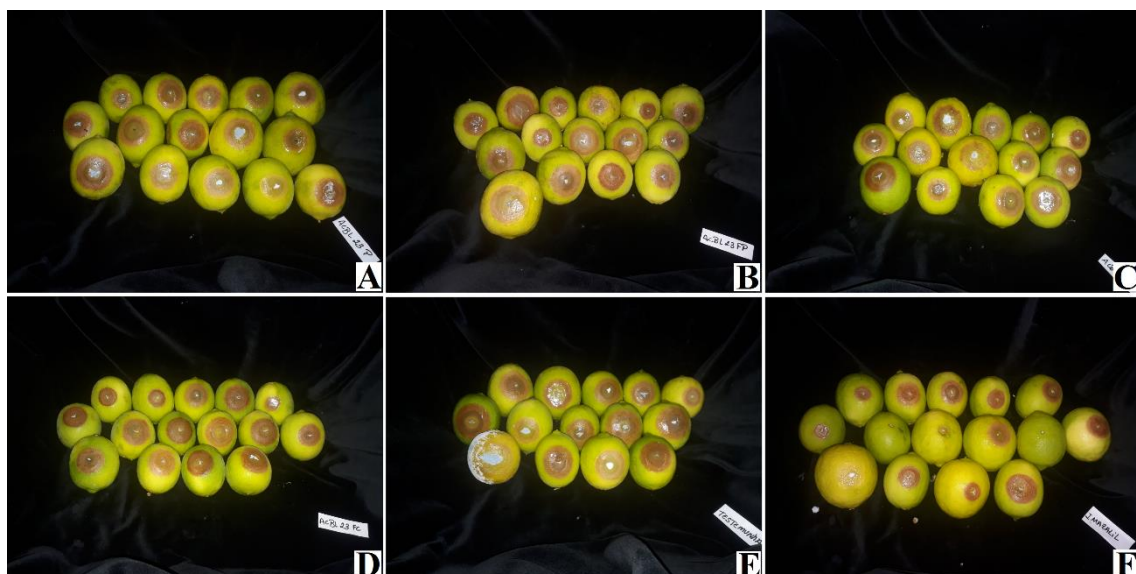


Figura 11 Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Penicillium italicum* e tratados com: A- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, após tratamento preventivo; B- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose com adição de sulfato de cobre (0,2 mM), após tratamento preventivo; C- *Rhodotorula minuta*-ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose e tratado de forma curativa; D-

Rhodotorula minuta- ACBL-23, previamente cultivada em meio batata-dextrose, com adição de sulfato de cobre (0,2 mM); E- Testemunha (sem tratamento) e F- Imazalil .

4 DISCUSSÃO

Estudos têm comprovado os modos de ação de leveduras antagônicas no biocontrole. Os principais mecanismos de ação estudados no auxílio do biocontrole na pós-colheita são: antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas hidrolíticas, resistência induzida, competição por espaço e nutriente, formação de biofilme e o papel do estresse oxidativo (Spadaro & Droby,2016).

Nos ensaios realizados *in vitro*, observou-se que a fonte de micronutriente sulfato de cobre (0,2 mM), quando adicionada ao meio de cultivo da levedura, favoreceu a sua atividade antagônica, causando inibições de 75% no desenvolvimento da colônia de *P. italicum*.

Outros dados de literatura mostram o efeito de adição de nutrientes no antagonismo de microrganismos, Zhang et al. (2011) verificaram que as fontes de carbono sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 0,5 e 1% promoveram aumento na atividade antagonística de *Pichia guilliermondii* contra *Botrytis cinerea*. Klein & Kupper (2018) demonstraram que a adição de micronutrientes, como ácido bórico, cloreto de cobalto e molibdato de amônio (1 mM) em meio de cultivo da levedura *Aureobasidium pullulans* favoreceu a ação antagônica contra *Geotrichum citri aurantii*. Por outro lado, Lutz et al. (2013) relataram que a capacidade de biocontrole de várias leveduras contra *P. expansum* foi significativamente afetada, de forma negativa, na presença de uma fonte de açúcar.

Muitos autores têm revelado que muitas leveduras têm apresentado eficiente controle de fitopatógenos mesmo sem adição de fontes nutricionais em cultivo prévio dos antagonistas. Parafati et al. (2016) descreveram que as leveduras *A. pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Wickerhamomyces anomalus* inibiram, fortemente, o crescimento micelial dos patógenos *P. italicum*

e *P. digitatum*. Liu et al. (2019) relataram que dentre as leveduras testadas no estudo, *Candida oleophila* F14, *Pseudozyma antarctica* FL17, *Metschnikowia citriensis* FL01T e FL02 foram as que mais inibiram o crescimento de *P. digitatum* e *P. italicum*

A competição é a consequência da exigência de fontes de nutrientes ou espaço por dois ou mais microrganismos. Esse mecanismo de ação é considerado o fator principal pelo qual os agentes de biocontrole suprimem patógenos na pós-colheita. O respectivo estudo mostrou que a levedura *R. minuta*-ACBL-23, independente da adição da fonte de carbono, nitrogênio e micronutriente no meio de competição foi capaz de inibir a germinação de conídios de *P. italicum* em até 75%. No entanto, a adição de fontes de carbono pode provocar maior competição entre os microrganismos envolvidos. Parte desses resultados estão de acordo com Cunha et al. (2018), que ao estudarem oito isolados de levedura verificaram que as mesmas foram capazes de inibir germinação de conídios de *P. italicum*, independente da concentração de glicose utilizada. Liu et al. (2013) relataram que a competição por nutrientes pode ser o mecanismo de ação utilizado pela levedura *Kloeckera apiculata* contra *Penicillium italicum*, agente causal do bolor azul em citros. Em contrapartida, Di Francesco et al. (2017) avaliando dois isolados de *A. pullulans* (L1 e L8), relataram que os mesmos foram capazes de prevenir a deterioração dos frutos na pós-colheita, através da competição por espaço e nutriente envolvida em sua atividade antagônica contra *Monilinia laxa*. Os conídios de *Monilinia laxa* em água apresentaram baixa porcentagem de germinação, enquanto que no suco de pêssigo a 0,5 e 5% (como fonte nutricional), a taxa de germinação dos conídios aumentou. Segundo Bautista-Rosales et al. (2013), a competição por nutrientes, foi o mecanismo de ação da levedura *Meyerozyma caribbica* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizando a sacarose como fonte de carbono. De acordo com Yu & Lee. (2015), a levedura *Pseudomonas putida* JBC17 inibiu, significativamente, a germinação de conídios de *P. digitatum*. Os ensaios revelaram que a inibição da germinação de conídios do patógeno foi exercida pela fonte de nutrientes.

Com relação aos estudos sobre a produção de biofilme, a utilização do micronutriente sulfato de cobre (0,2 mM) em meio de cultivo (batata-dextrose)

além de favorecer a produção de células de *Rhodotorula minuta* (ACBL-23), estimulou a produção de biofilme pela levedura. Esses dados corroboram, em parte, com os obtidos por Klein & Kupper (2018), onde os autores relataram que a adição de sulfato de amônio (1%) no meio de cultura aumentou a produção de biofilme por *A. pullulans* e sua atividade antagônica contra *G. citri-aurantii*. De acordo com Liu et al. (2019), a levedura *Pichia membranaefaciens*, *M. citriensis* FL01T e FL02 apresentaram alta formação de biofilme.

Os dados de biocontrole de *R. minuta*-ACBL-23 mostraram que a levedura tem potencial para controlar o bolor azul, porém, depende da variedade estudada. Somente quando frutos de laranja Lima foram tratados com a levedura, pode se perceber eficiência de controle da doença. Os menores tamanhos das lesões de bolor azul ocorreram nos frutos de laranja Lima tratados com a levedura, quando a mesma foi aplicada de forma preventiva, com ou sem adição de sulfato de cobre em seu meio de cultivo, proporcionando 45% de frutos sadios. Em frutos de tangerina Murcott ou de lima ácida Tahiti, *R. minuta* não mostrou eficiência de controle. Conforme relatado por Di Francesco et al. (2016), a maioria das doenças de pós-colheita precisam de ferimentos nos frutos, onde são disponibilizados uma grande quantidade de nutrientes nestes locais. A rápida colonização desse local depende não só da concentração do antagonistas, como também, das espécies hospedeiras que podem ser mais favoráveis para determinados agentes de biocontrole do que a outros. Segundos alguns estudos, o biocontrole depende, também, da adaptabilidade do agente de biocontrole às condições de armazenamento, ao patógeno, à fruta hospedeira e o modo de aplicação do antagonista (Liu et al., 2013; Spadaro & Droby, 2016). Por outro lado, para Oro et al. (2014), a eficácia dos agentes de biocontrole depende estritamente do nível de colonização da superfície do fruto.

Parte dos resultados obtidos, no respectivo trabalho, corrobora com o encontrado por outros autores, onde alguns relatam eficiência de leveduras no controle de doenças de pós-colheita em várias culturas e, outros nem tanto. Estudos realizados por Luo et al. (2012) relatam a eficácia de *Pichia membranefaciens* no controle de *P. italicum* e *P. digitatum* na pós-colheita de frutos cítricos. Oro et al. (2014), demonstraram que as leveduras *Metschnikowia pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Saccharomyces cerevisiae*

diminuíram a podridão marrom em cereja doce. Zhang et al. (2011) trabalhando com filtrados livres de células de *P. guilliermondii* contra *B. cinerea*, não encontraram resultados positivos para o biocontrole.

5 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) A adição de sulfato de cobre (0,2 mM) em meio de cultivo de *Rhodotorula minuta*- ACBL-23 favoreceu a atividade antagônica e manteve a produção de células viáveis da levedura;
- b) *Rhodotorula minuta*, independente da adição de fontes nutricionais, inibe a germinação de *P. italicum*;
- c) A adição de fontes de carbono sugere uma possível competição entre a levedura e o fitopatógeno;
- d) *Rhodotorula minuta* produz biofilme e a adição de uma fonte de micronutriente (sulfato de cobre a 0,2 mM), em seu meio de cultivo, estimula a sua produção;
- e) A levedura apresenta potencial para o controle do bolor azul, porém, a sua atividade antagônica depende da espécie do fruto cítrico. Somente frutos de laranja Lima, inoculados com *P. italicum* e tratados com a levedura, apresentaram um menor desenvolvimento da doença.

6 REFERÊNCIAS

Aguiar, A. T. E.; Gonçalves, C.; Paterniani, M.E.A.G.Z.; Tucci, M.L.S.; Castro, C.E.F. 2014. **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. (Boletim IAC, nº 200) 7 ed. Ver. e atual. Campinas: Instituto Agrônomo.

Barbosa, J.C.; Maldonado JR.; W. 2015. Experimentação agrônômica & AgroEstat: Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos, Jaboticabal: gráfica multipress Ltda, p. 396.

Bautista-Rosales, P. U.; Calderon-Santoyo, M.; Servín-Villegas, R.; Ochoa-Álvarez, N. A.; Ragazzo-Sánchez, J. A. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 65, n. 3, p. 293–301.

Bergamin Filho, A.; Amorim, L. 1996. **Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico**. São Paulo. Ed. Ceres, p. 299.

Bergamin Filho, A.; Amorim, L.; R. 2011. **Importância das doenças de plantas**. In: *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres.

Cunha, T. 2013. **Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros**. 151 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) - Unesp, Jaboticabal.

Cunha, T.DA.; Ferraz, L.P.; Wehr, P.P.; Kupper, K.C. 2018. Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 276, p. 20-27.

Di Francesco, A.; Martini, C.; Mari, M. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? **European Journal of Plant Pathology**, v.145, p. 711-717.

Di Francesco, A.; Ugolini, L.; D`Aquino, S.; Pagnotta, E. Mari, M., 2017. Biocontrol of *monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: Insights on competition for nutrients and space. **International Journal of food Microbiology** v. 248, p. 32-38. DOI: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2017.02.007.

Droby, S.; Vinokur, V.; Weiss, B.; Cohen, L.; Daus, A.; Goldschmidt, E.E.; Porat, R. 2009. In duction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, V. 52, p. 137-145.

Ferraz, L.P. 2014. **Estudo dos mecanismos de ação de leveduras envolvidos no biocontrole de doenças de pós- colheita em citros**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) - Unesp, Jaboticabal.

Klein, M.N.; Kupper, K.C. 2018. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, p.1–10.

Junior, G.J.S.; Behlau, F.; Bassanezi, R.B.; Lopes, S.A. 2015. **Doenças em espécies florestais e frutíferas**. Capítulo- Doenças limitantes na citricultura Brasileira: manejo atual e perspectivas. Viçosa, MG: Grupo de estudos avançados em fitopatologia.

Liu, Y.; Yao, S.; Deng, L.; Ming, J.; Zeng, K. 2019. Different mechanism of action of isolated epiphytic yeast against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. **Postharvest biology and technology**, v.152, p.100-110.

Liu, J.; Sui, Y.; Wisniewski, M.; Droby, S.; Liu, Y. 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International journal of food microbiology**, v.167, p. 153- 160.

Liu, P.; Luo, L.; Long, C.A. 2013. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. **Biological Control**, p.67, v. 157-162.

Luo, Y.; Zeng, K.; Ming, J. 2012. Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses, **Scientia horticulturae** v.135, p. 120-127.

Lutz, M. C.; Lopes, C. A.; Rodriguez, M. E.; Sosa, M. C.; Sangorrín, M. P. 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 2-3, p. 166-172.

Mattos Junior, D.DE.; Negri, J.D.DE.; Pio, R.; Pompeu Junior, J. 2005. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, Cap. 18. p. 522-523.

Moura, V.S.; Moretto, R.K.; Machado, B. I.; Kupper, K.C. 2019. Alternativa de controle de doenças de pós-colheita em citros. **Citrus research & Technology**, v. 40, e1044.

Neves, M.F.; E Trombin V.G. 2017. **Anuário da citricultura 2017**. 1º Edição. CitrusBr.

Oro, L.; Feliziani, E.; Ciani, M.; Romanazzl, G.; Comitín, F. 2014. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. **Postharvest biology and technology**, v.96, p. 64-68.

Parafati, L.; Vitale, A.; Restuccia, C.; Cirvilleri, G. 2016. The effect of locust bean gum (LBG)- based edible coatings carrying biocontrol yeast against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. **Food microbiology**, v. 58, p. 87-94.

Spadaro, D.; Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in food Science e technology**, v. 47, p.39-49.

Shaner, G.; Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization in the expression of slow- mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056.

Sun, X.; Ruan, R.; Lin, L.; Zhu, C.; Zhang, T.; WANG, M.; LI, H.; YU, D. 2013. Genomewide investigation into DNA elements and ABC transporters involved in imazalil resistance in *Penicillium digitatum*. **FEMS microbiology letters**, v. 348, p. 11–18. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12235>.

Wiyono, S.; Schulz, D.F.; Wolf, G.A. 2008. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. **Biological Control**, v. 46, p. 348–357. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.020>.

Yu, S. M.; & Lee, Y. H. 2015. Genes involved in nutrient competition by *Pseudomonas putida* JBC17 to suppress green mold in postharvest satsuma mandarin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 898–906.

Zhang, D.; Spadaro, D.; Garibaldi, A.; Gullino, M. L. 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 57, n. 3, p. 193–201.