

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MECANISMOS DE AÇÃO E INFLUÊNCIA DE  
NUTRIENTES NA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE  
*Aureobasidium pullulans* À *Geotrichum citri-aurantii***

**Mariana Nadjara Klein**

Bióloga

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MECANISMOS DE AÇÃO E INFLUÊNCIA DE  
NUTRIENTES NA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE  
*Aureobasidium pullulans* À *Geotrichum citri-aurantii***

**Mariana Nadjara Klein**

**Orientadora: Katia Cristina Kupper**

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

**2016**

Klein, Mariana Nadjara

K64m            Mecanismos de ação e influência de nutrientes na atividade antagônica de *Aureobasidium pullulans* à *Geotrichum citri-aurantii* / Mariana Nadjara Klein. -- Jaboticabal, 2016

v, 95 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Katia Cristina Kupper

Banca examinadora: Sérgio Florentino Pascholati, João Martins Pisauro Junior, Rita de Cássia Panizzi, Sandra Regina Ceccato Antonini

Bibliografia

1. Atividade enzimática. 2. Biofilme. 3. Microscopia eletrônica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:632.4

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MECANISMOS DE AÇÃO E INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES NA ATIVIDADE  
ANTAGÔNICA DE *Aureobasidium pullulans* A *Geotrichum citri-aurantii*

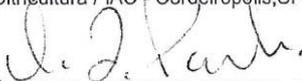
AUTORA: MARIANA NADJARA KLEIN

ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

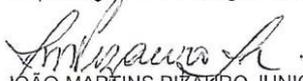
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em  
MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



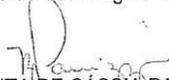
Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER  
Centro de Citricultura / IAC - Cordeirópolis, SP



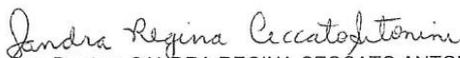
Prof. Dr. SÉRGIO FLÓRENTINO PASCHOLATI  
Setor de Fitopatologia, e Nematologia / ESALQ / USP - Piracicaba, SP



Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZURO JUNIOR  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA PANIZZI  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Professora Doutora SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI  
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural / UFSCar - Araras, SP

Jaboticabal, 20 de dezembro de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARIANA NADJARA KLEIN** – Nascida em 28 de junho de 1988, em Araras, São Paulo, Brasil. Filha de Eliana Aparecida Claudiano Klein e Paulo Cesar Klein (*in memoriam*). Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em fevereiro de 2006 no Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, na cidade de Araras, SP, concluindo seu bacharelado e licenciatura em dezembro de 2009. Durante a graduação, estagiou no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, SP, foi bolsista de iniciação científica pela Fapesp, atuando na área de Controle Biológico de Doenças Fúngicas de Citros, sob a orientação da Profa. Dra. Katia Cristina Kupper. Em março de 2010 ingressou no curso de Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural na Universidade Federal de São Carlos, como bolsista Fapesp, realizando seu projeto de pesquisa sob a mesma orientação e área, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP. Em março de 2013 ingressou no curso de doutorado 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, desenvolvendo seu projeto de doutorado no Centro de Citricultura.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

A minha mãe Eliana, pelos ensinamentos, princípios e exemplos de vida. Por ter dedicado grande parte de sua vida à nossa família, abdicando de seus próprios sonhos para realizar os nossos. Serei eternamente grata. Não tenho palavras para descrever meu amor por você, Mamy.

**DEDICO**

Ao meu pai, Paulo (*in memoriam*) sinto sua presença sempre comigo, principalmente nesse momento especial, de vitória, sei que está comemorando aí de cima.

As minhas irmãs Paula e Ana Clara, e meu sobrinho e afilhado Pablo, vocês são partes de mim. Meu coração que bate fora do peito.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

De todas as etapas da confecção de uma tese de doutorado, o item “Agradecimentos” certamente é o mais difícil e desafiador. Isso porque, aqui não depende de embasamento científico, experimentação, análise de dados, estatística...foi aqui que precisei exercitar minha memória para não esquecer de retribuir, pelo menos com palavras de carinho, a contribuição de cada pessoa ou instituição que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Sendo assim, meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a **Deus**, por ser sempre tão generoso comigo, colocando anjos em meu caminho,

A Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> **Katia Cristina Kupper** pela orientação (não apenas profissional) em todos esses anos de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. Mais que uma orientadora, uma amiga. Seu entusiasmo e dedicação fez com que me apaixonasse pela ciência. Serei eternamente grata pela força, conselhos (de mãe), puxões de orelha, amizade, infinitas conversas (científicas e à toa). Sentirei saudades. Minha eterna gratidão, por tudo!

Aos professores, membros da banca de defesa, **Sandra Regina Ceccato-Antonini, Rita de Cássia Panizzi, Sergio Florentino Pascholati e João Martins Pisauro Junior**, pelo aceite do convite da composição da banca. Tenho certeza que o profundo conhecimento de cada membro foi fundamental para a melhoria do trabalho.

Aos professores da FCAV/UNESP, **Jackson Antonio Marcondes de Souza, Ben-Hur Mattiuz, Márcia Justino Rossini Mutton e Eliana Gertrudes Macedo Lemos**, pelas correções e sugestões no exame de qualificação, que foram importantes para o prosseguimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de doutorado concedida.

Ao **Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária** pela oportunidade do curso de doutorado. Nós, alunos, reconhecemos o árduo trabalho dos coordenadores, professores, e secretaria para a manutenção e melhoria da qualidade do curso.

Á **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 **Diogo, Hugo e Branca**.

Ao **Centro de Citricultura** pela oportunidade desses 8 anos de estágio e aprendizado. A todos os pesquisadores e aos funcionários **Isabel, Nidelci, Nadji, Vivian, Valéria, Maria, Rose, Genésio, Vanderlei, Everaldo, Hugo, Keke, Chica, Cida, Silvani**. Peço perdão dos que não citei. São muitas pessoas nesses anos.

Aos amigos do laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, **Luriany, Aline, Andreia, Bianca, Ariane, Vanessa, Flavia, Wesley**. E a todos que passaram por lá nesses 8 anos de trabalho: **Marcos, Tatiane, Pitt, Gilmar, Willian, Larissa, Vitor, João**. Aos amigos que fiz no CCSM **Francisco, Evandro, Karina, Leo, Marilia, Thais**. Mais uma vez, peço desculpas se esqueci alguém. Obrigada pela colaboração de cada um! Seja pela ajuda em lavar vidraria (que nunca acaba!), ou até mesmo pela palavra amiga, o sorriso fácil. Sou muito grata! Sentirei muita falta de todos.

As meninas de Jaboticabal, **Juliana, Ro, Raissa, Daiane e Mariana**. Obrigada pela amizade e pelas hospedagens nas idas à Jaboticabal. As minhas amigas **Silvana, Mariana, Carol, Tassiara, Amanda, Alessandra, Manu, Daniela, Fernanda, Silvia** Vocês não imaginam como os encontros da Luluzinha me faziam bem.

Á **Citrícola Lucato** pela doação dos frutos em todos os experimentos.

Á Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Giuseppina Pace Pereira Lima**, do Instituto de Biociências – Unesp Câmpus de Botucatu, e equipe do Departamento de Química e Bioquímica, pela colaboração nos testes enzimáticos e pelas explicações, que mais pareciam aulas de Bioquímica. Obrigada, professora Fina!

A equipe do **Laboratório de Microscopia Eletrônica** do Instituto de Biociências – Unesp Câmpus de Botucatu, Carol, obrigada pelos ensinamentos. As lindas fotos enriqueceram meu trabalho.

A minha amiga **Lilian**, que conheci no CCSM, e que me abrigou nas idas a Botucatu. Obrigada pela hospitalidade, pela degustação de cervejas e pelos “rolês”. Amizade de longa data.

A **Maria Amélia R. P. Cardoso**, que me ajudou muito nas análises de qualidade, no Laboratório de Análise de Qualidade de Fruta do CCSM.

As professoras **Martha Regina Lucizano Garcia** (FCAV/UNESP) e **Marcia Maria Rosa** (CCA/UFSCar) pela oportunidade de estágio docência em Microbiologia. Além de aumentar meu conhecimento na área, agradeço o carinho e amizade que tivemos!

E, finalmente, aos meus pais **Eliana** e **Paulo**, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar com minhas próprias pernas. A meu pai (*in memoriam*), que onde quer que esteja nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim. Mãe, você me gerou e me ensinou a viver num mundo tal como ele é. E eu aprendi direitinho! A vocês dois que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria de mais este momento especial. Minhas irmãs **Paula** e **Ana Clara**, e meu afilhado lindo **Pablo**. Seus corações estão comigo, e o meu com vocês, sempre! Não tenho palavras para descrever como vocês são fundamentais em minha vida. Minha avó **Benedita** e todos meus tios e primos. Amo vocês!

Ao **Rodrigo Masetto**, amigo, namorado, noivo e agora, marido. Sem palavras para descrever sua importância na minha trajetória. Aguentou firme, ao meu lado, todo meu mau humor, minha choradeira, quando tudo parecia estar errado, minhas decepções. Mas que comemorou comigo os artigos e projetos aceitos. Enfim, mesmo sem entender muito desse meu mundo louco, está sempre comigo. Obrigada, amor! Aproveito e agradeço também ao apoio que tive da família do Rodrigo, principalmente ao meu sogro, **Roberto**.

Palavras não conseguem expressar a gratidão que sinto por todos!

“E aprendi que se depende sempre  
De tanta, muita, diferente gente  
Toda pessoa sempre é as marcas  
Das lições diárias de outras tantas pessoas.  
É tão bonito quando a gente entende  
Que a gente é tanta gente  
Onde quer que a gente vá.  
É tão bonito quando a gente sente  
Que nunca está sozinho  
Por mais que pense estar...”

(Caminhos do coração – Gonzaguinha)

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	lv
ABSTRACT.....	v
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Citricultura brasileira.....	4
2.2 <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	5
2.3 <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	8
2.4 Biofilme.....	11
2.5 Mecanismos bioquímicos envolvidos na indução de resistência.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Atividade antifúngica in vivo de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	19
3.2 Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	20
3.3 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	21
3.4 Competição por nutrientes entre <i>Aureobasidium pullulans</i> e <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	22
3.5 Efeito da adição de fontes nutricionais em meio de cultivo na produção de células por <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	23
3.6 Efeito de fontes nutricionais na produção de biofilme de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	24
3.7 Atividade antifúngica in vivo de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	25
3.8 Sobrevivência de <i>Aureobasidium pullulans</i> no sítio de infecção.....	26
3.9 Estudo de microscopia eletrônica da interação entre <i>Geotrichum citri-aurantii</i> e <i>Aureobasidium pullulans</i> no sítio de infecção.....	27
3.10 Efeito de aplicações de <i>Aureobasidium pullulans</i> nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos.....	27

3.10.1 Rendimento do suco.....	28
3.10.2 Teor de sólidos solúveis totais (SS) .....	29
3.10.3 Acidez total titulável (ATT) .....	29
3.10.4 “Ratio” .....	30
3.11 Análises bioquímicas.....	31
3.11.1 Compostos fenólicos.....	31
3.11.2 Peroxidase (POD) .....	31
3.11.3 Polifenoloxidase (PPO) .....	32
3.11.4 Fenilalanina amônia liase (PAL) .....	33
3.12 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Atividade antifúngica in vivo de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	34
4.2 Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	35
4.3 Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	36
4.4 Competição por nutrientes entre <i>Aureobasidium pullulans</i> e <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	39
4.5 Efeito da adição de fontes nutricionais em meio de cultivo na produção de células por <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	41
4.6 Efeito de fontes nutricionais na produção de biofilme de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	42
4.7 Atividade antifúngica in vivo de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	44
4.8 Sobrevivência de <i>Aureobasidium pullulans</i> no sítio de infecção.....	47
4.9 Estudo de microscopia eletrônica da interação entre <i>Geotrichum citri-aurantii</i> e <i>Aureobasidium pullulans</i> no sítio de infecção.....	49
4.10 Efeito de aplicações de <i>Aureobasidium pullulans</i> nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos.....	51
4.11 Análises bioquímicas.....	59
4.11.1 Compostos fenólicos.....	59

4.11.2 Peroxidase (POD) .....	62
4.11.3 Polifenoloxidase (PPO) .....	65
4.11.4 Fenilalanina amônia liase (PAL) .....	68
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS.....	81

## MECANISMOS DE AÇÃO E INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES NA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE *Aureobasidium pullulans* À *Geotrichum citri-aurantii*

**RESUMO** - A eficiência de biocontrole da levedura *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 foi avaliada contra *Geotrichum citri-aurantii*, agente causal da podridão azeda em citros, e suas interações foram estudadas *in vitro* e *in vivo*. Para isso, foram avaliados: (i) a eficiência de biocontrole do patógeno por *A. pullulans* ACBL-77; (ii) o efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células da levedura; (iii) a incorporação de fontes nutricionais na otimização da atividade antagônica; (iv) a competição de nutrientes entre os microrganismos; (v) o efeito dos nutrientes na produção de células da levedura e na quantificação de biofilme e sua relação no biocontrole da doença; (vi) a sobrevivência da levedura em frutos cítricos; (vii) a interação entre os microrganismos em microscopia eletrônica de varredura; (viii) o efeito da aplicação da levedura na qualidade de frutos cítricos, e, finalmente, (ix) o efeito de *A. pullulans* na atividade das enzimas possivelmente envolvidas com a indução de resistência de frutos. Pelos resultados obtidos nesse trabalho, verificou-se que, nos frutos tratados preventivamente com *A. pullulans* ACBL-77 a porcentagem de controle foi maior do que quando os tratamentos foram realizados de maneira curativa. O meio de cultivo batata-dextrose-ágar foi o que promoveu maior quantidade de células da levedura. A incorporação de micronutrientes, como ácido bórico, cloreto de cobalto e molibdato de amônio (1 mM) em meio de cultivo da levedura favoreceu a ação antagônica *in vitro*. Sulfato de amônio 1 % e sacarose 0,5 % promoveram aumento na porcentagem de inibição da germinação de conídios. Porém, a adição de sulfato de amônio 1% no meio de cultivo da levedura estimulou a produção de biofilme e, conseqüentemente, aumentou sua ação antagônica contra a doença *in vivo*. Aplicação de *A. pullulans*, previamente cultivada em meio acrescido de sulfato de amônio (1%), favoreceu a sobrevivência da levedura em ferimentos de frutos cítricos e provocou deformações nas hifas do fitopatógeno. A aplicação da levedura não alterou a qualidade de frutos cítricos, mas aumentou as atividades de enzimas possivelmente envolvidas com a defesa dos frutos a patógenos. Esses resultados mostram a importância da adição e do tipo de nutriente, quando da formulação de um bioproduto a base deste isolado, visando a sua utilização em escala comercial. Além disso, esse é o primeiro relato de uma correlação positiva do aumento na quantificação de biofilme produzido por *A. pullulans*, em função da fonte de nutriente, com o aumento da sua atividade antagônica.

**Palavras-chave:** atividade enzimática, biofilme, microscopia eletrônica, podridão azeda, qualidade de frutos, sulfato de amônio

## MECHANISMS OF ACTION AND NUTRIENTS INFLUENCE IN THE ANTAGONIC ACTIVITY OF *Aureobasidium pullulans* AGAINST *Geotrichum citri-aurantii*

**ABSTRACT** - The biocontrol efficiency of *Aureobasidium pullulans* strain ACBL-77 was evaluated against *Geotrichum citri-aurantii*, the causal agent of sour rot in citrus, and their interactions were studied *in vitro* and *in vivo*. For this purpose, were evaluated (i) the biocontrol efficiency of *A. pullulans* ACBL-77 against the pathogen; (ii) the effect of different culture media on the production of yeast cells; (iii) the incorporation of nutritional sources in optimizing the antagonistic activity; (iv) the competition for nutrients between the microorganisms; (v) the effect of nutrients on yeast cell and biofilm production and their relation in the biocontrol of disease; (vi) the survival of yeast in citrus fruits; (vii) the interaction between the microorganisms by scanning electron microscopy; (viii) the effect of *A. pullulans* applications in the citrus fruits quality; (ix) the effect of ACBL-77 in the activity of the enzymes possibly involved with resistance induction. In the results this study, were verified that in the fruits treated with *A. pullulans* ACBL-77, preventively, the control percentage was higher than the curative treatment. The potato-dextrose-agar medium promoted the highest amount of yeast cells. The incorporation of micronutrients, such as boric acid, cobalt chloride and ammonium molybdate (1 mM), favoured the antagonistic action of *A. pullulans in vitro*. Ammonium sulphate 1mM and sucrose 0.5% favoured the yeast during the competition between the microorganisms. However, the addition of ammonium sulphate at 1% in the yeast culture stimulated biofilm production and consequently increased the antagonistic activity against the pathogen *in vivo*. The application of *A. pullulans* to fruits allowed the better survival of yeast in wounded sites of citrus fruit. The yeast was found to be able to form biofilm on citrus, deforming the pathogen hyphae. The application of yeast did not change the quality of citrus fruits, but increased the activities of the enzymes possibly involved in the defense of the fruits to pathogens. These results show the importance of the addition of nutrients and the types of nutrients in *A. pullulans* based-formulations when aiming for their use on a commercial scale. Additionally, this is the first report of a positive correlation between the increase in the quantity of biofilm produced by *A. pullulans*, depending on the nutrient source, with increased antagonistic activity.

**Keywords:** ammonium sulphate, biofilm, citrus quality, electron microscopy, enzyme activity, sour rot.

## 1.INTRODUÇÃO

Na agroindústria, desde a década de 80, a citricultura brasileira desempenha um importante papel, sendo que o país se tornou o maior e o mais competitivo produtor no mercado mundial de laranja (COSTA et al., 2012). Além disso, é o maior exportador de suco de laranja congelado, sendo responsável por 60% da exportação (MAPA, 2016). A atividade citrícola brasileira gera aproximadamente 230 mil empregos, direta ou indiretamente, correspondendo a uma massa salarial de R\$ 676 milhões por ano (NEVES, 2010). Porém, a ocorrência de doenças pode acarretar na diminuição da produtividade, principalmente, com as doenças que ocorrem na pós-colheita dos citros. Durante o armazenamento, os frutos cítricos são expostos a fitopatógenos que ocorrem na pós-colheita, podendo infectar o hospedeiro através de ferimentos ocorridos durante a colheita, transporte e manipulação dos frutos (KARIM et al., 2015). A podridão azeda, também conhecida por podridão ácida, causada pelo fungo *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) (BUTLER; FOGLE; MIRANDA, 1988) é uma das doenças mais importantes da cultura, afetando todas as espécies e cultivares em todos os países produtores (TALIBI et al., 2012).

A podridão azeda não é controlada por nenhum dos fungicidas, como imazalil e o tiabendazol, que são registrados para o controle de doenças de pós-colheita, durante o beneficiamento de frutos em *packing house* (LIU et al., 2009). Os fungicidas guazatina e propiconazol podem controlar a doença patógeno, porém, não têm registros em muitos países, inclusive, no Brasil (BROWN, 1988; McKAY et al., 2012). Segundo Hao et al. (2010), a falta de registro de um produto para controle dessa doença tem se tornado um problema sério para a comercialização de frutos cítricos de qualidade. Portanto, desenvolver estratégias de controle de *G. citri-aurantii* tem sido um desafio para os pesquisadores.

Nesse contexto, o uso de leveduras tem apresentado resultados promissores, principalmente, no controle de doenças de pós-colheita de frutas (SPADARO; DROBY, 2016). A espécie *Aureobasidium pullulans* De Bary (Arnaud), isolado ACBL-77, mostrou-se eficiente no controle da podridão azeda de citros, com produção de

quitinase e atividade *killer* como possíveis mecanismos de ação contra o patógeno (FERRAZ et al., 2016).

Conhecer os mecanismos de ação do antagonista é essencial para o desenvolvimento de tecnologias de manejo de controle na fase de pós-colheita, como também, o desenvolvimento de formulações comerciais e métodos de aplicação para maximizar o uso do agente de controle biológico em larga escala (SPADARO; DROBY, 2016).

Dados de literatura têm mostrado que *A. pullulans* apresenta diversos mecanismos de ação contra fitopatógenos, como por exemplo, competição por espaço e nutrientes (BENCHEQROUN et al., 2007); produção de compostos antifúngicos termoestáveis (ADIKARAM; JOYCE; TERRY, 2002); produção de enzimas hidrolíticas (ZHANG et al., 2010); produção de proteases (ZHANG et al., 2012); produção de compostos voláteis e livre de células (Di FRANCESCO et al., 2015); produção de toxina *killer* (FERRAZ et al., 2016); produção de aureobasidina (AbA), que age como antibiótico (LIU et al., 2007), além de atuar como agente indutor de respostas de defesa da planta (IPPOLITO et al., 2000).

Além disso, cepas de *A. pullulans* podem apresentar produção de metabólitos secundários como os expolissacarídeos (EPS). A quantidade desses EPS pode ser afetada pela concentração de diferentes fontes de nitrogênio durante o cultivo do microrganismo (JIANG; WU; MOON KIM, 2011). Neste sentido, de acordo com Ravella et al. (2010), microrganismos se agregam e formam um biofilme pela criação de uma rede de células e de EPS, formando um gel que age para manter os microrganismos ligados no biofilme, causando aderência na superfície e protegendo-os contra condições adversas.

Muitos fatores podem influenciar a formação de biofilme por leveduras, sendo primordial a fixação inicial do microrganismo no tecido vegetal, que é mediada por proteínas específicas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol, presentes na parede celular da levedura (FINKEL; MITCHELL, 2011; PU et al., 2014).

A produção de pululana, um EPS produzido por *A. pullulans*, pode ser estimulada com a adição de sulfato de amônio ou de nitrato de amônio (BULMER;

CATLEY; KELLY, 1987; RAVELLA et al., 2010) no meio de cultivo, influenciando na produção, composição e na eficiência desses EPS's. Nesse sentido, para melhorar a viabilidade e eficiência do agente de biocontrole na pós-colheita, estudos devem ser realizados na combinação de antagonistas com nutrientes que podem otimizar seu desempenho (VERO et al., 2009).

Além do mais, na interação planta-patógeno há mecanismos bioquímicos nos quais alguns genes são ativados, atuando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, que podem estar envolvidos na defesa da planta. A indução de resistência tem sido considerada como uma estratégia para promover a resistência do fruto e reduzir os prejuízos na pós-colheita (LU et al., 2013). O aumento da resistência pode ser estimulado através da aplicação de agentes de biocontrole, ou pela produção de substâncias antifúngicas pela própria planta hospedeira (DROBY et al., 2002; NANTAWANIT et al., 2010), que fornece resistência sistêmica de longa duração contra vários patógenos e pragas (WALLING, 2001). Nesse sentido, os compostos fenólicos e enzimas indicativas de indução de resistência apresentam importância significativa no ciclo das plantas, uma vez que são parte integrante de uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos. Dentre as enzimas destacam-se a peroxidase (POD), a polifenoloxidase (PPO) e a fenilalanina amônia liase (PAL).

Este trabalho teve por objetivo estudar mecanismos de ação e a influência de nutrientes na atividade antagônica de *A. pullulans* ACBL-77 para o biocontrole de *G. citri-aurantii*. Para isso, avaliou-se: (i) a eficiência de biocontrole da podridão azeda pelo antagonista; (ii) o efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células da levedura; (iii) a incorporação de fontes nutricionais na otimização da atividade antagônica da levedura; (iv) a competição por nutrientes entre os microrganismos; (v) o efeito dos nutrientes na produção de células da levedura e na quantificação de biofilme e sua relação no biocontrole; (vi) a sobrevivência da levedura em frutos cítricos; (vii) a interação entre os microrganismos por meio de microscopia eletrônica de varredura; (viii) o efeito da aplicação da levedura na qualidade de frutos cítricos, e, (ix) o efeito de *A. pullulans* na atividade das enzimas possivelmente envolvidas com a indução de resistência de frutos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Citricultura brasileira

Na agroindústria, desde a década de 80, a citricultura brasileira desempenha um importante papel, sendo que o país se tornou o maior e o mais competitivo produtor no mercado mundial de laranja (COSTA et al., 2012). Além disso, é o maior exportador de suco de laranja congelado, sendo responsável por 60% da exportação (MAPA, 2016). A atividade citrícola brasileira gera aproximadamente 230 mil empregos, direta ou indiretamente, correspondendo a uma massa salarial de R\$ 676 milhões por ano (NEVES, 2010).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) publicou que a safra de 2015/2016 apresentou uma produção de laranja estimada em 16,7 milhões de toneladas, ocupando uma área de 664,4 mil hectares. Segundo dados de 2014 da “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAO) o Brasil produziu 18 milhões de toneladas de laranja, correspondendo a 30% da safra mundial e cujo valor das exportações gerou cerca de U\$1,5 bilhão no ano para a economia brasileira. Os Estados Unidos aparecem em segundo lugar, com a produção de cerca de 8 milhões de toneladas de laranjas.

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento CONAB (2014), a produção de citros está localizada basicamente na região sudeste do país, principalmente no estado de São Paulo, responsável por cerca de 80% da produção total. Com relação à safra 2015/16, a área ocupada com pomares de citros no Estado de São Paulo foi estipulada em 412 mil hectares, sendo a área produtiva em torno de 464,4 mil hectares. Na safra 2013/2014, cerca de 268,6 milhões de caixas de 40,8 quilos de laranja foram produzidas, com a produtividade média de 615 caixas por hectare. Porém, todos esses valores já foram maiores quando comparados a safras anteriores, e isso demonstra que o setor tem enfrentado uma severa crise. Segundo dados do CONAB (2014), o custo de produção tem se elevado, principalmente devido ao aumento da ocorrência de pragas e doenças. Os prejuízos econômicos

ocasionados por doenças, principalmente as que ocorrem na fase de pós-colheita, causadas por fungos, representam um dos principais obstáculos da citricultura brasileira. Tais patógenos comprometem a qualidade e comercialização dos frutos, sendo responsáveis por perdas de até 50 % na produção (FISHER et al., 2007).

Entre as várias doenças de pós-colheita de frutos cítricos, o bolor verde e o bolor azul, ocasionados por *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, respectivamente, são os que causam maiores prejuízos econômicos. *Geotrichum citri-aurantii*, agente causal da podridão azeda em citros, apesar de ser menos frequente, quando comparado com os fungos causadores de bolores, tem sido relatado como um patógeno economicamente importante para citros, especialmente durante os períodos chuvosos, pela falta de produtos químicos para o seu controle (PARAFATI et al., 2016; DUAN et al., 2016).

## **2.2 *Geotrichum citri-aurantii***

A podridão azeda, também conhecida por podridão ácida, causada pelo fungo leveduriforme *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) R. Cif. & F. Cif. (Sinônimo *Geotrichum candidum* Link) (PITT; HOCKING, 1997; PLAZA et al., 2003), é uma das doenças mais importantes para a pós-colheita de citros pois, ocorre em todos os países produtores da cultura, afetando todas as espécies e cultivares, sendo que as variedades de tangerinas geralmente desenvolvem a doença mais rapidamente do que as variedades de laranjas ou grapefruits (TALIBI et al., 2012).

O fungo cresce rapidamente em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA), produz colônia esbranquiçada e com cadeias de artrósporos. O tamanho do conídio pode variar entre 2-8 x 3-50  $\mu\text{m}$  e 3-6 x 6-12  $\mu\text{m}$  (BUTTLER; ECKEN, 1962; TIMMER; BROWN, 2000).

Embora os prejuízos causados pela podridão azeda sejam relativamente menores, quando comparadas aos bolores, a doença pode ocorrer com maior impacto dependendo do ano, da estação e da área de cultivo.

O solo é o habitat natural de *G. citri-aurantii*, mas o fungo pode ser transportado para as superfícies dos frutos cítricos e, conforme os frutos amadurecem se tornam mais suscetíveis à infecção. Altos níveis de umidade na casca, como quando o fruto é colhido no início da manhã seguinte à irrigação ou chuva, favorecem a germinação e o desenvolvimento de conídios do fungo (TALIBI et al., 2012). O desenvolvimento da podridão azeda depende também de temperaturas acima de 10 °C, sendo que o progresso da doença é bem mais rápido entre 25-30 °C e pH ácido (em torno de 2,7) (SAVASTANO; FAWCETT, 1929).

O fungo penetra nos frutos através de ferimentos e as lesões se estendem para o albedo. A susceptibilidade dos frutos cítricos ao patógeno pode ser associada à sua maturação, a longos períodos de armazenamento e à ocorrência de chuva, principalmente antes e durante o período de colheita (TOFFANO, 2005), o que determina a quantidade de inóculo, grau de disseminação e, como resultado, nível da população do patógeno presente nos frutos até chegar ao *packing house* (ECKERT; BROWN, 1986).

Além disso, outros fatores interferem na incidência e na severidade da doença como a quantidade de inóculo do fungo em um ponto do fruto suscetível, relação que acontece em *G. citri-aurantii*, como relatado por Baudoin e Eckert (1982). A quantidade dos esporos do fungo que está no *packing house* influencia diretamente no nível da podridão, principalmente, em fungos que precisam de porta de entrada para causar infecção, como é o caso de *G. citri-aurantii* (BROWN, 1975). Outra fonte de alta contaminação é a água, pois se há uma alta população de conídios na água, todos os frutos estarão expostos e, suscetíveis à infecção. Portanto, água contaminada pode espalhar conídios para tanques, drenchers, escovas de lavar, como para outros frutos na embalagem (KORSTEN; TAVERNER, 2009).

Quando o fruto cai no chão também contém populações mais elevadas de esporos fúngicos devido à aderência do solo (BROWN, 2003). Além do mais, o odor ácido característico da podridão atrai moscas, acarretando maior disseminação do

patógeno e provocando lesões em outros frutos, tornando-os suscetíveis ao ataque de *G. citri-aurantii*, bem como, a outros patógenos de pós-colheita de citros (REES; FARREL; ORCHARD, 2012).

A infecção causa cheiro desagradável de vinagre, característico da doença, o que origina seu nome podridão azeda, diferente de todos os bolores que ocorrem na pós-colheita, mesmo que os sintomas iniciais sejam semelhantes entre eles. *Geotrichum citri-aurantii* produz enzimas extracelulares que degradam a casca fazendo com que o fruto desintegre em uma massa viscosa e encharcada. O fruto aparece de coloração amarelo-escura, como sintoma inicial da doença (REES; FARREL; ORCHARD, 2012). A cutícula é facilmente deslizada na epiderme formando camadas enrugadas com subsequente cobertura do micélio de cor branca ou creme. O patógeno degrada o fruto por completo em aproximadamente cinco dias, em uma massa viscosa, frequentemente associada ao bolor verde, que até pode ser estimulada por sua presença (LIU et al., 2009; PALOU; SMILANICK; CRISOTO, 2009).

Embalagens em que o fruto permaneça embalado individualmente, sem contato com outros frutos ou, que haja camadas de fruta em caixas embaladas pode ajudar a reduzir a disseminação do patógeno. Uma alternativa para amenizar a infecção é armazenamento em temperatura refrigerada, porém, quando o fruto for transferido para uma temperatura mais alta para comercialização, o fungo rapidamente retomará seu crescimento (REES; FARREL; ORCHARD, 2012).

A podridão azeda não é controlada por nenhum dos fungicidas registrados para o controle de doenças de pós-colheita, como o imazalil e o tiabendazol, durante o beneficiamento de frutos em *packing house* (LIU et al., 2009). Os fungicidas guazatina e propiconazol podem controlar a podridão ácida, mas não têm registros em muitos países, inclusive no Brasil (BROWN, 1988; McKAY et al., 2012). Segundo Hao et al. (2010), a falta de registro de um produto para controle dessa doença tem se tornado um problema sério para a comercialização de frutos cítricos de qualidade. Portanto, desenvolver estratégias de controle de *G. citri-aurantii* tem sido um desafio para os pesquisadores.

### 2.3 *Aureobasidium pullulans*

*Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud é um organismo polimórfico, classificado como sendo do Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Dothideales, Família Dothioraceae e Gênero *Aureobasidium* (NATURDATA, 2016).

*In vitro* esta espécie apresenta crescimento inicial de coloração clara (roseada) e ao passar dos dias, sua colônia pode escurecer, tornando-se roxeada, em consequência à melanização de suas hifas. Devido a essa característica, é comumente conhecida como "levedura negra". Essas hifas melanizadas sofrem septação, formando clamidósporos ou artrósporos, e conídios de cor clara são produzidos nas hifas sem melanina (ZALAR et al., 2008). A melanina produzida não serve apenas para dar a cor característica à levedura, como também fornece proteção contra a lise do microrganismo, à irradiação solar, à luz ultravioleta e à morte por radicais livres (FRANZEN et al., 1999). Por ser um microrganismo polimórfico, é capaz de crescer em células individuais chamadas *yeast-like*, caracterizada pela presença de hifas largas, policarióticas, mostrando conidiação síncrona ou, como hifas septadas apresentando células de brotamento (YURLOVA; HOOG, 1997; SINGH et al., 2015).

É um microrganismo ubíquo, facilmente encontrado em vários nichos ecológicos, incluindo solo, água e tecido vegetal. Devido à facilidade de propagação, essa espécie é dispersa globalmente, com exceção de ambientes muito frios (ZALAR et al., 2008).

De acordo com Chi et al. (2009), como essa espécie é amplamente distribuída em vários ambientes e apresenta características fisiológicas diferentes, tem potencial de aplicação em muitas áreas biotecnológicas. *Aureobasidium pullulans* é tolerante a ambientes contaminados com metais pesados, podendo ser isolada de locais contaminados com cádmio, chumbo, etc. (CERTIK et al., 2005). Também há relato do uso deste microrganismo na produção de enzimas úteis para fármacos, alimentos, detergentes e transformações bio-orgânicas. (PARAWIRA, 2008). *Aureobasidium pullulans* é caracterizada por apresentar alta variabilidade e instabilidade genética (YURLOVA et al., 1995). Sua morfologia não é suficiente para avaliar a variabilidade interespecífica e para diferenciar estirpes estreitamente relacionadas. Geralmente é

classificada como não patogênica. Porém, há relatos raros de cepas que podem causar danos às plantas (COOKE, 1959).

Para o sucesso no biocontrole, o microrganismo deve ser tolerante a alguns intemperies como, pouca disponibilidade de nutrientes, radiação ultra-violeta, baixa temperatura e às diversas mudanças climáticas. *Aureobasidium pullulans* é um dos microrganismos saprófitas que melhor se adapta, tanto na filosfera quanto na troposfera, pois é altamente tolerante a dessecação e irradiação (GAUR et al., 2010).

Há relatos que *A. pullulans* tem amplo espectro de ação contra diversos patógenos. Um de seus metabolitos é a aureobasidina A (AbA), um antibiótico fúngico depsipeptídeo cíclico, com atividade antifúngica contra diversos fitopatógenos (TAKESAKO et al., 1991). Liu et al. (2007) comprovaram que AbA inibiu a germinação e o crescimento do tubo germinativo de *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde em citros, como também de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento em morango, podendo reduzir a incidência dessas doenças. Os autores citam, ainda, que a atuação da AbA é no bloqueio da atividade de inositolfosforilceramida sintase (IPC), uma enzima que está presente em fungos e que é essencial para a biossíntese dos esfingolípídios.

Outro metabólito importante produzido por *A. pullulans* é o biopolímero pululana. Apesar da biossíntese da pululana ser desconhecida, sabe-se que é sintetizada intracelularmente e depois excretada (LEATHERS, 2003). Esse biopolímero tem grande importância em diversas áreas da biotecnologia como na produção de plásticos biodegradáveis, como aditivos alimentícios e para biorremediação de ambientes contaminados (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011).

De acordo com estudos de Zalar et al. (2008) há variação entre cepas de *A. pullulans* em relação a produção de melanina, que pode ser de grande valor para a indústria biotecnológica, uma vez que, a melanina é altamente significativa para a produção de pululana e aureobasidina (YURLOVA; HOOG 1997).

Estudos de Yurlova e Hoog (1997) relataram preferências nutricionais de cepas de *A. pullulans aubasidani*, que produzem aubasidana utilizando-se de nitrato de sódio, enquanto que cepas de *A. pullulans pullulans* produzem pululana quando há

presença de sulfato de amônio, comprovando que cepas de *A. pullulans* podem ter preferências por diferentes fontes de nitrogênio, resultando na produção de diferentes exopolissacarídeos (EPS). Sendo assim, acredita-se que tais preferências de *A. pullulans* quanto ao tipo de fonte de nitrogênio, bem como a quantidade necessária, estão diretamente vinculadas ao metabolismo do microrganismo, onde tais fontes podem otimizar sua eficiência antagonica.

*Aureobasidium pullulans* vem sendo estudada há anos como um agente de controle biológico em diversas culturas, principalmente, com doenças ocorridas na fase de pós-colheita. Bencheqroun et al. (2007) encontraram resultados positivos no controle de *Penicillium expansum*, causador do bolor azul em maçã, utilizando uma cepa de *A. pullulans*, alcançando até 97% de frutos sem sintomas da doença. Ippolito et al. (2000) também estudaram uma cepa dessa mesma espécie para controle de *P. expansum* e *B. cinerea* em maçãs, com redução de até 89% na incidência das doenças. Lima et al. (1997) também relataram resultados satisfatórios quando aplicaram *A. pullulans* contra *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, causadores do bolor cinzento e da podridão mole, respectivamente, em morangos. Diversas cepas de *A. pullulans* foram avaliadas quanto ao potencial antagonico à *B. cinerea* e *Monilinia laxa*, reduzindo a incidência dessas doenças de pós-colheita em até 80% em cereja e 64% em uva, através de tratamento curativo (SCHENA et al., 2003). Neste mesmo estudo, os autores conseguiram valores de 38 a 47% de redução das doenças, quando aplicaram *A. pullulans* ainda na fase de pré-colheita.

O antagonismo de uma cepa de *A. pullulans* contra diversos patógenos de pós-colheita de maçã, como *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer* e *Aspergillus niger*, de acordo com pesquisas de Castoria et al. (2001), parece envolver a competição por nutrientes, porém, a detecção de exochitinase [N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (Nagase)] e  $\beta$ -1-3-glucanase extracelular *in vitro* e *in vivo*, também, sugeriram atividade adicional dessas enzimas na atividade antifúngica. Em estudos de Ferraz et al. (2016), *A. pullulans*, isolado ACBL-77, mostrou-se eficiente no controle da podridão azeda de citros, com produção de quitinase e atividade *killer* como possíveis mecanismos de ação contra o patógeno.

O sucesso de leveduras antagonistas utilizadas no biocontrole de doenças de pós-colheita tem conduzido pesquisas sobre o desenvolvimento de produtos

biológicos para o controle de podridões de frutos e vegetais na pós-colheita. Porém, poucos antagonistas chegam à fase final do processo, ou seja, à comercialização.

Alguns produtos à base de leveduras já são comercializados, como a formulação a base de *Metschnikowia fructicola*, chamada Shemer<sup>®</sup>, registrado em Israel (DROBY et al., 2009; KURTZMAN; DROBY, 2001) e, comercialmente usado para doenças pós-colheita de batata-doce, uva, morango, pimenta e cenoura. Na Espanha estão disponíveis os bioprodutos Pantovital<sup>®</sup> (*Pantoea agglomerans*) e Candifruit<sup>™</sup> (*Candida sake*) (USALL et al., 2009). Recentemente, a empresa Bionext desenvolveu um bioproduto (Nexy), registrado na Bélgica, a base de *Candida oleophila*, para doenças de pós-colheita de maçã e pera (EFSA, 2012). Alguns produtos como o Aspire<sup>™</sup> (*C. oleophila*) e o YieldPlus<sup>®</sup> (*Cryptococcus albidus*) foram comercializados, porém, não estão mais disponíveis no mercado (MAIA, 2011). Duas cepas de *A. pullulans* foram formuladas no mesmo bioproduto, Boni-Protect<sup>®</sup> registrado na Alemanha para controle de patógenos de pós-colheita, sendo eficiente, principalmente, para *Monilia fructigena*, *P. expansum* e *B. cinerea*, em maçã (WAGNER et al., 2013).

## 2.4 Biofilme

Biofilmes são ecossistemas complexos formados por microrganismos, seja por populações desenvolvidas a partir de uma ou mais espécies, podendo se desenvolver em superfícies bióticas ou abióticas (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

Essa formação da comunidade microbiana é constituída por células que são ligadas tanto a um substrato, como conectadas umas às outras através de uma interface, incorporadas a uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que demonstram diferentes fenótipos dependendo do tipo de ambiente que foi aderido, da taxa de crescimento do microrganismo e sua transcrição de genes (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A formação de biofilme ocorre em etapas, no qual os colonizadores primários fixam-se a uma superfície, contendo proteínas ou outros compostos orgânicos. As células se desenvolvem, dando origem a microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica, que age como substrato para os colonizadores secundários. Estes microorganismos colonizadores secundários podem tanto aderir-se aos primários, como promoverem a formação de coagregados com outros microorganismos presentes naquele ambiente, e se aderirem aos colonizadores primários (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). O complexo de biofilme apresenta conjuntos de células agregadas distribuídas pela matriz exopolissacarídica, com diferentes densidades, com canais por onde circulam a troca de nutrientes, água e metabólitos entre os microorganismos (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Na fase de maturação da formação do biofilme, os microorganismos podem ser desprendidos, a fim de colonizar outros ambientes, e no decorrer do desenvolvimento desse processo a complexidade e diversidade da comunidade microbiana é otimizada. A sucessão só é finalizada quando não há mais disponibilidade de nichos para novas populações (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Podem haver alterações na composição e estrutura da matriz extracelular do biofilme de acordo com o ambiente, os constituintes da célula microbiana e o tempo de criação do biofilme, na qual a estrutura tem a capacidade de estabilizar, de maneira mecânica, o biofilme, auxiliando em sua adesão às superfícies, criando uma rede de polímeros, que interliga e imobiliza transitoriamente as células do biofilme. Quando estão inseridos no biofilme, os microorganismos são capazes de tolerar altas concentrações de agentes antimicrobianos, como também condições adversas do ambiente (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Além dos exopolissacarídeos (EPS), compostos como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e ácidos lipoteicóicos podem ser encontrados na matriz extracelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Nos microorganismos componentes de uma comunidade do biofilme, mecanismos reguladores são determinados por genes estimulados por fatores diversos, resultando em diferentes processos metabólicos das células do biofilme, aumentando o uso dos substratos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

A comunicação celular entre os microrganismos envolvidos desempenha importante função na fisiologia e desenvolvimento do biofilme. Tanto organismos unicelulares como multicelulares coordenam suas atividades de forma semelhante (SHAPIRO, 1998), necessitando de comunicação célula-célula, que ocorre através da produção e liberação de compostos celulares específicos por células individuais. Esse acúmulo extracelular sinaliza a presença da densidade populacional do biofilme, fazendo com que as células apresentem um comportamento coordenado. Esse fenômeno é denominado *quorum sensing* (QS) (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994; GRAY; GAREY, 2001; READING; SPERANDIO, 2006) e favorece o acesso a nutrientes ou a nichos ambientais favoráveis, permitindo com que os microrganismos possam se defender contra hospedeiros eucarióticos, otimizando sua capacidade de adaptação e sobrevivência em ambientes que tenham condições de crescimento restritivas (SWIFT et al., 2001). Estudos relatam que o QS regula uma série de características fenotípicas, como a produção de antibióticos, formação de biofilme, diferenciação celular, competência para captação de DNA, crescimento, produção de pigmento, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, esporulação, motilidade, produção de toxina e expressão de genes de virulência (SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004).

Embora seja menos casual do que em bactérias, essa sinalização também, ocorre em leveduras. QS tem sido relatado como fator de controle na transição de levedura/fungo filamentoso. Por exemplo, em *C. albicans*, diferentes álcoois foram relatados como simuladores de QS na formação de micélios (CHEN; FINK, 2006), ou como inibidor de pseudomicélio (HORNBY et al., 2001).

O biofilme é um ambiente propício para o desenvolvimento de relações simbióticas, pois organismos metabolicamente diferentes dependem um do outro para usufruírem de substratos para produção de energia (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

A formação de biofilme por antagonistas pode ser considerada como uma vantagem para o controle biológico, no qual o antagônico necessita aderir a superfícies específicas ou, pela capacidade de sofrer alterações fundamentais na

expressão de genes e em seu metabolismo quando as populações de células atingirem um nível específico de densidade (QS) (DROBY et al., 2009).

Bais, Fall e Vivanco (2004) relataram que a capacidade de *Bacillus subtilis* em controlar *Pseudomonas syringae* foi diretamente proporcional à sua capacidade de colonizar e formar biofilmes em superfícies de raiz da planta, como, também, relataram a secreção de surfactina pelo biofilme. Chen et al. (2013) relataram que cepas selvagens de *B. subtilis* foram capazes de formar biofilmes sobre as raízes das plantas de tomate, com alta atividade antagonista contra diversos fitopatógenos, e demonstraram ainda que essa proteção dependia de genes amplamente conservados necessários para a formação de biofilme, incluindo genes reguladores e genes para a produção da matriz extracelular. No entanto, de acordo com Droby et al. (2009) não há informações sobre o papel do biofilme na atividade de biocontrole pelas leveduras antagonistas, como, também, sobre o seu mecanismo de formação.

Em estudos realizados por Miles et al. (2012), sugere-se que, o biocontrole de *Rhizoctonia solani* por uma cepa de *A. pullulans* pode ter sido pela secreção de metabolitos e enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (LEITE et al. 2007) e pela capacidade da levedura em formar biofilmes (METZGER et al. 2006). Embora haja relatos da formação de biofilme por *A. pullulans*, não são todas as cepas que o produzem (PARAFATI et al., 2015). Então, tentar correlacionar o biocontrole com a formação de biofilme é um desafio.

## **2.5 Mecanismos bioquímicos envolvidos na indução de resistência**

Na interação planta-patógeno alguns genes são ativados e, conseqüentemente, os mecanismos bioquímicos envolvidos são sinalizados, atuando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, que podem

ser responsáveis pela defesa da planta. Também formam barreiras estruturais e produzem compostos tóxicos que podem atrasar a infecção. Além dos genes específicos de resistência, as plantas possuem genes codificadores de proteínas, envolvidas na resposta de defesa da planta contra patógenos. Dentre as proteínas relacionadas à patogênese, algumas enzimas podem participar das respostas de defesa natural da planta, ou acompanhar a resposta de hipersensibilidade. Em células vegetais ocorre uma cascata de eventos bioquímicos em poucos minutos após a indução, ativando a expressão de genes codificadores de enzimas da via dos fenilpropanóides, proteínas PR, peroxidases e lipoxigenases, sendo importante para o mecanismo de defesa no local onde há infecção (MORAES, 1998; SBALCHEIRO, 2006).

A indução de resistência tem sido considerada como uma estratégia para promover a resistência do fruto a fitopatógenos e reduzir os prejuízos na pós-colheita (LU et al., 2013). O aumento da resistência pode ser estimulado através da aplicação de agentes de biocontrole, ou pela produção de substâncias antifúngicas pela própria planta hospedeira (DROBY et al., 2002; NANTAWANIT et al., 2010), que fornece resistência sistêmica de longa duração contra vários patógenos e pragas (WALLING, 2001). Estudos de Vivekananthan (2004) sugerem que a aplicação pré-colheita de agentes de biocontrole pode ajudar a superar infecções pré e pós-colheita, aumentando os níveis de enzimas relacionadas à defesa e substâncias fenólicas. O mesmo foi relatado por Zhao et al. (2011) com aplicações de *Pichia guilliermondii* induzindo resistência a doenças de tomate cereja, ativando as enzimas indicativas de defesa da planta.

Tanto os compostos fenólicos como as enzimas indicativas de indução de resistência apresentam importância significativa no ciclo das plantas, uma vez que são parte integrante de uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos. Dentre as enzimas destacam-se a peroxidase (POD), a polifenoloxidase (PPO) e a fenilalanina amônia liase (PAL).

### **2.5.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são produtos secundários que contêm um grupo fenol e são biossintetizados a partir de derivados da fenilalanina (TAIZ; ZEIGER, 2004). Como resultado de sua diversidade bioquímica, os fenóis apresentam diferentes funções e efeitos nos vegetais, como por exemplo, inibidor ou promotor do crescimento vegetal como, também, podem participar de processos de fotossíntese e respiração (KEFELI; KADYROV, 1971).

Segundo Taiz e Zeiger (2004), os compostos fenólicos, dentre outras funções, atuam na biossíntese de ligninas, na germinação e crescimento de plantas, na alelopatia e promovem mecanismos de defesa. Dentre os compostos fenólicos existentes nas plantas, os flavonóides são os que representam a maior classe de metabólitos secundários produzidos por várias espécies vegetais.

### **2.5.2 Peroxidase (POD)**

A enzima peroxidase é de extrema importância na via dos fenilpropanóides, pois está envolvida na biossíntese da lignina, reforçando a parede celular da planta após aplicações do agente de controle biológico, ataque de patógenos ou, quando houver ferimento no tecido vegetal (MARJAMAA et al., 2006). A POD participa da oxidação de compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (FRY, 1986) e da biossíntese da lignina, que associada à celulose e outros polissacarídeos constituintes da parede celular das plantas, serve como uma barreira física contra a penetração de fitopatógenos (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980).

### **2.5.3 Polifenoloxidase (PPO)**

Polifenoloxidase (PPO) é uma enzima intracelular que ocorre em plantas, animais e fungos (WHITAKER, 1994), sendo constituída por cobre no centro ativo, catalisando reações que envolvem oxigênio. Na primeira reação há hidroxilação de

monofenóis formando orto-difenóis e na segunda, oxidação de ortodifenóis formando orto-quinonas. Essas enzimas atuam sobre alguns substratos como tirosina e ácido p-cumárico (substratos monofenólicos), catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico (substratos difenólicos) (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981) e, a expressão de genes que as codificam está relacionado com a ativação da via sinalizadora dos octadecanóides (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995). As PPO localizam-se na região intracelular, dentro dos tilacóides nos cloroplastos, podendo estar inativas (VAUGHN; LAX; DUKE, 1988), onde são liberadas e iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos, que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas quando há ruptura da célula, devido a ferimentos, infecção por patógenos ou senescência (THIPYAPONG et al., 2004). As PPO participam da lignificação durante a invasão dos patógenos (JUNG et al., 2004).

De acordo com relatos de Chérif, Asselin e Bélanger (1994) sobre a indução de resistência, a conversão de fenóis em compostos tóxicos, proporcionados pela ação da PPO, foi responsável pelo aumento da resistência induzida por silicatos solúveis contra *Pythium aphanidermatum*, causador do *damping off* em plantas de pepino.

#### **2.5.4 Fenilalanina amônia-liase (PAL)**

Fenilpropanóides são compostos orgânicos sintetizados em tecidos vegetais a partir do aminoácido fenilalanina, atuando como precursores de uma série de polímeros naturais, os quais fornecem proteção contra a luz ultravioleta, defesa contra herbívoros e patógenos (VOGT, 2010). No metabolismo dos fenilpropanóides, rotas metabólicas proporcionam a síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (BOATRIGT, 2004) que gera compostos essenciais para o desenvolvimento da planta e suas interações ambientais e como a enzima fenilalanina amônia liase (PAL), que auxilia na resistência de plantas a patógenos. A PAL está envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, na conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, conferindo maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

A atividade dessa enzima é ativada por fatores como hormônios, nutrientes, luz, infecção por patógenos e ocorrência de ferimentos. Por exemplo, quando um fitopatógeno invade o tecido vegetal, induz a transcrição do mRNA que codifica para essa enzima, aumentando sua síntese, estimulando a produção de compostos fenólicos (JONES, 1984).

O metabolismo da via fenilpropanóide é influenciado por aplicações de agentes de controle biológico (BALLESTER et al., 2011, 2013). A enzima fenilalanina amônia liase é responsável pela biossíntese de derivados de ácido *p*-cumárico, fitoalexinas e legninas. O aumento da atividade da PAL pode ser utilizado como um marcador da reação das plantas ao estresse biótico e abiótico (POCIECHA et al., 2008). Em estudos de Lu et al. (2013), tratamento pré-colheita com *Rhodosporidium paludigenum* aumentou a atividade da PAL, POD e PPO, quando a levedura foi aplicada em tangerinas. Em estudos de Nantawanit et al. (2010) foi relatado aumento da atividade da PAL com aplicações de *Pichia guilliermondii*, com aumento de resposta de defesa em pimentões contra *Colletotrichum capsici*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### Microrganismos

O fungo fitopatogênico *Geotrichum citri-aurantii* e o isolado da levedura *A. pullulans*-ACBL-77 pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP.

#### 3.1 Atividade antifúngica *in vivo* de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 contra *Geotrichum citri-aurantii*

Frutos de laranja Lima (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram lavados com detergente neutro, desinfestados superficialmente com Dioxiplus® (2 mL/L) e feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas demarcadas e esterilizadas, a uma profundidade de 3 mm. Logo após, os frutos foram inoculados na região do ferimento com 20 µl da suspensão do fitopatógeno ( $1 \times 10^5$  conídios/mL), 24 horas antes (tratamento preventivo) e 24 horas após (tratamento curativo) a realização dos tratamentos com o ACBL-77.

Para a produção de inóculo do ACBL-77, uma alçada do isolado retirado de colônias cultivadas por 48 horas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) foi transferida para frascos de Erlenmeyer contendo 25 mL de meio BD líquido (batata-dextrose) e incubada sob agitação de 250 rpm por 48 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de células com auxílio de uma Câmara de Neubauer, ajustando a concentração da suspensão para  $1 \times 10^7$  células/mL.

Alíquotas de 20 µL da suspensão do antagonista ou, do produto químico (Thiabendazole<sup>®</sup>, 2 mL/L) foram depositadas nos ferimentos. O controle correspondeu aos frutos tratados apenas com água destilada esterilizada no lugar dos tratamentos.

Após a inoculação com *G. citri-aurantii* e a realização dos tratamentos, os frutos inoculados foram armazenados a  $25 \pm 3$  °C e  $90 \pm 3$  % de umidade relativa (UR). A incidência da doença foi avaliada pela porcentagem de frutos sintomáticos, observados no 10<sup>o</sup> dia de armazenamento.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições, com 30 frutos por repetição.

### **3.2 Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células *Aureobasidium pullulans***

Uma alçada do isolado da levedura foi retirada de colônias cultivadas por 48 horas em meio BDA e transferida para tubos Falcon<sup>®</sup> contendo 5 mL de quatro diferentes meios de cultivo: BD (infusão de 200 g de batata; 20% dextrose, dissolvidos em água destilada), YEPD (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose, 2% agar, 0,01% ampicilina e 0,01% ácido nalidíxico, dissolvidos em água destilada), YM (0,3 % de extrato de malte, 0,3 % de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1 % de glicose, 2 % de ágar, dissolvidos em água destilada) e meio de melaço (20% de melaço de cana-de-açúcar; 1,2% de extrato de levedura, dissolvidos em água destilada (KINAY; YILDIZ, 2008)). As culturas foram incubadas a 25 °C, sob agitação a 150 rpm por 48 horas. Posteriormente, centrifugou-se por duas vezes a 4000 g x 10 min e o pellet lavado e ressuspenso em 1 mL de solução salina (0,9 g/L de NaCl). A biomassa de cada tubo foi utilizada como inóculo inicial ( $1 \times 10^6$  células/mL) para adição em 120 mL de cada um dos quatro meios de cultivo, contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL. As culturas foram incubadas em incubadora tipo shaker, a 25 °C, 150 rpm. Foi retirado 1 mL de cada cultura em diferentes tempos: 0, 7, 25, 32, 48, 120, 192 e 240 horas, utilizando a técnica de diluição decimal com plaqueamento da cultura em cada

um dos respectivos meios de cultivo, adicionando-se 20 g/L de ágar na receita descrita anteriormente (metodologia adaptada de GUETSKY et al., 2001).

A avaliação foi pela contagem das unidades formadoras de colônias, após 48 horas do plaqueamento. A densidade populacional da levedura foi expressa em  $\log_{10}$  UFC/mL. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 4 repetições.

### **3.3. Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de *Aureobasidium pullulans***

Este ensaio teve por objetivo verificar o efeito da adição de fontes de nitrogênio e de micronutrientes em meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar) para cultivo do isolado ACBL-77, quanto à inibição do crescimento micelial de *G. citri-aurantii*. Foram utilizadas 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 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), triptona e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) nas concentrações de 2; 5 e 10% (w/v). As fontes de micronutrientes testadas foram: boro (ácido bórico -  $\text{H}_3\text{BO}_4$ ), 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 -  $\text{FeCl}_3$ ), zinco (sulfato de zinco -  $\text{ZnSO}_4$ ) 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 2; 5 e 10 mM, respectivamente (metodologia adaptada de WIYONO et al., 2008).

Frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido BD (batata-dextrose) estéril + fontes de nitrogênio e de micronutrientes, acrescido de uma alíquota de 1 mL de uma suspensão de levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL) foram submetidos à agitação constante, a 25 °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.

Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, ajustou-se o pH para 5,5 e, em seguida, os meios foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, um disco de meio de cultivo (0,7 cm de diâmetro), contendo o fitopatógeno com 8 dias de crescimento, foi transferido para o centro das placas. As testemunhas foram constituídas de placas de BDA contendo apenas o patógeno. As culturas foram incubadas em estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 25 °C durante 9 dias e a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia do patógeno.

As fontes de nitrogênio e de micronutrientes que se mostraram mais eficientes no controle do crescimento micelial de *G. citri-aurantii* foram utilizados em mistura, de modo a otimizar a atividade antagônica do isolado de levedura. As fontes também foram avaliadas sozinhas no crescimento micelial do patógeno e, para tal, utilizou-se a mesma metodologia descrita anteriormente, porém, sem a presença da levedura.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 8 repetições.

### **3.4 Competição por nutrientes entre *Aureobasidium pullulans* e *Geotrichum citri-aurantii***

Para o estudo da competição por nutrientes entre a levedura e o fitopatógeno foram utilizadas diferentes fontes de nitrogênio (leucina, fenilalanina, prolina e sulfato de amônio, a 0,5 e 1,0%), de carbono (sacarose, maltose, galactose e frutose, a 0,5 e 1,0%) (ZHANG et al., 2011) e micronutrientes (ácido bórico, cloreto de cobalto e molibdato de amônio, a 1mM), avaliando-se a germinação do conídio do patógeno segundo metodologia de Kupper et al. (2013).

Para tal, uma alíquota de 10 µL da suspensão da levedura contendo  $1 \times 10^7$  células/mL, juntamente com 10 µL da suspensão de esporos do patógeno, contendo  $1 \times 10^5$  conídios/mL foram depositados em áreas demarcadas de lâminas,

previamente preparadas, com meio ágar-água, com a adição das diferentes fontes de nutrientes. As testemunhas foram constituídas do patógeno + diferentes fontes de nutrientes; patógeno com ou sem levedura (sem nutriente). As culturas foram incubadas em estufa incubadora para BOD, em fotoperíodo 12/12h, a 25 °C, por aproximadamente 16 horas. A germinação foi paralisada através da aplicação de azul láctico. A avaliação foi realizada através da contagem de esporos germinados e não germinados, em um total de 100 conídios ao acaso, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à largura do conídio. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 10 repetições.

### **3.5 Efeito da adição de fontes nutricionais em meio de cultivo na produção de células por *Aureobasidium pullulans***

Com base nos resultados dos testes anteriores, foram escolhidas as melhores fontes de nutrientes: sulfato de amônio 1%, sacarose 0,5%, ácido bórico 1mM, cloreto de cobalto 1mM e molibdato de amônio 1mM.

Uma alíquota de 1 mL da suspensão da levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL) foi transferida para frascos contendo 99 mL de meio YMM (contendo 1 mL da solução estoque de 1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,2%  $\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2,2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2%  $\text{FeCl}_3$  em 0,1 M HCl + 10 mL de 11%  $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$  + 100 mL de 10% glicose, com o volume ajustado para 1 L), a fim de se verificar o efeito direto dos nutrientes. Como testemunha, a levedura foi cultivada apenas em meio YMM (sem adição do nutriente).

As culturas foram incubadas em incubadora tipo shaker, 150 rpm a 25 °C. Foi retirado 1 mL de cada cultura, em diferentes tempos: 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas, utilizando a técnica de diluição decimal com plaqueamento da cultura em meio BDA. A avaliação foi pela contagem das unidades formadoras de colônias, após 48 horas do plaqueamento. A densidade populacional da levedura foi

expressa em  $\log_{10}$  UFC/mL. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 5 repetições.

### **3.6 Efeito de fontes nutricionais na produção de biofilme de *Aureobasidium pullulans***

Foi utilizada a metodologia de cristal violeta (CV) (O'TOOLE; KOLTER, 1998) para quantificar a formação de biofilme pela levedura. Uma suspensão (20 mL) de *A. pullulans* foi transferida para frasco contendo 180 mL de BD e cultura foi incubada a 25 °C e sob agitação constante a 150 rpm, durante 72 horas. A concentração da levedura foi ajustada para  $1 \times 10^7$  células/mL e utilizada como inóculo inicial.

Em tubos contendo 10 mL de meio YMM acrescidos dos diferentes nutrientes (sulfato de amônio 1%, sacarose 0,5%, ácido bórico 1 mM, molibdato de amônio 1 mM e cloreto de cobalto 1 mM) foram adicionadas alíquotas de 100  $\mu$ L do inóculo inicial. Como controle (branco) foi utilizado YMM sem crescimento de levedura. As culturas foram incubadas a 25 °C e sob agitação constante a 150 rpm até a fase estacionária de crescimento, de acordo com os dados do experimento anterior. Para a quantificação do biofilme, o meio foi suavemente removido, os tubos lavados com 0,9% de NaCl e coradas com uma solução de 0,1% de CV. Após 30 minutos de incubação, 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). Outro teste foi realizado, sob as mesmas condições, adicionando 100  $\mu$ L de *G. citri-aurantii* cultivado em BD (por 5 dias a 150 rpm) ( $1 \times 10^5$  conídios/mL), sozinho ou, em mistura com uma alíquota da levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL), em tubos contendo meio YMM acrescido ou não dos diferentes nutrientes, a fim de verificar a influência da presença do fungo na formação de biofilme pela levedura. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 6 repetições.

### 3.7 Atividade antifúngica *in vivo* de *Aureobasidium pullulans*

Frutos de laranja Pera *Citrus sinensis* (L.) Osbeck provenientes de culturas não tratadas foram lavados com detergente neutro, desinfestados superficialmente com Dioxiplus® (2 mL/L) e feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas demarcadas e esterilizadas, a uma profundidade de 3 mm. Logo após, os frutos foram inoculados na região do ferimento com 20 µl da suspensão do fitopatógeno ( $1 \times 10^5$  conídios/mL), 24 horas antes (tratamento preventivo) e 24 horas após (tratamento curativo) a realização dos tratamentos com a levedura.

Uma suspensão ( $1 \times 10^7$  células/mL) do ACBL-77, obtida de colônias do microrganismo após o cultivo em meio BDA por 48 horas, foi transferida para frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL do meio YMM com diferentes nutrientes. Os tratamentos corresponderam: (i) meio YMM; (ii) YMM + sulfato de amônio 1%; (iii) YMM + sacarose 0,5%; (iv) YMM + ácido bórico 1mM; (v) YMM + cloreto de cobalto 1mM e (vi) YMM + molibdato de amônio 1mM. Em seguida, as culturas foram submetidas à agitação constante, até a fase estacionária, conforme resultados obtidos no item 3.5. A concentração final da levedura em todos os tratamentos foi de  $1 \times 10^7$  células/mL, ajustada com auxílio de uma câmara de Neubauer. Para o tratamento químico foi utilizado o fungicida Thiabendazole®, na concentração recomendada pelo fabricante (2 mL/L). O controle correspondeu aos frutos tratados apenas com água destilada esterilizada no lugar dos tratamentos.

Alíquotas de 20 µL de cada um dos tratamentos foram injetadas nos ferimentos, de maneira preventiva e curativa. Após a inoculação com *G. citri-aurantii* e a realização dos tratamentos, os frutos inoculados foram armazenados a  $25 \pm 3$  °C e  $90 \pm 3\%$  UR. A incidência da doença foi avaliada pela porcentagem de frutos doentes observados no 10º dia de armazenamento.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições, com 30 frutos por repetição.

### **3.8 Sobrevivência de *Aureobasidium pullulans* no sítio de infecção**

Frutos de laranja Pera foram desinfestados superficialmente com etanol a 70%, lavados em água destilada, feridos em um ponto na região equatorial, a uma profundidade de 3 mm e tratados com 30 µL da suspensão da levedura ( $1 \times 10^6$  UFC/mL), a qual foi previamente cultivada em meio YMM com ou sem adição de sulfato de amônio a 1%. Posteriormente, os frutos foram armazenados em caixas de prolipoleno com tampa (A x L x C = 14 x 30 x 36,5 cm), armazenados a 25 e 10 °C  $\pm$  3 °C e 90  $\pm$  3% UR.

A população da levedura foi monitorada a cada 2 dias, até 16 dias de armazenamento a 25 °C, e a cada 5 dias, até 30 dias de armazenamento a 10 °C. Para tal, no local do ferimento, um pedaço de tecido da casca (0,5 cm de diâmetro) foi retirado de cada fruto, com auxílio de um bisturi e transferido para tubos Falcon® de 50 mL, contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio estéril 0,05 M, pH 7,0. Posteriormente, cada amostra foi macerada e diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) foram realizadas. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram plaqueadas em meio BDA (com adição de 0,1 g de ampicilina e 0,1 g de ácido nalidíxico/L) contido em placas de Petri, utilizando-se 05 placas para cada diluição. As culturas foram incubadas a 25 °C por 72 horas e a avaliação foi realizada através da contagem de unidades formadoras de colônias. A densidade populacional do isolado de levedura foi expressa em  $\log_{10}$  UFC/ferimento (metodologia adaptada de LUO et al., 2012).

### **3.9 Estudo de microscopia eletrônica da interação entre *Geotrichum citri-aurantii* e *Aureobasidium pullulans* no sítio de infecção**

Frutos de laranja Pera foram lavados com detergente neutro, desinfestados superficialmente com Dioxiplus® (2 mL/L), feridos com agulhas esterilizadas a uma profundidade de 3 mm. Os ferimentos foram tratados com 30 µL de uma suspensão

de *A. pullulans* ACBL-77 ( $1 \times 10^7$  células/mL), após o cultivo em meio YMM, com ou sem adição de 1% de sulfato de amônio, a 25 °C e 150 rpm por 96 horas. A inoculação do fitopatógeno foi realizada 24 horas após o tratamento com a levedura, utilizando-se 30 µL de suspensão do fungo ( $1 \times 10^5$  conídios/mL). Como controle os ferimentos foram inoculados com o patógeno sem a presença da levedura. Os frutos foram armazenados em caixas de prolipopileno, com tampa, a 25 °C e a  $90 \pm 3$  % UR.

As amostras foram retiradas 48 e 72 horas após a inoculação. Para tal, pedaços de tecidos da casca (4 x 4 mm), a partir dos locais dos ferimentos, foram imersos em glutaraldeído (2,5%) em 0,1 M de tampão fosfato a pH 7,3 por 24 horas. As amostras foram lavadas 05 vezes durante 1 hora com água destilada, imersas em tetróxido de ósmio 0,5% e desidratadas numa série de concentrações de etanol antes do ponto crítico de secagem. Os tecidos secos foram montados em topos de alumínio, revestido com ouro - paládio e elétrôn-micrografadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 - FEI Company, operando em 06 KV (MEKBIB et al., 2011).

### **3.10 Efeito de aplicações de *Aureobasidium pullulans* nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos**

Este ensaio visou determinar o efeito da aplicação da levedura na qualidade de frutos cítricos. Para tal, frutos de laranja Pera provenientes de culturas não tratadas foram lavados com detergente neutro e desinfestados superficialmente com Dioxiplus® (2 mL/L). Posteriormente, os frutos foram imersos em suspensão de levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL) por 2 minutos, de acordo com os respectivos tratamentos (levedura previamente cultivada em meio com ou sem adição de sulfato de amônio (1%), tratamento químico (Thiabendazole®, 2mL/L) e o tratamento controle (frutos imersos em água). Após os tratamentos, os frutos foram subdivididos em grupos de 03 repetições, embalados em caixas de prolipopileno com tampa, armazenados a  $10 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$  e  $90 \pm 3$  % UR, por um período de 04 semanas. As avaliações foram realizadas, uma logo após aplicação e, as demais semanalmente até o final do

experimento. Para a avaliação das análises de qualidade foram retiradas amostras de cinco frutos em triplicatas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas as análises físico-químicas, como rendimento de suco, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), “ratio” e °Brix, para determinação da qualidade dos frutos após os tratamentos.

### 3.10.1 Rendimento de suco

Cada repetição foi pesada para a obtenção do valor da massa total em quilograma e, em seguida, os frutos foram processados na extratora, para a coleta da massa de suco. A porcentagem de suco foi determinada através do cálculo da fórmula: % rendimento de suco =  $(MS / MF) \times 100$ , onde MS = massa do suco e MF = massa dos frutos.

**Tabela 1.** Valores de referência da porcentagem de suco dos cultivares (PIO et al., 2005).

<b>Cultivares</b>	<b>Média da % de suco</b>
Laranjas	40-60%
Tangerinas e tangor	35-55%
Limões e limas ácidas	35-55%
Pomelo	35-45%

### 3.10.2 Teor de sólidos solúveis totais (SS)

O teor de sólido solúveis foi determinado em refratômetro digital, com os resultados expressos em °Brix. Os valores de leitura de °Brix correspondem diretamente à porcentagem de sólidos solúveis do suco cítrico, com base em massa (REED; HENDRIX; HENDRIX, 1986).

**Tabela 2.** Valores de referência de sólido solúveis totais (°Brix) suco dos cultivares (PIO et al., 2005).

<b>Cultivares</b>	<b>Média de ° Brix</b>
Laranjas com baixa acidez, laranjas, tangerinas e tangor	8-16 °Brix
Limões e limas ácidas	6-12 °Brix
Pomelo	8-10 °Brix

### 3.10.3 Acidez total titulável (ATT)

Em um Becker graduado (250 mL) foram adicionados 100-150 mL de água destilada e pipetados 25 mL da amostra de suco. Foram adicionados ao Becker, cerca de 5 gotas do indicador fenolftaleína em solução alcoólica 1%. A solução foi misturada através de um agitador. Posteriormente, o eletrodo do pHmetro foi mergulhado na solução padronizada contida no Becker e uma solução de NaOH 0,3125 M foi gotejada, sob agitação constante, com monitoramento do pH até 8,2, utilizando titulador automático. Os resultados foram expressos em % (g de ácido cítrico/100mL da amostra) (REED; HENDRIX; HENDRIX, 1986).

**Tabela 3.** Valores de referência da porcentagem de acidez titulável dos cultivares (PIO et al., 2005).

<b>Cultivares</b>	<b>Média da % de acidez titulável</b>
Laranjas com baixa acidez	0,1-0,5%
Laranjas, Tangerinas e tangor	0,5-2,0%
Limões e limas ácidas	4,0-7,0%
Pomelo	0,5-1,5%

### 3.10.4 “Ratio”

Os valores de “ratio” foram calculados pela divisão do teor de sólidos solúveis totais (SST) pela acidez total titulável (ATT). Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (Teste F) e, em caso de significância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.11 Análises bioquímicas

Frutos de laranja Pera provenientes de culturas não tratadas foram lavados com detergente neutro, desinfestados superficialmente com Dioxiplus® (2 mL/L) por 2 minutos, sendo após, lavados com água corrente e secos à temperatura ambiente até o dia seguinte.

Os frutos foram divididos em dois grupos, conforme o método de aplicação da levedura: (i) frutos feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas demarcadas e esterilizadas, a uma profundidade de 3 mm, tratadas com uma suspensão de 30 µL de *A. pullulans* ACBL-77 ( $1 \times 10^7$  células/mL) ou com água destilada e esterilizada; (ii) frutos imersos em suspensão da levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL), seguindo metodologia adaptada de Ippolito et al. (2000) ou em água destilada e esterilizada. Após os tratamentos, os frutos foram armazenados em caixas de polipropileno, a 25 °C. Durante o armazenamento, amostras da casca foram retiradas em 0, 24, 48 e 72 horas após o tratamento, com auxílio de um bisturi, cortando aproximadamente 0,5 cm. O material foi macerado em nitrogênio líquido e armazenado em microtubo Eppendorf®, em congelador a -20 °C até a avaliação das atividades enzimáticas. Cada tratamento foi composto por três repetições, sendo um fruto por repetição, nos diferentes tempos de amostragem. As pesagens foram realizadas em triplicata.

### 3.11.1 Compostos fenólicos

A análise de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico com o uso do reativo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI JR, 1965). Para tal, foram pesados 100 mg de material seco obtido no procedimento de maceração, colocados em tubos plásticos e adicionados 5 mL de metanol 80% (v/v). Logo após, os tubos foram colocados em banho ultrassônico por 20 minutos, imediatamente foram centrifugados a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi reservado e o procedimento foi repetido. O 1º e o 2º sobrenadantes foram armazenados juntos, em frasco de vidro, com tampa, embalado em papel alumínio. A reação foi constituída de 0,1 mL de sobrenadante + 0,9 mL de água destilada + 0,5 mL de Folin Ciocalteu + 2,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20%. O branco foi constituído de 0,1 mL de metanol + 0,9 mL de água destilada + 0,5 mL de Folin + 2,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20%. Os tubos foram agitados e após 1 hora de descanso, no escuro, fez-se a leitura em 725 nm. As leituras de absorbâncias foram plotadas em curva padrão para ácido gálico (50 mg de ácido gálico, completando um balão volumétrico para 50 mL com metanol 80%, retirou-se uma alíquota de 2,5 mL, completando com metanol 80%). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 g<sup>-1</sup> de massa fresca, com base em curva padrão de ácido gálico.

### 3.11.2 Peroxidase (POD)

Para a análise da atividade da peroxidase, 300 mg da amostra foi macerada, foi adicionada em 5 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,7 a 0,2 M. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 5 minutos a 4 °C, obtendo-se o sobrenadante. Em tubos de ensaio colocou-se 1 mL do sobrenadante; 0,5 mL de uma solução A (2,2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% em 10 mL de água destilada, e desta solução, retirou-se 0,5 mL e completou-se com 50 mL de tampão fosfato de potássio, pH 6,7 a 0,2 M), 0,5 mL de uma solução B (81,5 mg de fenol em 40 mL de água destilada; dissolvendo-se 40,65 mg de aminoantipirina em 10 mL de água destilada e adicionando-se 40 mL da

solução de fenol já pronta), totalizando assim, 2 mL. Para o branco da amostra, utilizou-se 1 mL de água destilada e 1 mL da amostra. Para o branco da solução, pipetou-se 0,5 mL da solução A; 0,5 mL da solução B e 1 mL de solução tampão fosfato de potássio, pH 6,7. Os tubos foram incubados em banho-maria a 30 °C, por 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram transferidos para um banho de gelo, onde foi adicionado 2 mL de álcool etílico absoluto. Após agitação em vortex, o tubo foi deixado em repouso por 10 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade específica da peroxidase foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumida  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteínas solúveis (ALLAIN et al., 1974 com modificações em LIMA et al., 1999).

### **3.11.3 Polifenoloxidase (PPO)**

Para a análise da atividade da polifenoloxidase (PPO), foi pesado 150 mg do material macerado e adicionado 2 mL de solução tampão de fosfato de potássio, pH 6,7 a 0,2 M. Centrifugou-se a 15.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e guardado num frasco de vidro, em banho de gelo.

Em um tubo de ensaio, pipetou-se 0,3 mL da amostra e 1,85 mL de catecol, sendo essa, considerada a reação da amostra. Para o branco da amostra, pipetou-se em outro tubo 0,3 mL da amostra e 1,85 mL de água destilada. Para o branco da solução, pipetou-se em outro tubo 0,3 mL da solução tampão e 1,85 mL de catecol. Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C, por 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram transferidos para banho de gelo, onde foi adicionado 0,8 mL de ácido perclórico. Após agitação em vortex, o tubo foi deixado em repouso por 10 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 395 nm. A atividade específica da polifenoloxidase foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de catecol consumido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteínas solúveis (CANO et al., 1997).

#### **3.11.4 Fenilalanina amônia liase (PAL)**

Em um tubo de ensaio, foi pesado 100 mg das amostras da casca dos frutos macerados, adicionando-se 10 mL de tampão borato 0,1 M em banho de gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 4 °C e 15.000 g. Em outro tubo de ensaio, foi colocado 1 mL da amostra; 1 mL de tampão borato 0,2 M. Para o branco geral, foi utilizado 1 mL de tampão borato 0,1 M; 1 mL de tampão borato 0,2 M. O branco das amostras foi composto de 1 mL do extrato de cada amostra; 2 mL de tampão borato 0,2 M. Os tubos foram colocados em banho-maria a 36 °C, adicionando após 5 minutos, 1 mL de fenilalanina em cada tubo, exceto nos tubos com o branco das amostras. Incubou-se em banho-maria por 1 hora a 36 °C.. Os tubos foram retirados, acrescentando 0,1 mL de HCl 6N para paralizar a reação, agitando-se bem. As análises foram realizadas em triplicata. Após a incubação, os tubos foram transferidos imediatamente para banho de gelo, de modo a encerrar a reação. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 290 nm, subtraindo de cada amostra a absorbância do controle. A atividade específica do PAL foi definida como nmol de ácido trans-cinâmico por  $\text{min}^{-1}$  por mg de proteína total (metodologia de LISKER et al., 1983, com algumas modificações).

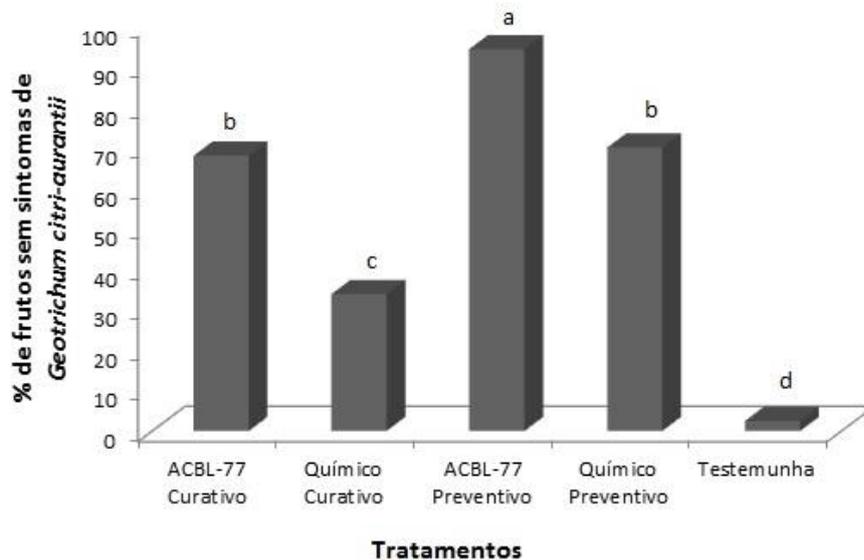
#### **3.12 Análise estatística**

Os dados foram analisados separadamente usando o pacote de software ASSISTAT 7.6. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes e as médias aritméticas foram calculadas e analisadas por meio de análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ou Scott knot a 5 % de significância.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Atividade antifúngica *in vivo* de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 contra *Geotrichum citri-aurantii*

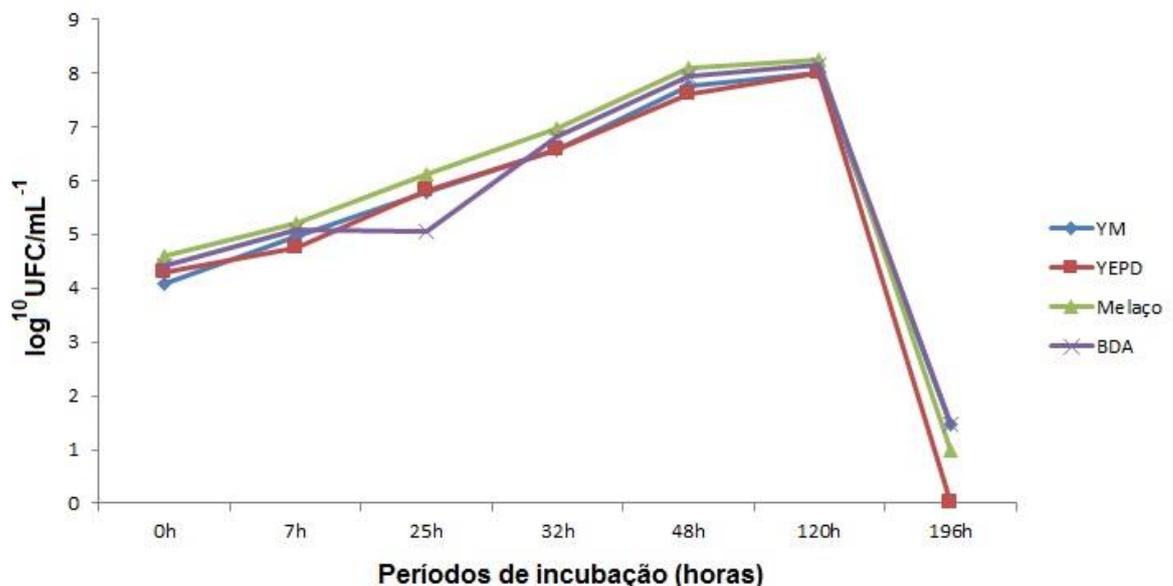
Quando se avaliou a porcentagem de frutos cítricos sem sintomas de podridão azeda, verificou-se que o tratamento preventivo (frutos tratados com *A. pullulans* ACBL-77 24 horas antes da inoculação do fitopatógeno) foi mais eficaz do que quando comparado com o tratamento curativo (aplicação da levedura 24 horas após a inoculação), apresentando 94 e 68% de controle da podridão azeda, respectivamente, quando comparado com o tratamento testemunha que apresentou 100% de frutos sintomáticos. O tratamento químico com Thiabendazole® controlou 70 e 34% na forma preventiva e curativa, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Eficiência de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 no controle da podridão azeda em frutos cítricos. Tratamento preventivo e curativo, realizado 24 h antes e 24 h após a inoculação com o fitopatógeno, respectivamente. Cada valor correspondeu a média de dois experimentos independentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

## 4.2 Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células de *Aureobasidium pullulans*

Os dados referentes ao efeito do meio de cultivo e do período de incubação na produção de células de *A. pullulans* ACBL-77, encontram-se na Figura 2. Todos os meios de cultivo testados mantiveram quase o mesmo comportamento de crescimento da levedura. A fase exponencial começa por volta das 32 horas de incubação, o pico de produção de células em 120 horas, e a fase estacionária entre 48-120 horas. Na última avaliação (196 horas), quase não havia células viáveis da levedura. Os meios de cultivo melaço e BDA foram os que apresentaram maiores valores de unidades formadoras de colônia, apresentando, em seu pico de produção, 1,74 e 1,43 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, respectivamente.



**Figura 2.** Efeito do meio de cultivo e do período de incubação na produção de células de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77.

### 4.3. Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de *Aureobasidium pullulans*

Nos dados referentes à adição de fontes de nitrogênio e micronutrientes em meio de cultivo para aumentar a atividade antagônica de *A. pullulans* sobre o crescimento micelial de *G. citri-aurantii*, nota-se que os micronutrientes foram mais eficientes em auxiliar a ação antagônica da levedura. A adição de fontes de nutrientes no cultivo da levedura, como cobalto, molibdato e boro, na forma de cloreto de cobalto, molibdato de amônio e ácido bórico, respectivamente, todos na concentração de 1 mM, apresentaram os melhores resultados, com porcentagens de inibições da colônia de *G. citri-aurantii* de 77, 80 e 100%, respectivamente, quando comparados com a testemunha, constituída pelo tratamento sem o antagonista (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito de fontes de nitrogênio e de micronutrientes na atividade antagônica de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, sobre o crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

Tratamentos	Diâmetro médio <i>G. citri-aurantii</i> (cm)	% inibição em relação à testemunha
ACBL-77 + Uréia 0,02%	6,75 b <sup>(1)</sup>	18,6
ACBL-77 + Uréia 0,1%	6,87 b	17,2
ACBL-77 + Uréia 0,5%	7,95 a	4,2
ACBL-77 + Sulfato de amônio 0,02%	5,92 c	28,6
ACBL-77 + Sulfato de amônio 0,1%	4,45 e	46,3
ACBL-77 + Sulfato de amônio 0,5%	3,92 f	52,7
ACBL-77 + Nitrato de amônio 0,02%	7,00 b	15,7
ACBL-77 + Nitrato de amônio 0,1%	5,45 d	34,3
ACBL-77 + Nitrato de amônio 0,5%	6,42 b	22,6
ACBL-77 + Triptona 0,02%	6,77 b	18,4
ACBL-77 + Triptona 0,1%	7,07 b	14,8
ACBL-77 + Triptona 0,5%	5,45 d	34,3

ACBL-77 + Nitrato de potássio 0,02%	7,00 b	15,7
ACBL-77 + Nitrato de potássio 0,1%	6,57 b	20,8
ACBL-77 + Nitrato de potássio 0,5%	7,12 a	14,2
ACBL-77 + Ácido bórico 0,05mM	5,22 d	37,1
ACBL-77 + Ácido bórico 0,2mM	3,17 g	61,8
ACBL-77 + Ácido bórico 1mM	0 i	100
ACBL-77 + Sulfato de cobre 0,05mM	6,00 c	27,7
ACBL-77 + Sulfato de cobre 0,2mM	6,82 b	17,8
ACBL-77 + Sulfato de cobre 1mM	4,65 e	43,9
ACBL-77 + Sulfato de zinco 0,05mM	6,17 c	25,6
ACBL-77 + Sulfato de zinco 0,2mM	6,67 b	19,6
ACBL-77 + Sulfato de zinco 1mM	5,32 d	35,9
ACBL-77 + Sulfato de manganês 0,05mM	6,20 c	25,3
ACBL-77 + Sulfato de manganês 0,2mM	6,20 c	25,3
ACBL-77 + Sulfato de manganês 1mM	6,00 c	27,7
ACBL-77 + Cloreto de cobalto 0,05mM	5,57 d	32,8
ACBL-77 + Cloreto de cobalto 0,2mM	6,52 b	21,4
ACBL-77 + Cloreto de cobalto 1mM	1,87 h	77,4
ACBL-77 + Cloreto de ferro 0,05mM	6,97 b	16,0
ACBL-77 + Cloreto de ferro 0,2mM	6,10 c	26,5
ACBL-77 + Cloreto de ferro 1mM	5,10 d	38,5
ACBL-77 + Molibdato de amônio 0,05mM	6,25 c	24,6
ACBL-77 + Molibdato de amônio 0,2mM	5,55 d	33,1
ACBL-77 + Molibdato de amônio 1mM	1,67 h	79,8
ACBL-77	5,82 c	29,8
Testemunha (apenas <i>G. citri-aurantii</i> )	8,30 a	-

(<sup>1</sup>) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott knot ( $p \geq 0,05$ ).

Nenhuma das fontes de nutrientes testadas afetou o crescimento micelial de *G. citri-aurantii* quando testados diretamente sobre o patógeno (sem a levedura),

demonstrando que tais nutrientes não têm efeito antifúngico sobre o patógeno (Tabela 5). Nenhum tratamento onde se utilizou a mistura dos melhores nutrientes favoreceu o antagonismo de ACBL-77, sendo que os nutrientes sozinhos apresentaram melhores resultados de inibição da colônia de *G. citri-aurantii* (Tabela 6).

**Tabela 5.** Efeito direto de fontes de nitrogênio e de micronutrientes sobre o crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Diâmetro médio <i>G. citri-aurantii</i> (cm)</b>
Uréia 0,02%	8,12 a <sup>(1)</sup>
Uréia 0,1%	7,60 a
Uréia 0,5%	7,72 a
Sulfato de amônio 0,02%	7,87 a
Sulfato de amônio 0,1%	7,45 a
Sulfato de amônio 0,5%	7,37 a
Nitrato de amônio 0,02%	7,05 a
Nitrato de amônio 0,1%	8,00 a
Nitrato de amônio 0,5%	7,47 a
Ácido bórico 0,05mM	7,05 a
Ácido bórico 0,2mM	7,02 a
Ácido bórico 1mM	7,17 a
Sulfato de cobre 0,05mM	7,32 a
Sulfato de cobre 0,2mM	7,80 a
Sulfato de cobre 1mM	8,27 a
Sulfato de manganês 0,05mM	7,45 a
Sulfato de manganês 0,2mM	6,85 a
Sulfato de manganês 1mM	7,60 a
Cloreto de cobalto 0,05mM	7,67 a
Cloreto de cobalto 0,2mM	6,87 a
Cloreto de cobalto 1mM	7,97 a
Molibdato de amônio 0,05mM	7,62 a
Molibdato de amônio 0,2mM	6,97 a
Molibdato de amônio 1mM	7,95 a
Testemunha (apenas <i>G. citri-aurantii</i> )	7,80 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). Coeficiente de variação: 9,24%.

**Tabela 6.** Efeito da mistura de fontes de nitrogênio e elementos essenciais na atividade antagônica de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, sobre o crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

Tratamentos	Diâmetro médio <i>G. citri-aurantii</i> (cm)	% inibição em relação à testemunha
ACBL-77 + Sulfato de amônio 0,5%	3,76 d <sup>(1)</sup>	55,2
ACBL-77 + Sulfato de amônio 0,5% + Ácido bórico 1 mM	6,50 bc	22,6
ACBL-77 + Sulfato de amônio 0,5% + Cloreto de cobalto 1mM	6,20 bc	26,1
ACBL-77 + Sulfato de amônio 0,5% + Molibdato de amônio 1mM	6,64 b	20,9
ACBL-77 + Ácido bórico 1 mM	0 f	100
ACBL-77 + Ácido bórico 1 mM + Cloreto de cobalto 1mM	6,14 c	26,9
ACBL-77 + Ácido bórico 1 mM + Molibdato de amônio 1mM	6,48 bc	22,8
ACBL-77 + Cloreto de cobalto 1mM	1,95 e	76,7
ACBL-77 + Cloreto de cobalto 1Mm + Molibdato de amônio 1mM	6,30 bc	25
ACBL-77 + Molibdato de amônio 1mM	1,98 e	76,4
Testemunha (apenas <i>G. citri-aurantii</i> )	8,40 a	-

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

#### 4.4 Efeito de diferentes fontes de nutrientes na competição entre *Aureobasidium pullulans* e *Geotrichum citri-aurantii*

Os resultados do estudo de competição por nutrientes nas interações entre *A. pullulans* ACBL-77 e *G. citri-aurantii*, avaliados pela germinação de conídios do fitopatógeno encontram-se na Tabela 7. Os dados mostraram que a adição de nutrientes, como ACBL-77 + sulfato de amônio 1 %, ACBL-77 + ácido bórico 1 mM, ACBL-77 + sacarose 0,5 % e ACBL-77 + cloreto de cobalto 1 mM, promoveu porcentagens de inibições na germinação de conídios do patógeno em 92, 89, 87 e 86 %, respectivamente. Tais valores são maiores do que os encontrados quando a levedura foi utilizada sem o nutriente (71 % de inibição na germinação). O tratamento controle (patógeno + nutrientes e sem levedura) apresentou aumento na germinação de conídios de *G. citri-aurantii*.

**Tabela 7.** Competição por nutrientes entre *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, e *Geotrichum citri-aurantii*.

<b>Tratamentos</b>	<b>% conídios germinados <i>G. citri-aurantii</i></b>	<b>% inibição em relação a testemunha</b>
ACBL-77	28,83 g <sup>(1)</sup>	71,2
Testemunha (apenas <i>G. citri-aurantii</i> )	69,00 d	-
Sulfato de amônio 0,5%	96,66 a	3,3
Sulfato de amônio 1%	98,66 a	1,4
ACBL-77+ Sulfato de amônio 0,5%	15,66 i	84,3
ACBL-77+ Sulfato de amônio 1%	8,33 j	91,6
Fenilalanina 0,5%	97,50 a	2,5
Fenilalanina 1%	96,83 a	3,1
ACBL-77 + Fenilalanina 0,5%	19,66 h	80,3
ACBL-77 + Fenilalanina 1%	11,33 j	88,6
Leucina 0,5%	93,66 a	6,3
Leucina 1%	89,00 b	11,0
ACBL-77 + Leucina 0,5%	24,50 g	75,5
ACBL-77 + Leucina 1%	17,50 i	82,5
Prolina 0,5%	98,66 a	1,3
Prolina 1%	97,00 a	3,0
ACBL-77 + Prolina 0,5%	23,50 g	76,5
ACBL-77 + Prolina 1%	44,33 e	55,6
Sacarose 0,5%	94,50 a	5,5
Sacarose 1%	95,83 a	4,1
ACBL-77 + Sacarose 0,5%	12,66 j	87,3
ACBL-77 + Sacarose 1%	42,83 e	57,1
Maltose 0,5%	98,16 a	1,8
Maltose 1%	98,33 a	1,6
ACBL-77 + Maltose 0,5%	24,50 g	75,5
ACBL-77 + Maltose 1%	38,66 f	61,3

Galactose 0,5%	95,83 a	4,1
Galactose 1%	95,66 a	4,3
ACBL-77 + Galactose 0,5%	22,50 g	77,5
ACBL-77 + Galactose 1%	26,50 g	73,5
Frutose 0,5%	95,33 a	4,6
Frutose 1%	96,50 a	3,5
ACBL-77 + Frutose 0,5%	18,50 h	81,5
ACBL-77 + Frutose 1%	19,16 h	80,8
Ácido bórico 1mM	81,50 c	18,5
ACBL-77 + Ácido bórico 1mM	11,33 j	88,6
Cloreto de cobalto 1mM	66,66 d	33,3
ACBL-77 + Cloreto de cobalto 1mM	13,83 i	86,1
Molibdato de amônio 1mM	99,00 a	1,0
ACBL-77 + Molibdato de amônio	39,83 f	60,1

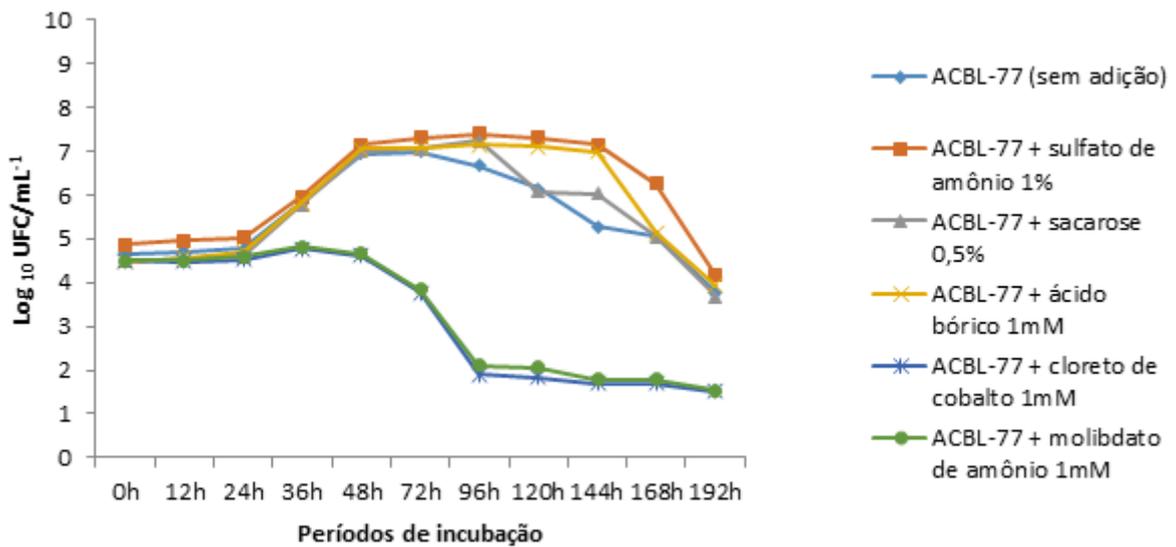
<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

#### **4.5 Efeito da adição de fontes nutricionais em meio de cultivo na produção de células por *Aureobasidium pullulans***

De acordo com os resultados obtidos, foram escolhidos cinco diferentes nutrientes para dar prosseguimento aos testes: sulfato de amônio 1%; sacarose 0,5%; ácido bórico 1 mM; cloreto de cobalto 1 mM e molibdato de amônio 1 mM. O efeito direto desses nutrientes na produção de células de *A. pullulans* ACBL-77 foi avaliado utilizando meio YMM, com ou sem o nutriente, em diferentes períodos de incubação.

A levedura cultivada em presença de sulfato de amônio 1% apresentou maior pico de produção de unidades formadoras de colônias ( $1,43 \times 10^7$  UFC/mL) em aproximadamente 48 horas de incubação. *A. pullulans* cultivada sem nenhum outro nutriente, teve seu pico no mesmo período, porém, a adição de sulfato de amônio a 1

% manteve a mesma concentração de células viáveis até 144 horas de incubação, diferente do tratamento sem nutriente, que a fase de declínio foi bem mais rápida. Na adição de sacarose 0,5%, 96 horas de incubação foi suficiente para obter maior crescimento da levedura, porém, sua fase de declínio foi mais rápida. As fontes de nutrientes cloreto de cobalto e/ ou de molibdato de amônio 1 mM quando adicionados ao meio mínimo não apresentaram crescimento do antagonista (Figura 3).

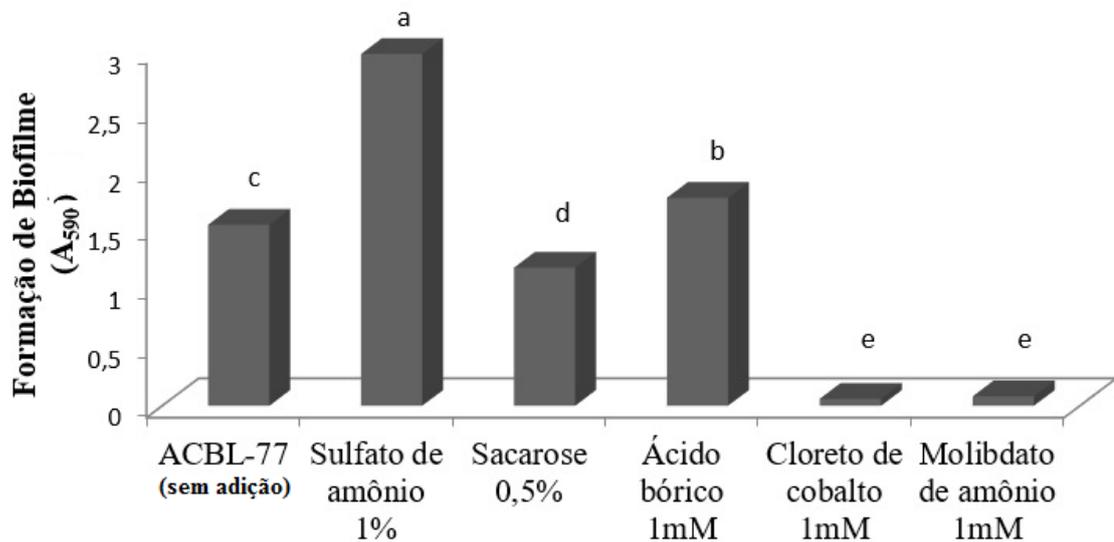


**Figura 3.** Produção de células de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 cultivada em meio YMM, com diferentes fontes de nutrientes, em diferentes períodos de incubação (horas).

#### 4.6 Quantificação de biofilme

O estudo do efeito de nutrientes no cultivo da levedura, sobre a formação de biofilme de *A. pullulans*, mostrou que houve aumento significativo na formação de biofilme com a adição de sulfato de amônio 1 % no meio de cultivo, quando comparado com o cultivo da levedura na ausência dos diferentes nutrientes avaliados. Quando se

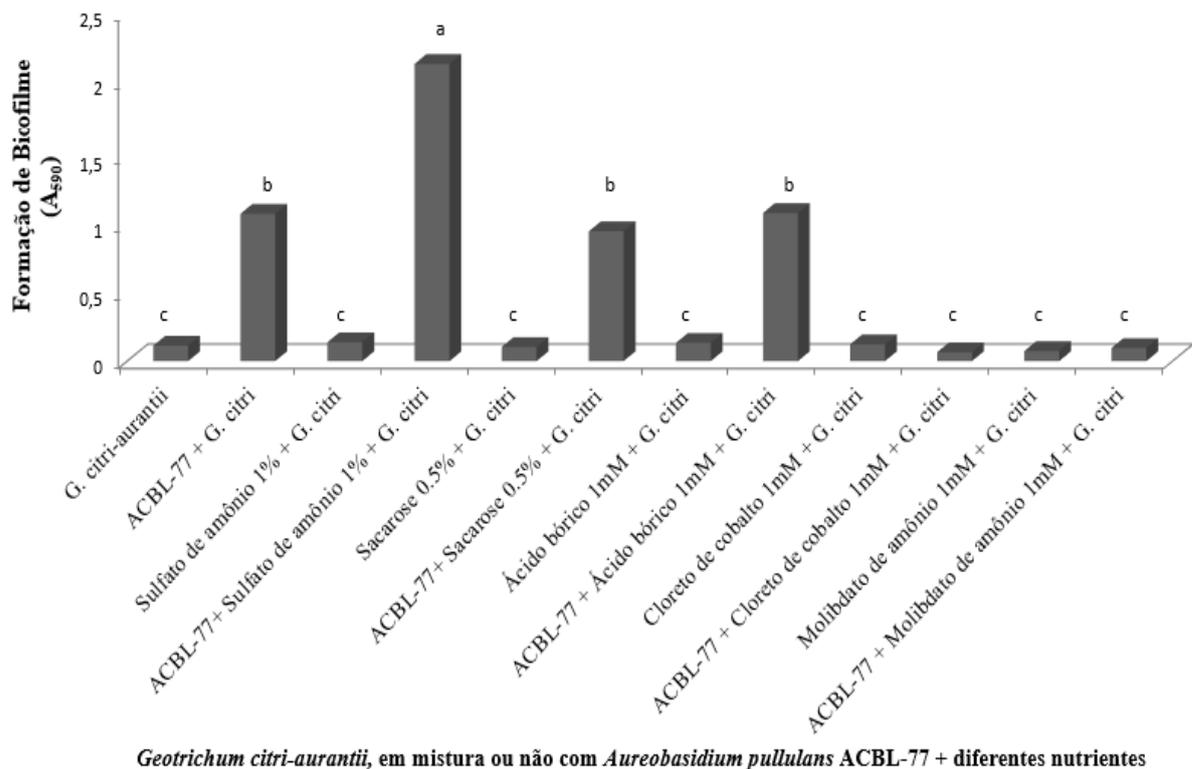
adicionou no meio cloreto de cobalto ou molibdato de amônio, ambos na concentração de 1 mM, houve inibição na formação de biofilme pelo isolado ACBL-77 (Figura 4).



***Aureobasidium pullulans* ACBL-77 + diferentes nutrientes**

**Figura 4.** Formação de biofilme por *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, cultivada após 72 horas em meio YMM, com diferentes nutrientes. O controle (ACBL-77) indica células da levedura cultivadas em meio sem adição de nutrientes. Os dados representam as médias de seis repetições.

Exceto para o tratamento com sulfato de amônio 1%, a presença do fitopatógeno no cultivo da levedura provocou redução na formação do biofilme pelo microrganismo (Figura 5).

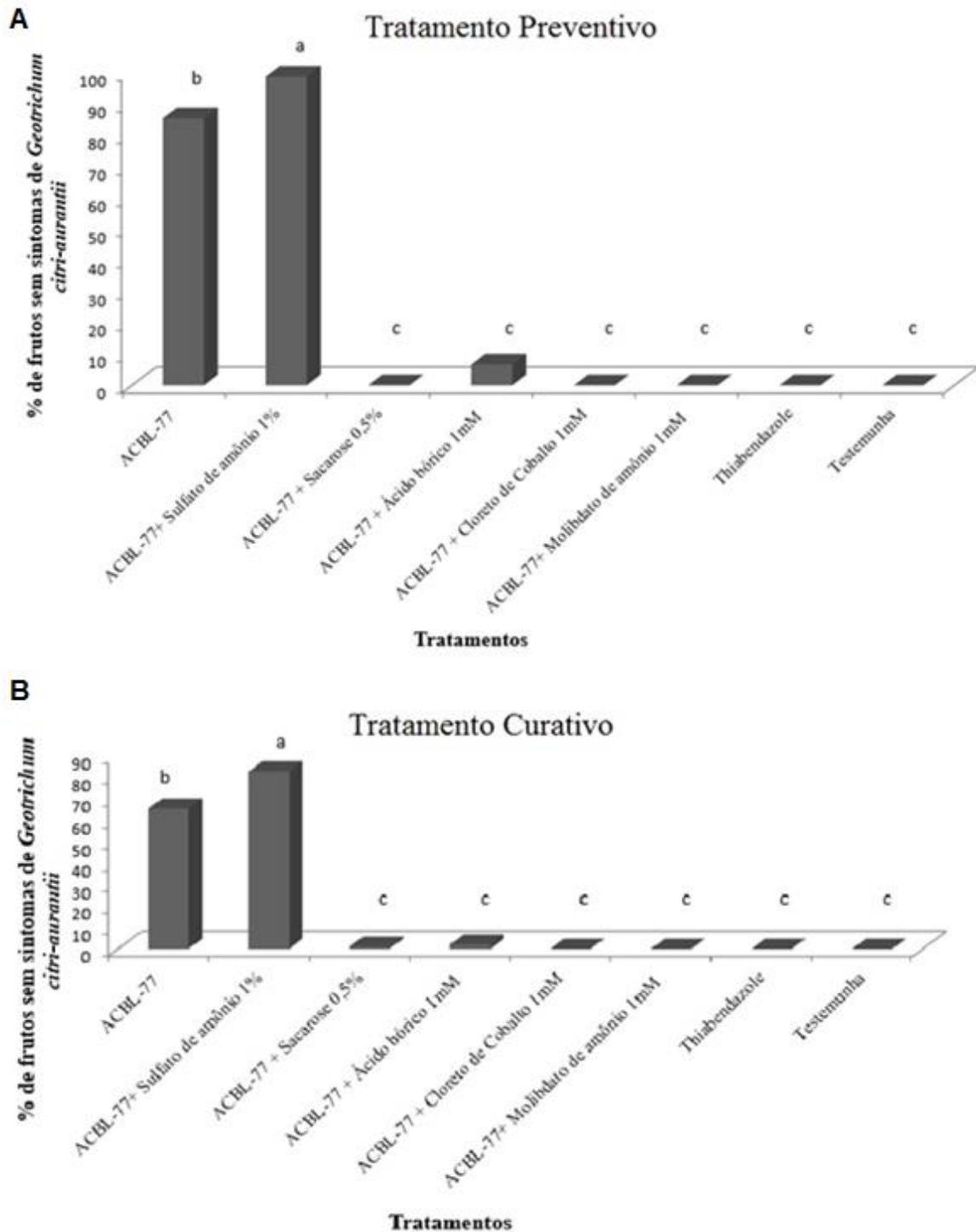


**Figura 5.** Formação de biofilme por *Aureobasidium pullulans*, ACBL-77, cultivada após 72 horas em meio YMM, com diferentes fontes de nutrientes, na presença de *Geotrichum citri-aurantii*. Os dados representam as médias de seis repetições.

#### 4.7 Atividade antifúngica *in vivo* de *Aureobasidium pullulans*

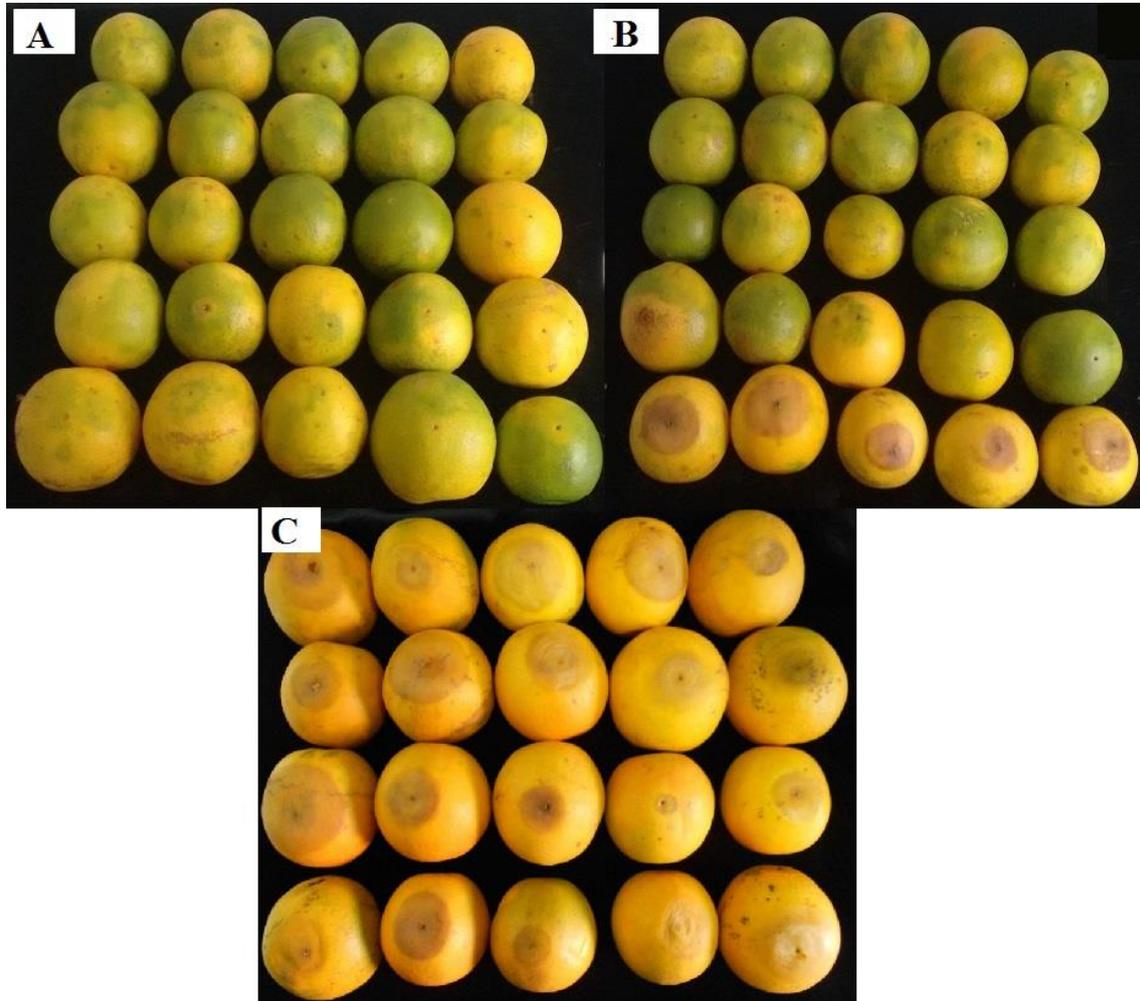
Os frutos tratados com *A. pullulans* ACBL-77, cultivada em meio YMM sem os diferentes nutrientes avaliados, apresentaram 65 e 85% de controle tanto de forma curativa como preventiva, respectivamente. Quando a levedura foi cultivada em YMM com adição de sulfato de amônio 1%, as porcentagens de controle foram significativamente maiores, com 82 e 100%, de forma curativa e preventiva, respectivamente (Figuras 6 e 7).

Os tratamentos com outros nutrientes e o controle químico (Thiabendazole®) não demonstraram eficiência no controle da podridão azeda de frutos cítricos, equiparando-se a testemunha (frutos não tratados).



**Figura 6.** Eficiência de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, cultivada em meio YMM com ou sem adição de nutrientes, no controle da podridão azeda em frutos

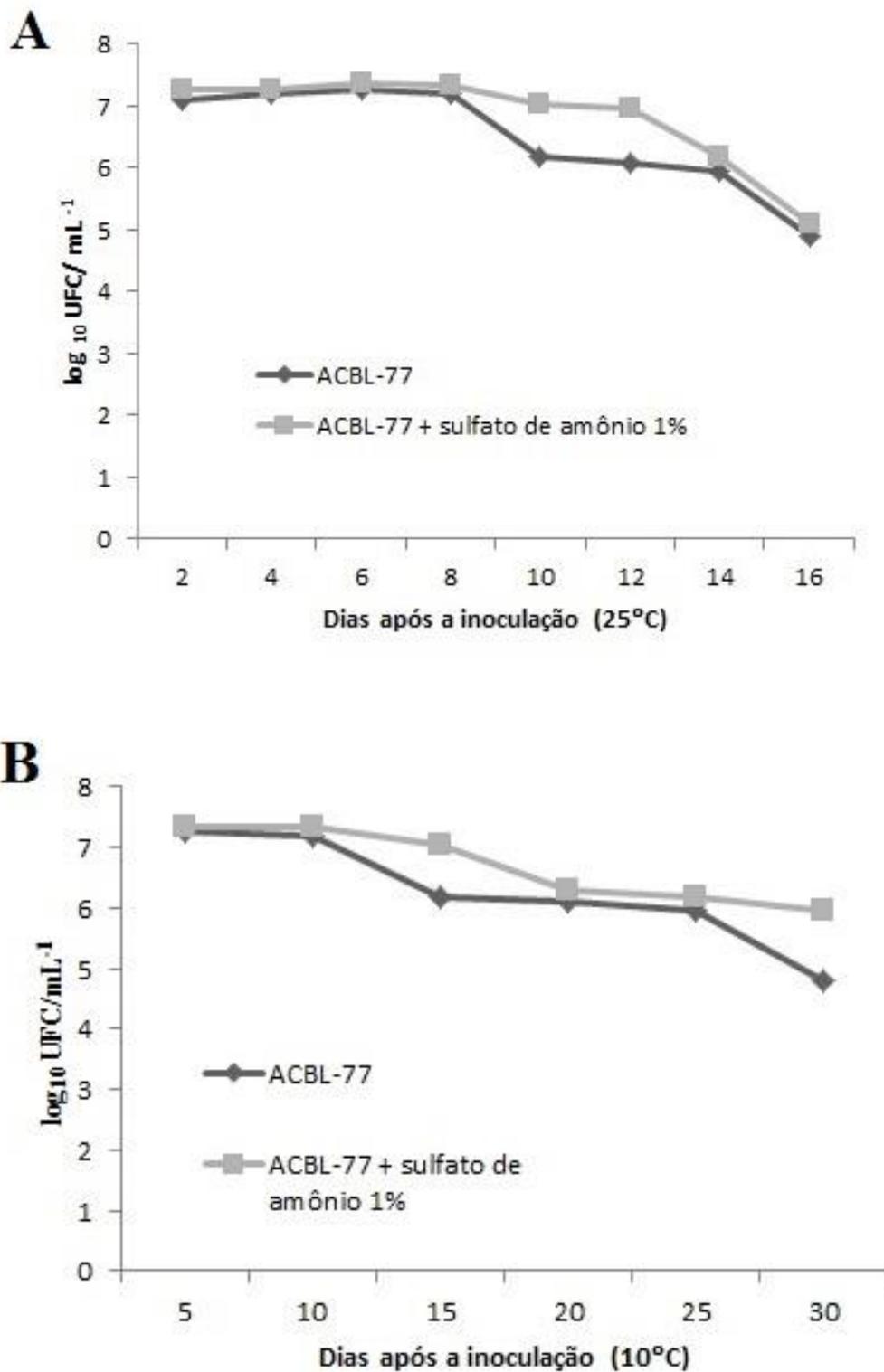
cítricos. A – Tratamento preventivo (aplicação da levedura 24 horas antes da inoculação do patógeno) B - Tratamento curativo (aplicação da levedura 24 horas após a inoculação do patógeno);. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 7.** Frutos de laranja Pera inoculados com *Geotrichum citri-aurantii*, e tratados preventivamente com: A – *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 cultivada em meio YMM juntamente com 1% de sulfato de amônio; B - *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 cultivada em meio YMM C – testemunha (sem tratamento).

#### 4.8 Sobrevivência de *Aureobasidium pullulans* no sítio de infecção

O isolado de *A. pullulans* colonizou rapidamente os ferimentos dos frutos nas duas condições de armazenamento (25 e 10 °C) (Figura 8). A concentração de células de levedura aumentou dez vezes quando comparada ao inóculo inicial ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) após dois dias de incubação e tornou-se gradualmente estável (fase estacionária) entre 8 a 10 dias, tanto quando os frutos foram armazenados a 25 ou a 10 °C. Após esse período, a produção de células da levedura atingiu  $10^6$  UFC/mL até o 14º dia (25 °C) e 20º dia (10 °C). No final das avaliações, a concentração de células do isolado ACBL-77 caiu para  $7,6 \times 10^4$  UFC/mL e  $6,0 \times 10^4$  UFC/mL, nas condições de armazenamento de 25 °C e 10 °C, respectivamente. Essas quedas foram menores quando a levedura foi cultivada na presença de sulfato de amônio 1 %, ou seja, a concentração de células da levedura caiu para  $1,2 \times 10^5$  UFC/mL e  $9,0 \times 10^5$  UFC/mL, nas condições de armazenamento dos frutos em 25 °C e 10 °C, respectivamente, sugerindo que a presença de sulfato de amônio 1 % auxilia na sobrevivência de *A. pullulans* por um maior período, em ferimentos de frutos cítricos

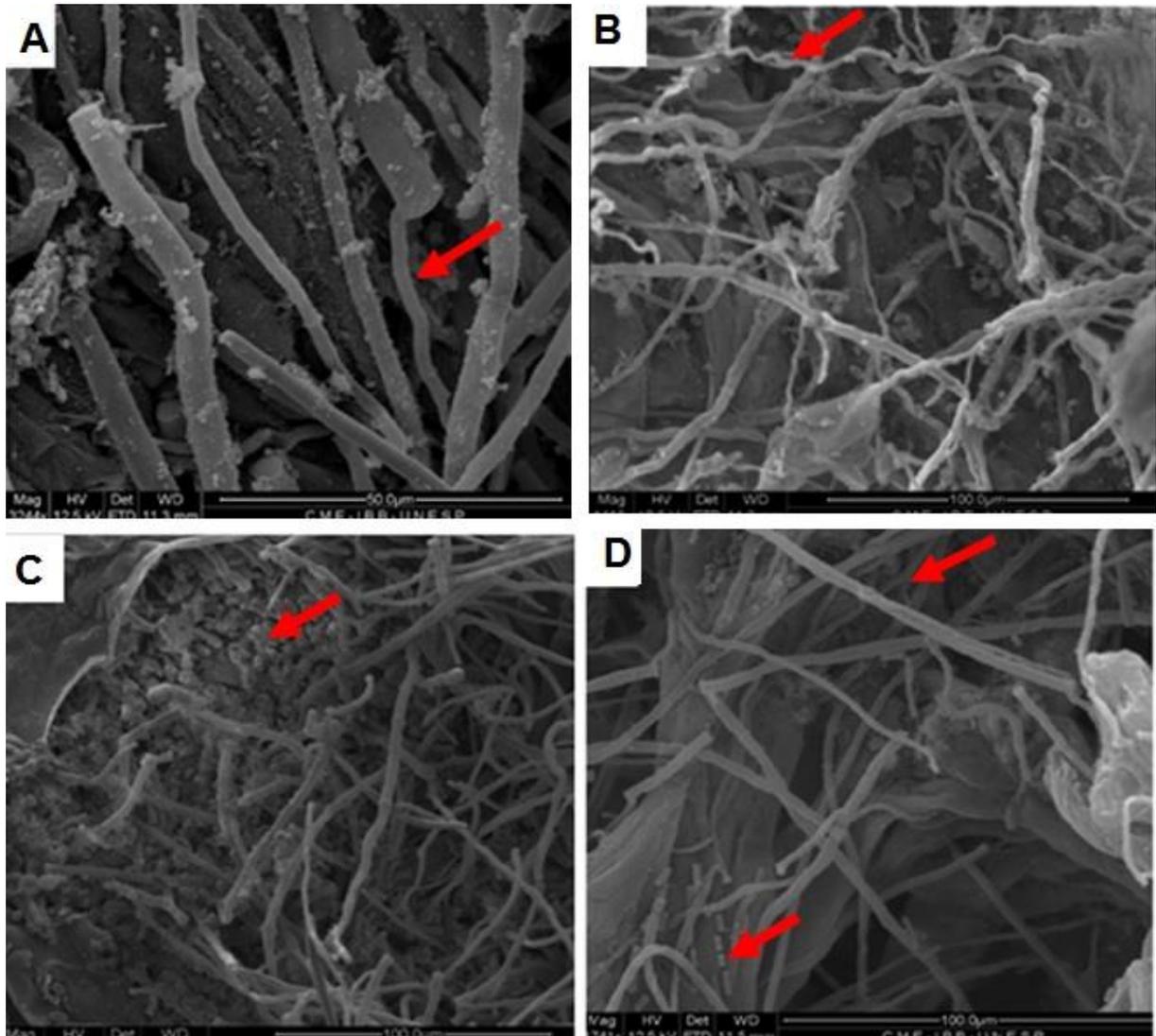


**Figura 8.** Sobrevivência de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, cultivada em meio YMM com ou sem sulfato de amônio 1%, aplicadas em fermentos de frutos cítricos armazenadas a 25 °C (A) ou 10 °C (B). Cada ponto ou coluna representa a média de cinco repetições.

#### **4.9 Estudo de microscopia eletrônica da interação entre *Geotrichum citri-aurantii* e *Aureobasidium pullulans* no sítio de infecção**

O desenvolvimento de *G. citri-aurantii* em ferimentos de frutos cítricos, tratados previamente com *A. pullulans* cultivada em meio YMM com ou sem adição de 1% de sulfato de amônio foi avaliado em microscópio eletrônico de varredura, após 48 e 72 horas da inoculação com o patógeno (Figura 9). Nos dois períodos de amostragem dos tratamentos foi observado deformação e inchaço nas hifas do patógeno quando comparado com a testemunha (inoculação de *G. citri-aurantii* sem tratamento).

Nos tratamentos com o ACBL-77, a cepa de levedura causou deformações às hifas do patógeno (Figura 9 A-B). Porém, quando a levedura foi cultivada em meio com adição de sulfato de amônio 1%, houve acúmulo de matriz extracelular e aglomeração de células ao redor do ferimento e, por conseguinte, das hifas, principalmente, na amostra retirada 72 horas após a inoculação com *G. citri-aurantii* (Figura 9 C-D). No tratamento controle, as hifas e conídios não apresentaram deformações (Figura 9 E).



**Figure 9.** Microscopia eletrônica de varredura em sítios de infecção de frutos cítricos tratados com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 e inoculados com *Geotrichum citri-aurantii*. A sequência de micrografias em cada foto foi tirada após 48 e 72 horas de incubação a 25 ° C, respectivamente, e com aumentos de 1  $\mu$ m. ACBL-77 cultivado em meio mínimo (A); ACBL-77 cultivado em YMM + sulfato de amônio 1% (B-C) e controle (D). As setas indicam: A e B) deformação na hifa do patógeno; C) acúmulo de células do ACBL-77 ao redor do ferimento e das hifas; D) Hifas e conídios intactos.

#### **4.10 Efeito de aplicações de *Aureobasidium pullulans* nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos**

Os dados referentes a porcentagem do rendimento de suco, aos teores de sólidos solúveis totais, à acidez titulável e valores de 'ratio', após aplicação do isolado ACBL-77, previamente cultivado em meio com ou sem adição de sulfato de amônio (1%) e incubação dos frutos a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $90 \pm 3\%$  UR, encontram-se nas Tabelas 8 a 23.

Observa-se que os valores referentes ao rendimento de suco se mantiveram aproximados até os 30 dias de armazenamento, não demonstrando diferença estatística entre os tratamentos (Tabelas 8 a 11). Com relação aos teores de sólidos solúveis, de um modo geral, a presença do agente de controle biológico sozinho ou, em combinação com sulfato de amônio 1%, não teve alteração significativa quando comparado com a testemunha e com o produto químico (Tabelas 12 a 15). Nos dados das Tabelas 13 a 16, podemos observar as variáveis entre os valores médios de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra), quanto à ação do ACBL-77 sozinho ou, em combinação com sulfato de amônio 1%, em relação ao tempo de armazenamento, que mantiveram o padrão das análises anteriores, não diferindo dos valores encontrados no tratamento testemunha. Com relação aos valores de "ratio", apenas o tratamento em que os frutos foram tratados com a *A. pullulans* ACBL-77 cultivada em meio com adição de sulfato de amônio 1% apresentou diferença estatística em relação ao tempo de armazenamento, variando de 10,66 (tempo zero) a 13,30 (28 dias de armazenamento). Os demais tratamentos não diferiram entre si e, nem em relação ao tempo de armazenamento (Tabelas 17 a 20).

**Tabela 8.** Porcentagem do rendimento de suco de laranja Pera, em função dos tratamentos com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	7	14	21	28
ACBL-77	46,10 aA <sup>(1)</sup>	46,43 aA	47,73 aA	48,43 aA	48,20 aA
ACBL-77 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50,56 aA	52,80 aA	49,20 aA	49,90 aA	50,56 aA
Thiabendazole <sup>®</sup>	49,30 aA	52,23 aA	49,30 aA	49,33 aA	51,03 aA
Testemunha*	50,76 aA	50,80 aA	48,93 aA	50,53 aA	50,26 aA

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

\*Testemunha: frutos tratados apenas com água

**Tabela 9.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% em frutos de laranja Pera armazenados a 10 °C, em relação à porcentagem de rendimento de suco.

C. Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento (T)	3	10,1,776	33,925	3,342 **
Tempo de armazenamento (A)	4	23,222	5,805	0,572 ns
T x A	12	40,702	3,391	0,334 *
Coeficiente de Variação (%)				6,42

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )

**Tabela 10.** Influência do tratamento com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% na porcentagem do rendimento de suco de laranja Pera armazenada a 10 °C.

<b>Tratamentos</b>	<b>% de rendimento de suco</b>
ACBL-77	47,38 b <sup>(1)</sup>
ACBL-77+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50,60 a
Thiabendazole <sup>®</sup>	50,24 ab
Testemunha	50,26 ab

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p ≥ 0,05).

**Tabela 11.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10 °C, em frutos de laranja Pera tratados com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%, na porcentagem de rendimento de suco de laranja Pera.

<b>Tempo de armazenamento (dias)</b>	<b>% de rendimento de suco</b>
0	49,18 a
7	50,56 a
14	48,79 a
21	49,55 a
28	50,01 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p ≥ 0,05).

**Tabela 12.** Valores médios do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) de laranja Pera armazenado a 10 °C em função dos tratamentos com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	7	14	21	28
ACBL-77	7,56 aA <sup>(1)</sup>	7,36 aA	7,56 aA	7,33 aA	7,20 aA
ACBL-77 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,53 aA	7,20 aA	7,53 aA	7,30 aA	7,36 aA
Thiabendazole <sup>®</sup>	7,40 aA	7,26 aA	7,40 aA	7,20 aA	7,40 aA
Testemunha*	7,63 aA	7,30 aA	7,63 aA	7,20 aA	7,43 aA

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). \*Testemunha: frutos tratados apenas com água

**Tabela 13.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% em frutos de laranja Pera armazenados a 10 °C, em relação aos valores de sólidos solúveis (Brix<sup>0</sup>)

C. Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento (T)	3	0,089	0,029	0,4169 ns
Tempo de armazenamento (A)	4	0,8566	0,0214	2,981 **
T x A	12	0,266	0,022	0,306 *
Coeficiente de Variação (%)				3,63

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = < p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )

**Tabela 14.** Influência do tratamento com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% nos valores de sólidos solúveis (Brix<sup>o</sup>) em laranja Pera armazenada a 10 °C

Tratamentos	g de ácido cítrico/100 mL de amostra
ACBL-77	7,40 a <sup>(1)</sup>
ACBL-77+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,28 a
Thiabendazole <sup>®</sup>	7,33 a
Testemunha	7,44 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

**Tabela 15.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10 °C, em frutos de laranja Pera tratados com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%, nos valores de sólidos solúveis.

Tempo de armazenamento (dias)	g de ácido cítrico/100 mL de amostra
0	7,53 a <sup>(1)</sup>
7	7,28 a
14	7,53 a
21	7,25 a
28	7,35 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p ≥ 0,05).

**Tabela 16.** Valores médios de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra) de laranja Pera armazenado a 10 °C em função dos tratamentos com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	7	14	21	28
ACBL-77	0,6403 aA <sup>(1)</sup>	0,6670 aA	0,6014 aA	0,6550 aA	0,5923 aA
ACBL-77 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6772 aA	0,6544 aA	0,6014 aA	0,6086 aA	0,5585 aA
Thiabendazole®	0,6512 aA	0,6319 aA	0,6022 aA	0,6523 aA	0,5805 aA
Testemunha*	0,5995 aA	0,6303 aA	0,6111 aA	0,6000 aA	0,6199 aA

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

\*Testemunha: frutos tratados apenas com água

**Tabela 17.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% em frutos de laranja Pera armazenados a 10 °C, em relação acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra).

C. Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento (T)	3	0,0042	0,0014	0,9152 ns
Tempode armazenamento (A)	4	0,0113	0,0028	1,8392 ns
Tratamentos	19	0,0479	0,0025	1,76397 ns
Resíduo	40	0,0615	0,0015	
Total	59	0,1094		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )

**Tabela 18.** Influência do tratamento com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra) em laranja Pera armazenada a 10 °C.

Tratamentos	g de ácido cítrico/100 mL de amostra
ACBL-77	0,6369 a <sup>(1)</sup>
ACBL-77+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6200 a
Thiabendazole®	0,6238 a
Testemunha	0,6141 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

**Tabela 19.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10 °C, em frutos de laranja Pera tratados com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%, nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra).

Tempo de armazenamento (dias)	g de ácido cítrico/100 mL de amostra
0	0,6411 a <sup>(1)</sup>
7	0,6322 a
14	0,6161 a
21	0,6275 a
28	0,6015 a

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

**Tabela 20.** Valores Médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável) de laranja Pera armazenado a 10 °C em função dos tratamentos com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	7	14	21	28
ACBL-77	11,46 aA <sup>(1)</sup>	11,13 aA	12,06 aA	11,26 aA	12,23 aA
ACBL-77 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,66 aB	11,06 aAB	12,63 aAB	12,06 aAB	13,30 aA
Thiabendazole <sup>®</sup>	11,53 aA	11,86 aA	12,33 aA	11,13 aA	12,80 aA
Testemunha*	12,26 aA	11,70 aA	12,36 aA	12,03 aA	12,00 aA

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

\*Testemunha: frutos tratados apenas com água

**Tabela 21.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% em frutos de laranja Pera armazenados a 10 °C, em relação aos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável).

C. Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento (T)	3	1,9245	0,6415	1,1483 ns
Tempo de armazenamento (A)	4	14,9573	3,7393	6,6933 ns
TxA	12	8,7880	0,7323	1,3109 ns
Tratamentos	19	25,6698	1,3510	2,4183 **
Resíduo	40	22,3466	0,5586	
Total	59	48,0165		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )

**Tabela 22.** Influência do tratamento com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1% nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável) em laranja Pera armazenada a 10 °C

Tratamentos	sólidos solúveis/ acidez titulável
ACBL-77	11,6133 a <sup>(1)</sup>
ACBL-77+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11,8800 a
Thiabendazole®	11,9333 a
Testemunha	12,1133 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

**Tabela 23.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10 °C, em frutos de laranja Pera tratados com *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, com ou sem sulfato de amônio 1%, nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável)

Tempo de armazenamento (dias)	sólidos solúveis/ acidez titulável
0	11,4833 a <sup>(1)</sup>
7	11,4416 a
14	12,4000 a
21	11,5166 a
28	12,5833 a

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

## 4.11 Análise bioquímica

### 4.11.1 Compostos fenólicos

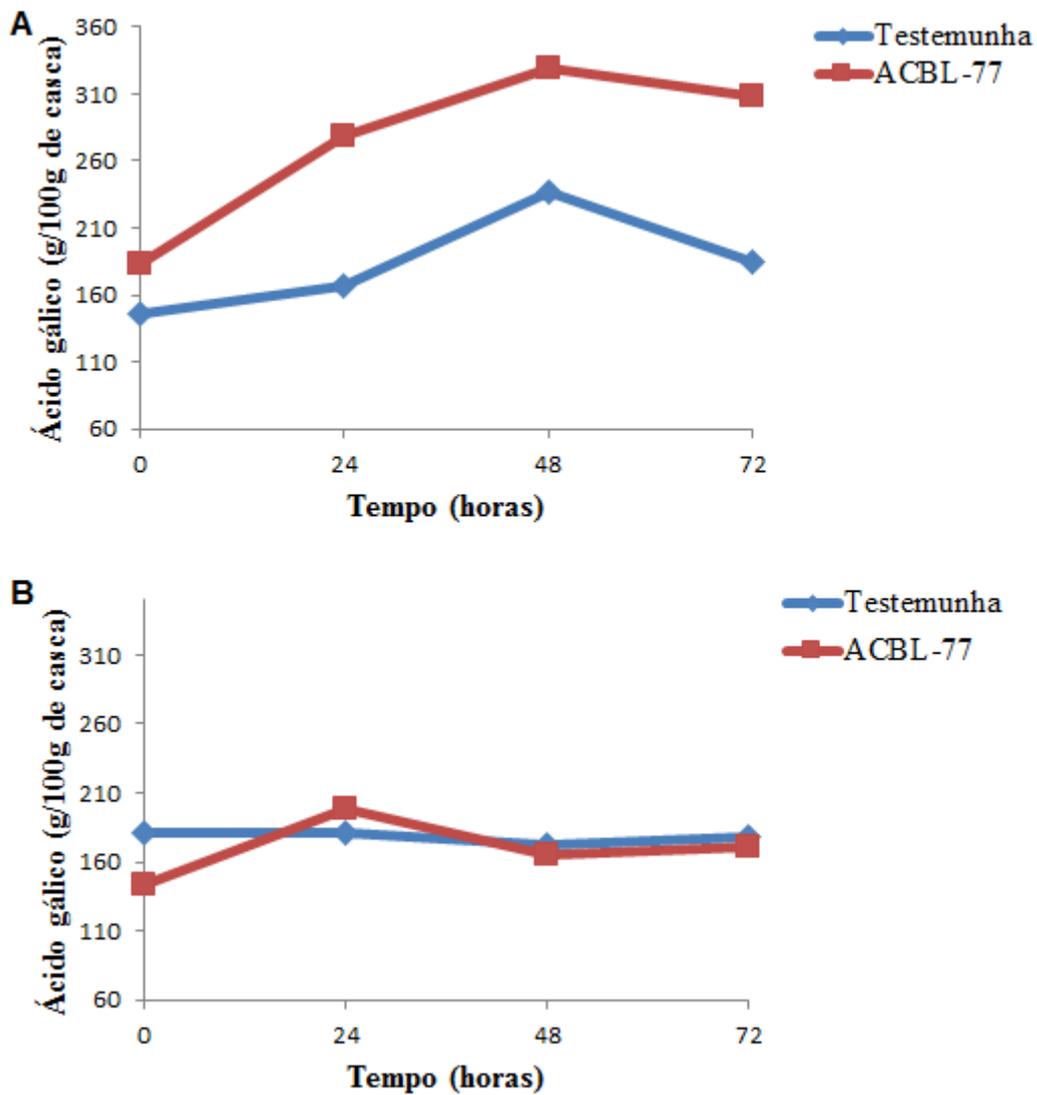
Com relação aos compostos fenólicos, observa-se, pelos dados apresentados na Tabela 24, que houve diferença significativa entre os tratamentos, o modo de aplicação da levedura e o tempo de amostragem.

Os compostos fenólicos aumentaram quando os frutos foram tratados com a levedura, porém, esse aumento variou em função do tempo de amostragem e do tipo de aplicação. Quando frutos de laranja Pera foram tratados com uma suspensão de *A. pullulans* ACBL-77, aplicada por pipetagem, observou-se um pico maior nesse tipo de amostragem, porém, com um tempo maior de incubação. A atividade desses compostos foi maior em amostras de frutos retiradas 48 horas após o tratamento com a levedura, com 329 mg de ácido gálico 100g<sup>-1</sup> em massa fresca, quando comparado com a testemunha (236 mg de ácido gálico 100g<sup>-1</sup> em massa fresca) (Figura 10 A). No entanto, nos frutos imersos na suspensão da levedura verificou-se maior quantidade de compostos fenólicos totais após 24 horas do tratamento, quando comparado com a testemunha, com 197 e 181 mg de ácido gálico 100g<sup>-1</sup> em massa fresca, respectivamente (Figura 10 B). Após esse período houve diminuição dos valores dos compostos fenólicos.

**Tabela 24.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, em frutos de laranja Pera, em relação atividade dos compostos fenólicos.

C. Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento (T)	1	20413,51	20413,51	65,21 **
Tipo de aplicação (A)	1	3622,51	3622,51	115,72 **
Tempos (Te)	3	25753,65	8584,55	27,42 **
T x A	1	29853,65	29853,65	95,37 **
T x Te	3	7712,64	2570,88	8,21 **
A x Te	3	21021,10	7007,03	22,38 **
T x A x Te	3	1161,55	387,18	1,23 ns
Tratamentos	15	142141,90	9476,12	30,27 *
Resíduos	32	10016,64	313,02	
Total	47	152158,55		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ ).



**Figura 10.** Produção de compostos fenólicos (mg de ácido gálico  $100\text{ g}^{-1}$  em massa fresca) em diferentes tempos de aplicação (horas) de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77. (A) Aplicação por pipetagem; (B) Aplicação por imersão.

#### 4.11.2 Peroxidase (POD)

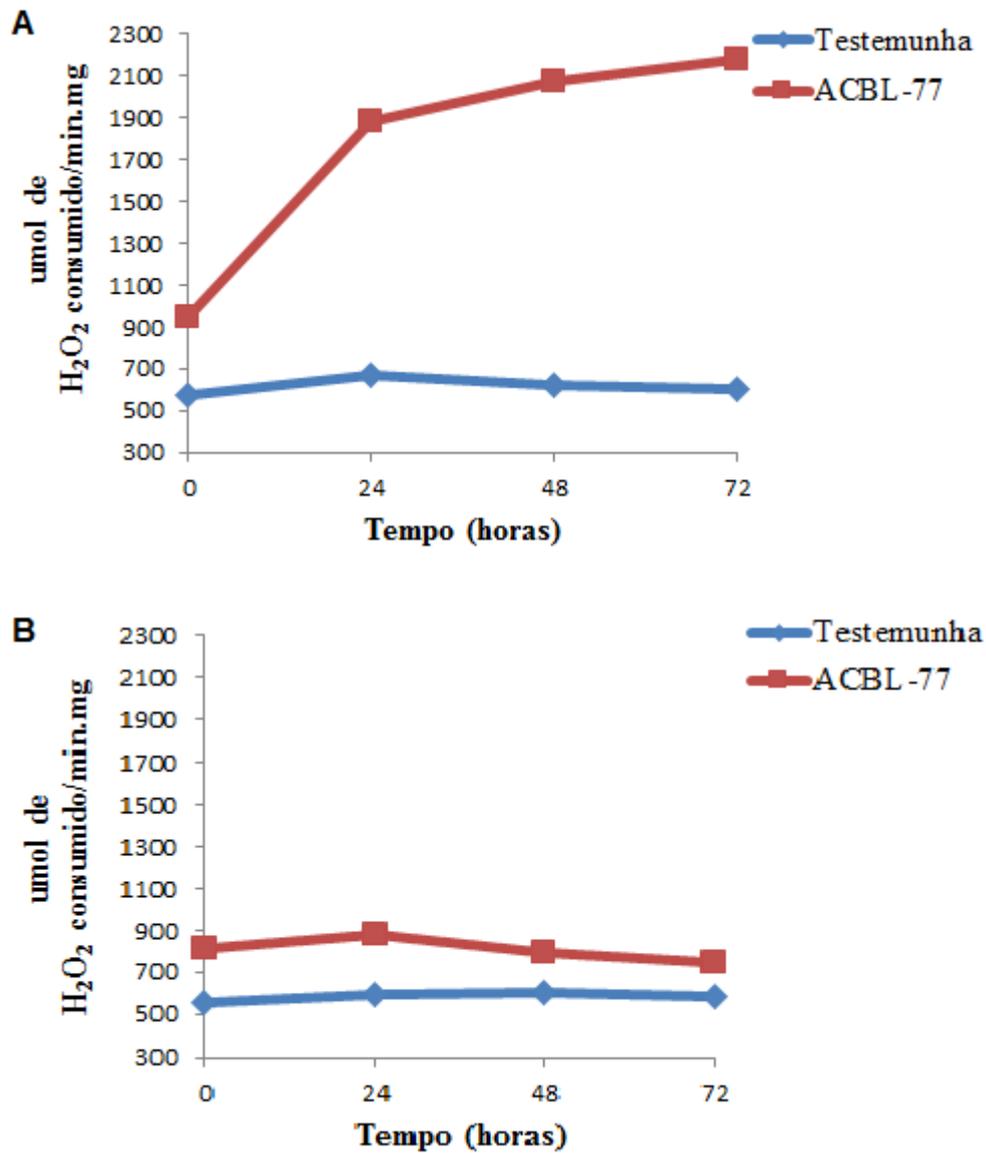
Pelos dados apresentados na Tabela 25, observam-se diferenças significativas entre os tratamentos, o modo de aplicação da levedura e o tempo de amostragem com relação a atividade da enzima POD.

Os dados da Figura 11 mostram que o tratamento utilizando *A. pullulans* diferiu estatisticamente da testemunha, sendo o maior aumento da atividade da enzima peroxidase observado quando a levedura foi aplicada por pipetagem, de modo que os valores apresentaram aumento gradativo a partir de 24 horas até 72 horas de amostragem (2178  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido/ min.mg), comparado com a testemunha (600  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido/ min.mg) (Figura 11 A). Os valores da atividade da POD, quando os frutos foram imersos na suspensão da levedura, corresponderam a 879  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido/ min.g (no tempo de 24 horas de amostragem) diminuindo gradativamente no decorrer do tempo de incubação, enquanto que a testemunha praticamente manteve os valores em torno de 596  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 11 B).

**Tabela 25.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, em frutos de laranja Pera, em relação atividade da enzima peroxidase.

<b>C. Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>
Tratamento (T)	1	5707571,67	5707571,67	150,06 **
Tipo de aplicação (A)	1	2959463,36	2959463,36	77,81 **
Tempos (Te)	3	781217,81	260405,93	6,84 **
T x A	1	2588152,75	2588152,75	68,04 **
T x Te	3	576844,93	192281,64	5,05 **
A x Te	3	766907,28	255635,76	6,72 **
T x A x Te	3	745182,35	248394,116	6,53 **
Tratamentos	15	14125340,18	941689,34	24,75 *
Resíduos	32	1217072,60	38033,51	
Total	47	15342412,78		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = < p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )



**Figura 11.** Atividade da enzima peroxidase em diferentes tempos de aplicação (horas) de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77. (A) Aplicação por pipetagem; (B) Aplicação por imersão.

#### 4.11.3 Polifenoloxidase (PPO)

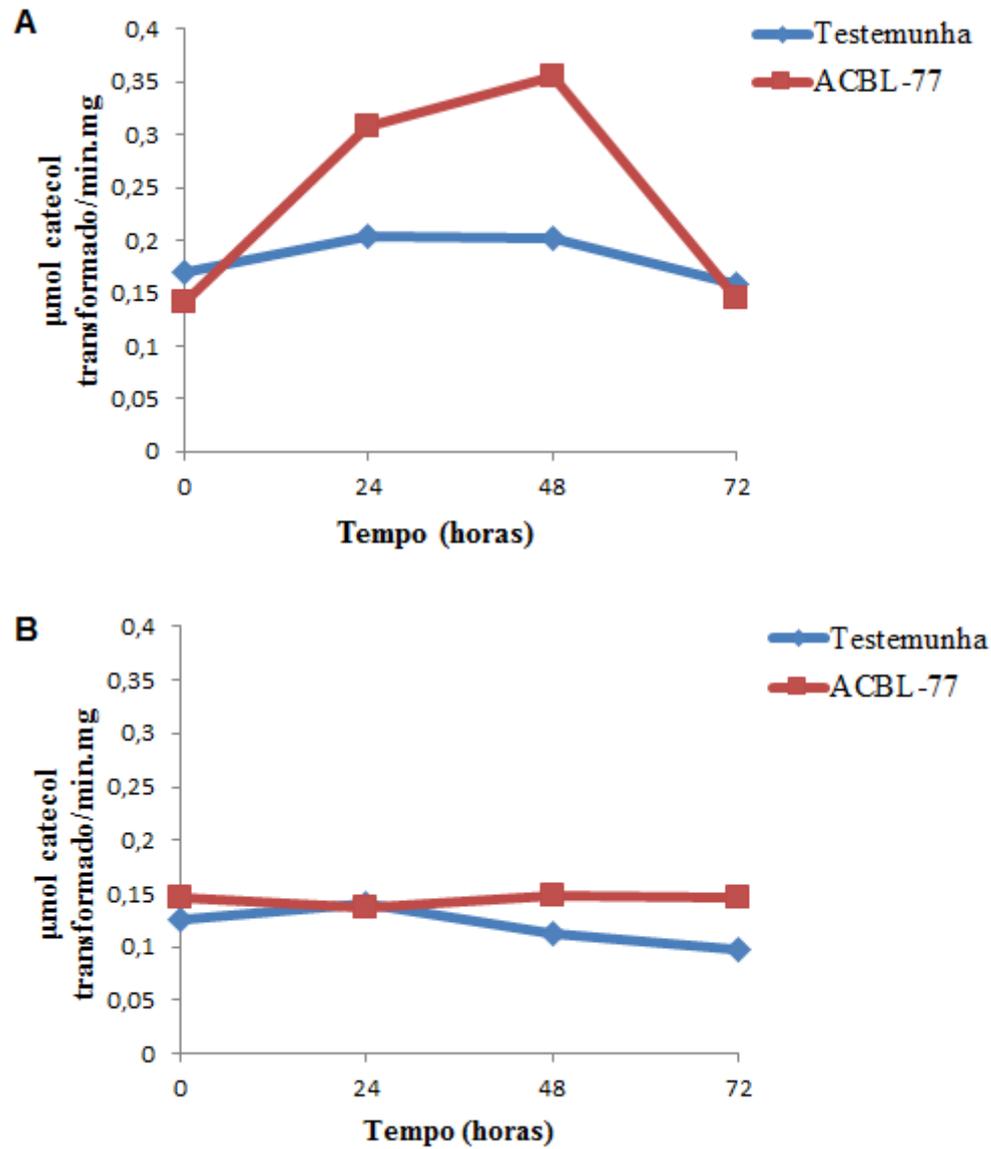
A enzima polifenoloxidase (PPO) apresentou comportamento similar a POD, com diferença estatística na comparação entre o tratamento com ACBL-77 *A. pullulans* e a testemunha. Na aplicação por pipetagem obteve-se maiores valores, como também, diferença nos diferentes tempos de coleta de amostras, quando comparado com a primeira coleta (Tabela 26).

A polifenoloxidase mostrou pico de atividade em 48 horas quando foi analisado o tecido vegetal de frutos provenientes do tratamento com pipetagem, com valores de 0,356 e 0,201  $\mu\text{mol}$  catecol transformado por mg de proteína por minuto, respectivamente. No tratamento com o ACBL-77 e na testemunha (Figura 12 A), e após esse período (48 horas), houve decréscimo na atividade. No tratamento por imersão, notou-se o mesmo desempenho entre os tratamentos e os tempos de amostragem, com valores  $\pm 118$   $\mu\text{mol}$  catecol transformado por mg de proteína por minuto (Figura 12 B).

**Tabela 26.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, em frutos de laranja Pera, em relação atividade da enzima polifenoloxidase.

<b>C. Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>
Tratamento (T)	1	0,05	0,05	243,50 **
Tipo de aplicação (A)	1	0,13	0,13	603,75 **
Tempos (Te)	3	0,02	0	38,51 **
T x A	1	0,02	0,02	92,80 **
T x Te	3	0,02	0	43,12 **
A x Te	3	0,03	0,01	47,39 **
T x A x Te	3	0,01	0	27,10 **
Tratamentos	15	0,31	0,02	93,89 *
Resíduos	32	0	0	
Total	47	0,32		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )



**Figura 12.** Atividade da enzima polifenolxidase em diferentes tempos de aplicação (horas) de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77. (A) Aplicação por pipetagem; (B) Aplicação por imersão.

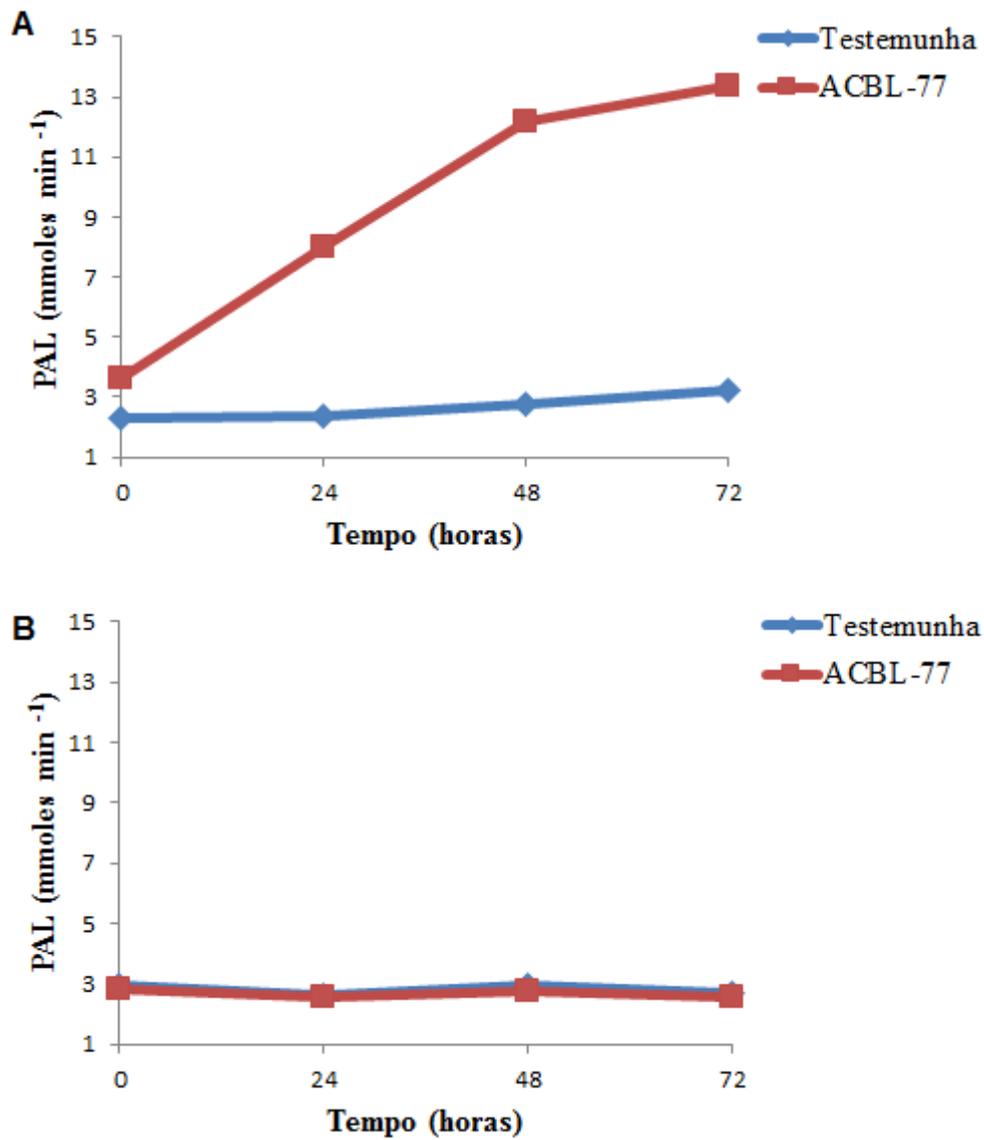
#### 4.11.4 Fenilalanina amônia liase (PAL)

O tratamento com a levedura demonstrou diferença significativa com relação a testemunha quanto à atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). A maior atividade foi alcançada quando a aplicação da levedura em frutos foi através da pipetagem, apresentado um aumento gradativo até 72 horas de incubação dos frutos (pico de 13,38  $\mu\text{mol}$  de ácido cinâmico por mg de proteína por  $\text{min}^{-1}$ ), quando comparado com a testemunha (3,26  $\mu\text{mol}$  de ácido cinâmico por mg de proteína por  $\text{min}^{-1}$ ) (Tabela 27, Figura 13 A). Quando os frutos foram imersos na suspensão da levedura os valores de atividade enzimática foram de 144 e 118  $\mu\text{mol}$  de cinâmico para os tratamentos com a levedura e a testemunha, respectivamente e, esses valores se mantiveram similares no decorrer do tempo de amostragem (Figura 13 B).

**Tabela 27.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, em frutos de laranja Pera, em relação atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL).

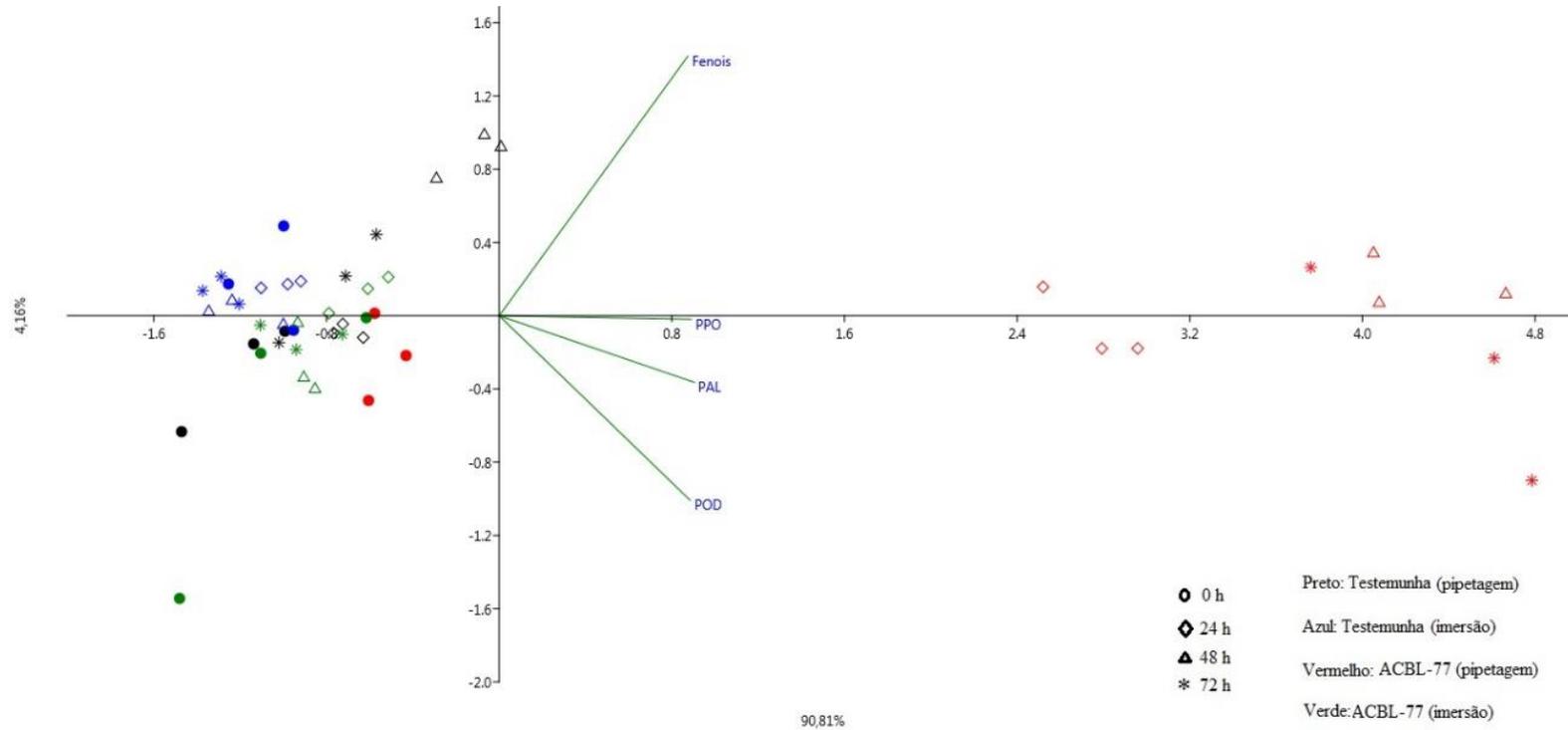
C. Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento (T)	1	125,24	125,24	541,25 **
Tipo de aplicação (A)	1	125,26	125,26	541,34 **
Tempos (Te)	3	49,59	16,53	71,44 **
T x A	1	137,26	137,26	593,21 **
T x Te	3	36,93	12,31	53,20 **
A x Te	3	55,36	18,45	79,75 **
T x A x Te	3	38,26	12,75	55,12 **
Tratamentos	15	567,93	37,86	163,62 *
Resíduos	32	7,40	0,23	
Total	47	575,34		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )



**Figura 13.** Atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) em diferentes tempos de aplicação (horas) de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77. (A) Aplicação por pipetagem; (B) Aplicação por imersão.

A Figura 14 mostra a análise dos componentes principais dos compostos fenólicos e das enzimas POD, PPO e PAL. Nota-se que a primeira variável explica 90,21% da variabilidade dos dados, e é formada pela combinação linear de 3 vetores (POD + PPO + PAL). Já a segunda variável (fenóis) explica 4,16% da variabilidade dos dados. Pode-se dizer que no tempo de 0 hora não houve aumento da atividade enzimática e nem do conteúdo fenólico, porém, com o decorrer do tempo de incubação dos frutos cítricos, observou-se aumento nos valores de ambos. O tratamento com a aplicação de *A. pullulans* ACBL-77 pelo método de pipetagem demonstrou altos valores dos dois componentes avaliados, apresentando maior atividade dos compostos fenólicos e das enzimas. A análise foi realizada com base na matriz de correlação e os valores das médias e variâncias foram previamente padronizados.



**Figura 14.** Projeção bidimensional dos resultados obtidos da análise dos componentes principais da atividade dos compostos fenólicos e da atividade das enzimas possivelmente relacionadas na indução de resistência nas amostras retiradas em diferentes tempos, de frutos cítricos tratados com uma suspensão de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, aplicados por pipetagem ou por imersão dos frutos.

## 5. DISCUSSÃO

O uso de leveduras antagonistas no controle de doenças de pós-colheita é uma tecnologia promissora para a redução total ou parcial de agroquímicos comumente utilizados durante o beneficiamento de frutas no *packing house*. Os principais mecanismos de ação atribuídos a esses microrganismos como competição por espaço e nutrientes, formação de biofilme e produção de enzimas hidrolíticas favorecem o biocontrole na pós-colheita (SPADARO; DROBY, 2016). Foram estudadas interações antagonistas entre *A. pullulans* ACBL-77 e *G. citri-aurantii*, variando as fontes de nutrientes em meio de cultivo da levedura.

Neste trabalho confirmou-se o potencial de controle da levedura contra a podridão azeda em frutos cítricos, sendo que o melhor controle foi observado quando a levedura foi aplicada como tratamento preventivo (Figura 1). Resultados semelhantes foram relatados por Adikaram, Joyce e Terry (2002), quando fizeram aplicações preventivas para controle de *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em morangos, utilizando uma cepa de *A. pullulans*. Mounir et al. (2007) utilizaram aplicações preventivas com células liofilizadas de *A. pullulans* armazenadas por 7 meses a 4 °C contra *Penicillium expansum* em maçãs, encontrando bons resultados na diminuição do diâmetro da lesão. Resultados similares foram publicados por Achbani et al. (2005), utilizando pulverizações preventivas de uma cepa de *A. pullulans* contra *P. expansum* e *B. cinerea* em maçãs. Essas informações corroboram com as pesquisas de Filonow (1998), quando afirmou que leveduras que controlam patógenos podem colonizar tecidos com ferimentos, como também em senescência, e como consequência, pode prevenir o estabelecimento de relações parasitárias.

As fontes de micronutrientes como cloreto de cobalto, molibdato de amônio e ácido bórico (todos a 1 mM) melhoraram a ação antagônica da levedura, proporcionando redução no crescimento micelial do fitopatógeno (Tabela 4). De acordo com Conrad et al. (2014) cada micronutriente tem mecanismos específicos para a regulação do crescimento celular, o que pode interferir na síntese proteica de cada microrganismo, nas alterações das vias enzimáticas e na regulação da expressão do gene ribossomal. Consequentemente, essa interferência poderá afetar

o desempenho antagonista tanto de forma positiva como negativa, como por exemplo, na produção de determinado tipo de metabólito. No respectivo estudo, observou-se que as fontes de micronutrientes adicionadas ao meio de cultivo da levedura favoreceram a atividade antagônica de *A. pullulans*, que causou inibições no desenvolvimento de *G. citri-aurantii*.

Nenhum dos nutrientes testados afetou o crescimento micelial de *G. citri-aurantii* quando testados diretamente sobre o patógeno (sem a levedura), demonstrando que tais nutrientes não têm efeito antifúngico sobre o patógeno, mas que a levedura utiliza tais nutrientes em seu benefício, aumentando sua atividade antagonística (Tabela 5). Nenhum tratamento onde se utilizou a mistura das melhores fontes de nutrientes favoreceu o antagonismo de ACBL-77, sendo que os nutrientes sozinhos apresentaram melhores resultados de inibição da colônia de *G. citri-aurantii* (Tabela 6), sugerindo que a alta disponibilidade de nutrientes não favorece a competição entre os microrganismos envolvidos ou ainda, favorece apenas o metabolismo do patógeno.

No estudo sobre a competição de nutrientes entre a levedura e o patógeno, além dos micronutrientes (cloreto de cobalto, molibdato de amônio e ácido bórico), sulfato de amônio 1% e sacarose 0,5% promoveram aumento na porcentagem de inibição da germinação de conídios, quando comparado com o tratamento referente ao cultivo da levedura sem nutriente (Tabela 7). Estudos *in vitro* e *in vivo*, sobre a competição de nutrientes entre *A. pullulans* e *Penicillium expansum* em maçãs, realizados por Bencheqroun et al. (2007) mostraram redução na germinação de conídios do patógeno, pela competição por aminoácidos entre os microrganismos envolvidos. Além disso, os autores observaram redução na severidade da doença, com diminuição do tamanho das lesões em até 97%. Em relação à importância de estudos sobre diversas fontes de nutrientes utilizadas em combinação com leveduras antagonistas, Droby et al. (2003) utilizaram diversos sais (bicarbonato de sódio, propionato de cálcio e ácido etilenodiaminotetracético de sódio) em combinação com o bioproduto Aspire® (a base de *Candida oleophila*), no qual os nutrientes exibiram capacidade de melhorar, significativamente, o biocontrole contra *Botrytis cinerea* e *P. expansum* em maçã e *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer* em pêssego.

Ao observar a curva de crescimento de *A. pullulans* ACBL-77, nota-se que, as fases de crescimento da levedura foram influenciadas pela fonte de nutriente utilizada no meio de cultivo. Quando a levedura foi cultivada sem fonte exógena (apenas em YMM), a maior produção de colônias ativas foi obtida em 48 horas de incubação, entrando na fase estacionária em 72 horas. Com a adição de sulfato de amônio 1% ao meio de cultivo, a maior produção de colônias viáveis foi verificada, também, em 48 horas, porém, a sua fase estacionária foi prolongada até 144 horas de incubação (Figura 5). Considerando que, a produção de biofilme por *A. pullulans* ocorre na fase estacionária da levedura (RAVELLA et al., 2010), esse aumento nesta fase, em função do nutriente, permitiu, também, o aumento de biofilme (Figura 6). Os resultados desse trabalho são similares àqueles relatados por Yurlova e Hoog (1997), que observaram que a quantidade de expolissacarídeos pode ser estimulada pela concentração de diferentes fontes de nitrogênio durante o cultivo do microrganismo. Ravella et al. (2010) e Bulmer, Catley e Kelly (1987) verificaram aumento na produção de pululana quando da adição de sulfato de amônio e de nitrato de amônio no meio de cultivo da levedura, respectivamente. Por outro lado, os dados encontrados no respectivo estudo não estão de acordo com os publicados por Parafati et al. (2015), segundo os autores *A. pullulans* apresenta alta capacidade de colonização de fermentos em frutos de uva, mas eles não observaram a formação de biofilme.

De acordo com Droby et al. (2009), a formação de biofilme é um processo no qual os microrganismos formam estruturas multicelulares embebidas numa matriz complexa, que lhes permite melhor adesão em superfícies, aumentando sua resistência às tensões. Portanto, a formação de biofilmes pode ser considerada uma característica importante para agentes de biocontrole de pós-colheita, durante a colonização do substrato e de fermentos de frutos.

Sendo assim, aplicações *in vivo* da levedura, cultivada em meio na presença de sulfato de amônio 1%, apresentaram os melhores resultados de controle, quando se avaliou a incidência da podridão azeda (Figuras 6 e 7). Esses resultados apontam que o aumento na produção de biofilme pode ter auxiliado no biocontrole. De acordo com Spadaro (2014), a capacidade de formação de biofilme na superfície de fermentos é um forte mecanismo de biocontrole de microrganismos antagonistas.

O rápido crescimento e a densidade populacional de microrganismos antagonísticos em fermentos de frutos são vantagens que o antagonista tem em relação à competição com os patógenos por nutrientes e espaço, sendo considerado um importante modo de ação, em muitos sistemas de controle biológico na fase de pós-colheita (LIU et al., 2013). A multiplicação rápida de *A. pullulans* em frutos cítricos indicou que esta levedura se adapta e coloniza os fermentos nos frutos, desempenhando bem a sua ação como agente de biocontrole. No presente trabalho, estudando a dinâmica populacional de *A. pullulans* em frutos de laranja, a levedura previamente cultivada em meio acrescido de uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio 1%) garantiu melhor estabilidade quanto à sua viabilidade celular, permitindo maior produção de unidades formadoras de colônias pela levedura, por um período de tempo mais longo (Figura 8).

Uma hipótese para o sucesso da incorporação de sulfato de amônio em meio de cultivo da levedura é que íons de amônio são transportados por um sistema ativo dependente de energia (ATP). Esse sistema de transporte aparenta ser a razão para a aceleração da respiração e fermentação de leveduras. Efeitos do íon de amônio sobre a reação fosfofrutoquinase 1 não podem ser descartados, porém, a concentração deste íon dentro da célula pode ter efeitos sobre as enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, como a glutamate-ammonia ligase. Outra razão para a aceleração do metabolismo poderia ser o aumento da taxa das vias biossintéticas (NIELSEN, 1997). Além do mais, de acordo com Broach (2012), a adição de amônio no cultivo de células de levedura resulta em alterações na transcrição, incluindo, a indução de genes necessários para o crescimento do microrganismo.

Além disso, o uso de sulfato de amônio 1% auxilia na ação antagonista de *A. pullulans* ACBL-77, como verificado nos ensaios *in vivo*, provavelmente, porque esta fonte de nitrogênio está relacionada com o aumento da produção de biofilme. Possivelmente, o biofilme otimiza a sobrevivência da levedura no sítio de infecção durante o armazenamento dos frutos cítricos. Esse é o primeiro relato de uma correlação positiva do aumento na produção de biofilme pela levedura, em função da fonte de nutriente, com conseqüente aumento da sua atividade antagonista contra *G. citri-aurantii*.

As observações de microscopia eletrônica de varredura mostraram que o tratamento com *A. pullulans* ACBL-77 causou prejuízos às hifas do patógeno. Verificou-se que, quando a levedura foi previamente cultivada em meio com adição de sulfato de amônio 1% e aplicada nos fermentos dos frutos, houve acúmulo de matriz extracelular e aglomeração de células de levedura em volta do fermento e, por conseguinte, ao redor das hifas (Figura 9). Além disso, provavelmente, a adição dessa fonte de nitrogênio facilitou a colonização rápida da levedura nos fermentos dos frutos, o que pode explicar os melhores resultados encontrados quando aplicou-se o ACBL-77, cultivado na presença de sulfato de amônio (1%), no favorecimento da sobrevivência da levedura em frutos cítricos. Após estudos em microscopia eletrônica, Lima et al. (2013) descreveram que a colonização e adesão das leveduras *Wickerhamomyces anomalus* e *Meyerozyma guilliermondii* em hifas de *Colletotrichum gloeosporioides*, ocorre por micoparasitismo dos antagonistas. Além disso, matrizes extracelulares de leveduras antagonistas podem lisar as hifas do fungo, aumentando a fonte de nutrientes disponível, como o carbono, que pode ser usado pelo próprio agente de controle biológico (Zhang et al., 2010).

Nos estudos sobre as possíveis alterações físico-químicas que aplicações de *A. pullulans* ACBL-77, cultivada em meio com ou sem adição de sulfato de amônio (1%), poderiam causar em frutos de laranja, notou-se que praticamente não houve diferença significativa entre os parâmetros avaliados, como rendimento de suco, teores de sólidos solúveis, acidez titulável e "ratio". Os resultados deste estudo corroboram com aqueles encontrados por Sangwanich, Sangchote e Leelasuphakul (2013) que ao aplicarem suspensões de *Pichia guilliermondii* combinados com bicarbonato de sódio em frutos de laranja, notaram que a levedura sozinha ou, em combinação com bicarbonato não prejudicou os parâmetros da qualidade dos frutos em condições comerciais, indicando potencial de comercialização para a cepa. Zhang et al. (2010) estudaram uma cepa de *A. pullulans* no controle de *Monilinia laxa* em pêssegos e notaram que além de reduzir a incidência da doença, as aplicações com a levedura não tiveram nenhum efeito significativo sobre a firmeza dos frutos, sólidos solúveis totais, ácido ascórbico, ou acidez titulável, em comparação com o controle depois de 21 dias de armazenagem a 1 °C e 96% de umidade relativa.

Os resultados encontrados neste estudo são importantes, pois, de acordo com Zhang et al. (2008) o uso de agentes de biocontrole que não prejudiquem os parâmetros físico-químicos da qualidade de frutas é uma das características para um antagonista ideal. Além do mais, apesar dos frequentes relatos do uso de cepas de *A. pullulans* para controle de doenças de pós-colheita em diversas culturas, este é o primeiro relato na literatura de estudo da interferência da levedura em parâmetros da qualidade em frutos cítricos.

Para entender melhor os mecanismos pelos quais *A. pullulans* controlou a podridão azeda em citros, investigaram-se os efeitos da aplicação da levedura sobre as atividades de enzimas relacionadas à defesa de citros. Segundo relatos de Xu et al. (2013), as plantas desenvolvem uma complexa variedade de eventos que envolvem a síntese e acúmulo de novas proteínas que têm ação direta ou indireta durante a patogênese e a resistência induzida pelo hospedeiro, que pode ser um dos mecanismos utilizado por leveduras para controlar doenças de plantas.

Nesse sentido, as plantas empregam um conjunto complexo de mecanismos físicos e de defesa para resistir ou evitar ataques bióticos. Além dos mecanismos de defesa constitutivos, como paredes secundárias espessas ou compostos tóxicos, as plantas também são equipadas com mecanismos de defesa induzíveis, entre os quais a ativação de um sistema de defesa bioquímico e estrutural altamente coordenado que ajuda a evitar a propagação de patógenos (ZHENG et al., 2011). De acordo com Pascholati (2011) e Lu et al. (2013), os compostos fenólicos e as enzimas como a peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia liase, estudadas no respectivo trabalho, são mecanismos envolvidos na resistência da planta e que podem ser induzidos por diversos motivos, como a infecção pelo fitopatógeno, ou pela aplicação de um agente de biocontrole.

Características fisiológicas dos frutos são relacionadas à presença de fenóis, como flavonoides e antocianinas, havendo relatos de aplicação direta em citros de alguns compostos exógenos, para manter a sua qualidade pós-colheita (SANZANI; SCHENA; IPPOLITO, 2014). Porém, iniciada a infecção do patógeno, pode haver aumento na síntese desses compostos, podendo ser tóxicos para o microrganismo ou até mesmo para a célula vegetal (AGRIOS, 2005). Este estudo demonstrou aumento

na atividade dos compostos fenólicos, quando amostras do tecido do fruto foram retiradas 48 horas após o tratamento com *A. pullulans* aplicada por pipetagem no local do ferimento. Segundo Reimers e Leach (1991), altas concentrações de compostos fenólicos em torno de ferimentos ou de áreas infeccionadas podem restringir ou enfraquecer o crescimento de patógenos.

A enzima peroxidase (POD) catalisa o último passo da biossíntese de lignina, e as altas atividades de POD estão associadas ao início da resistência induzida que envolve vários mecanismos importantes de defesa da planta, tais como lignificação e suberização (IPPOLITO et al., 2000). Segundo os autores, em condições de estresse sua atividade é geralmente potencializada e, neste contexto, quando os frutos foram tratados com *A. pullulans* através de pipetagem no ferimento, verificou-se aumento da atividade da enzima até 72 horas após a aplicação da levedura.

Com relação a polifeniloxidase (PPO), notou-se maior atividade enzimática em 48 horas após aplicação do ACBL-77 por pipetagem, com comportamento parecido a POD.

Estudos indicam que alteração na expressão gênica em ferimentos de frutos está relacionada com a resposta da aplicação de leveduras antagonistas (HERSHKOVITZ et al., 2012). Haja vista que a atividade de biocontrole está ligada à interação "levedura-patógeno-fruto", este estudo mostra que a indução de resistência, com o aumento da atividade enzimática de POD e PPO pode estar envolvida no mecanismo de controle de *G. citri-aurantii*, como já relatado por Guo et al. (2014), no qual a indução de resistência em citros causada por *Cryptococcus laurentii* a *P. digitatum* foi confirmada pela alteração na atividade dessas enzimas. Segundo Parafati et al. (2016) o aumento na atividade da POD em tangerina pode estar envolvido na eficiência de controle de *Metschnikowia pulcherrima* e *Wickerhamomyces anomalus* contra *P. italicum*. Ainda neste estudo, os autores utilizaram uma cepa de *A. pullulans* que não demonstrou atividade enzimática contrariando os resultados apresentados em nosso trabalho.

A enzima fenilalanina ammonia liase (PAL) catalisa a primeira reação na via geral dos fenilpropanóides, e é a primeira das enzimas envolvidas na deposição de paredes celulares de lignina (BALLESTER et al., 2013). Nesta pesquisa, a PAL

demonstrou o mesmo comportamento que a POD e a PPO, com maior atividade enzimática a partir de 48 horas, com maiores valores no tratamento com a levedura, aplicada por pipetagem (Tabela 28 e Figura 13). O mesmo foi relatado por Rühmann et al. (2013) que trataram cachos de uva com o *A. pullulans*, notando aumento da expressão gênica e da atividade enzimática de PAL. Ainda nesse sentido, em dados publicados por Xu et al. (2013) as atividades da POD e da PAL foram significativamente induzidas pelo tratamento com *Pichia caribbica* em pêssegos, contra *Rhizopus*, mostrando também melhor controle.

Em nossa pesquisa, frutos cítricos inoculados com *A. pullulans* apresentaram maiores níveis de compostos fenólicos, POD, PPO e PAL do que os frutos do tratamento testemunha, durante todo o período de armazenamento (Figura 14). Estes resultados sugerem que a indução de enzimas relacionadas com a defesa pode fazer parte do mecanismo de *A. pullulans* no controle de *G. citri-aurantii* em citros.

Além disso, os resultados deste trabalho mostram a importância da adição e do tipo de nutriente, quando da formulação de um bioproduto a base de *A. pullulans*, visando a sua utilização em escala comercial.

## 6. CONCLUSÕES

- a) A levedura *Aureobasidium pullulans*, isolado ACBL-77 exibe potencial para o controle de *Geotrichum citri-aurantii* em frutos cítricos e a incorporação e o tipo da fonte nutricional, durante o cultivo da levedura, são importantes para otimizar a atividade antagônica do microrganismo;
- b) Existe efeito benéfico entre o aumento da produção de biofilme pelo antagonista, em função da fonte de nutriente, com conseqüente aumento da sua atividade antagônica contra *Geotrichum citri-aurantii*;
- c) Aplicação de *Aureobasidium pullulans*, previamente cultivada em meio acrescido de sulfato de amônio (1%), favorece a sobrevivência da levedura em fermentos de frutos cítricos e provoca deformações nas hifas do fitopatógeno;
- d) A aplicação da levedura não altera a qualidade de frutos cítricos, mas aumenta as atividades de enzimas possivelmente envolvidas com a defesa dos frutos a patógenos.

## 7. REFERÊNCIAS

- ACHBANI, E.H., MOUNIR, R., JAAFARI, S., DOUIRA, A., BENBOUAZZA, J.M.H. Selection of antagonists of postharvest apple parasites: *Penicium expansum* and *Botrytis cinerea*. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 70, p. 143-149, 2005.
- ADIKARAM, N.K.B., JOYCE, D.C., TERRY, L.A. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mold of strawberry fruit. **Australasian Plant Pathology**, v. 31, p. 223–229, 2002.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press, 2005, 922p.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemical**, v.120, n. 4, p. 470-475, 1974.
- BAIS, H. P., FALL, R., VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134 p. 307-319, 2004.
- BALLESTER, A. R., LAFUENTE, M. T., FORMENT, J., GADEA, J., DE VOS, C. H. R., BOVY, A. G. Transcriptomic profiling of citrus fruit peel tissues reveals fundamental effects of phenylpropanoids and ethylene on induced resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 879–897, 2011.
- BALLESTER, A. R., LAFUENTE, M.T., DE VOS, R.C.H., BOVY, A.G., GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Citrus phenylpropanoids and defense against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. **Food Chemistry**, v. 136, p. 178–185, 2013.
- BAUDOIN, A.B., ECKERT, J.W. Factors influencing the susceptibility of lemon to infection by *Geotrichum candidum*. **Phytopathology**, v. 72, p. 1592–1597, 1982.
- BENCHEQROUN, S. K., BAJJI, M., MASSART, S., LABHILILI, M., JAAFARI, S. E., JIJAKLI, M. H. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. **Postharvest Biology and Technology**, v.46, p.128–135, 2007.

- BOATRIGT, J. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petúnia petal tissue. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1993-2011, 2004.
- BROACH, J.R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, v. 192, p. 73–105, 2012.
- BROWN, G. E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, v. 65, p. 404-409, 1975.
- BROWN, G.E. Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest decays of oranges. **Plant Disease**, v.72, p.906–908, 1988.
- BROWN, G.E. **Sour rot. Causal organism and disease cycle**. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Science Extension Service Fact Sheet pp. 137, 2003.
- BULMER, M.A., CATLEY, B.J., KELLY, P.J. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungi extracellular polysaccharide pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.25, p. 362–365, 1987.
- BUTLER, E.E., ECKERT, J.W. Taxonomy and physiological properties of fungus causing sour rot of citrus fruit. **Phytopathology**, v.52, p.1–5, 1962.
- BUTLER, E.E., FOGLE, D., MIRANDA, M. *Galactomyces citri-aurantii*, a newly found téléomorphe of *Geotrichum citri-aurantii* the cause of sour rot of citrus fruit. **Mycotaxonomy**, v. 33, v. 197-212, 1988.
- CANO, M.P., ANCOS, B. DE, MATALLANA, M.C., CÁMARA, M., REGLERO, G., TABERA, J. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v.59, n.3, p.411-419, 1997.
- CASTORIA, R., DE CURTIS, F., LIMA, G., CAPUTO, L., PACIFICO, S., DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. 22, p. 7–17, 2001.
- CERTIK, M., BREIEROVA, E., JURSIKOVA, P. Effect of cadmium on lipid composition of *Aureobasidium pullulans* grown with added extracellular polysaccharides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, p. 195–202, 2005.

- CHEN, H., FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes & Development**, v. 20, p. 1150–1161, 2006.
- CHEN, Y., YAN, F., CHAI, Y., LIU, H., KOLTER, R., LOSICK, R., GUO, J. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 848–864, 2013.
- CHENG, K., DEMIRCI, A., CATCHMARK, J. M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 29–44, 2011.
- CHERIF, M., ASSELIN, A., BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v. 84, p. 236–42, 1994.
- CHI, Z., WANG, F., CHI, Z., YUE, L., LIU, G., ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 793–804, 2009.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_12\\_12\\_09\\_53\\_25\\_bol\\_etim\\_de\\_laranja.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_12_09_53_25_bol_etim_de_laranja.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2016.
- CONRAD, M., SCHOTHORST, J., KANKIPATI, N., ZEEBROECK, G.V., RUBIO-TEXEIRA, M., THEVELEIN, J.M. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 254–299, 2014.
- CONSTABEL, C.P., BERGEY, D., RYAN, C.A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 407–411, 1995.
- COOKE, W.B. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. **Mycopathology and Mycology Applied**, v. 12, p. 1–45, 1959.
- COSTA, C. K. F.; MAIA, S. F.; SAMPAIO, L. M. B. Exportações brasileiras de suco de laranja e subsídios americanos: uma análise empírica de estratégias comerciais (1992-2006). **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.50, p.82-106, 2012.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

Di FRANCESCO, A., ROBERTI, R., MARTINI, C., BARALDI, E., MARI, M. Activities of *Aureobasidium pullulans* cell filtrates against *Monilinia laxa* of peaches. **Microbiological Research**, v.181, p.61–67, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DROBY, S., VINOKUR, V., WEISS, B., COHEN, L., DAUS, A., GOLDSCHMIDT, E.E., PORAT, R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v.92, p.393–399, 2002.

DROBY, S., WISNIEWSKI, M., EL-GHAOUTH, A. WILSON, C. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. **Postharvest Biology and Technology**, v. 27, p. 127–135, 2003.

DROBY, S., WISNIEWSKI, M., MACARISIN, D., WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p.137–145, 2009.

DUAN, X., YANG, Q.O., JING, G., TAO, N. Effect of sodium dehydroacetate on the development of sour rot on Satsuma mandarin. **Food Control**, v. 65, p. 8-13, 2016.

ECKERT, J.W., BROWN, G.E. Postharvest citrus diseases and their control. In: **Fresh Citrus Fruit** (ed. Wardowski,W.F., Nagy, S., Grierson, W.), Van Nostrand Reinhold, New York., 1986, p. 315–360.

EFSA, 2012. Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/2944.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2944.pdf). Acesso em: 12 out. 2016.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division, 2013. Disponível em <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Acesso em: 09 out. 2016.

FERRAZ, L.P., CUNHA, T., SILVA, A.L., KUPPER, K.C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188, p. 72–79, 2016.

- FILONOW, A. B., VISHNIAC, H. S., ANDERSON, J. A., JANISIEWICZ, W. J. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. **Biological Control**, v. 7, p.212-220, 1996.
- FINKEL, J.S., MITCHELL, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 109–118, 2011.
- FISCHER, I. H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de “packing house”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 304-310, 2007.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.
- FRANZEN, A. J.; SOUZA, W.; FARINA, M.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, p. 395-402, 1999.
- FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant pathology**, v. 37, p. 165-186, 1986.
- FUQUA, C., WINANS, S.C., GREENBERG, E.P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI Family of quórum-sensing transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 727-751, 1996.
- GAUR, R., SINGH, R., GUPTA, M., GAUR, M. K. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. **African Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 7989-7997, 2010.
- GRAY, K.M., GAREY, J.R. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quórum sensing regulators. **Microbiology**, v. 147, p. 2379-2387, 2001.
- GUETSKY, R., SHTIENBERG, D., ELAD, Y., DINOOR, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Biological Control**, v. 91, p. 621-627, 2001.
- GUO, J., FANG, W., LU, H., ZHU, R., LU, L., ZHENG, X., YU, T. 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, 2014.

- HAO, W., ZHONG, G., HU, M., LUO, J., WENG, Q., RIZWANUL-HAQ, M. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology and Technology**, v.56, p. 39–43, 2010.
- HERSHKOVITZ, V., BEN-DAYAN, C., RAPHAEL, G., PASMNIK-CHOR, M., LIU, J., BELAUSOV, E., ALY, R., WISNIEWSKI, M., DROBY, S. Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 338–349, 2012.
- HORNBY, J.M., JENSEN, E.C., LISEC, A.D., TASTO, J.J., JAHNKE, B., SHOEMAKER, R., DUSSAULT, P., AND NICKERSON, K.W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2982– 2992, 2001.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201609.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201609.pdf) . Acesso em: 10 out. 2016.
- IPPOLITO, A., EL GHAOUTH, A., WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, v.19, p.265–272, 2000.
- JIANG, L., WU, S., MOON KIM, J. Effect of different nitrogen sources on activities of UDPG-pyrophosphorylase involved in pullulan synthesis and pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v.86, p.1085– 1088, 2011.
- JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulations of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1349-1359, 1984.
- JUNG, W.J., JIN, Y.L., KIM, Y.C., KIM, K.Y., PARK, R.D., KIM, T.H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**. v. 30, p. 645–652, 2004.
- KARIM, H., BOUBAKER, H., ASKARNE, L., TALIBI, I., MSANDA, F., BOUDYACH, E.H., SAADI, B., AIT BEN AOUMAR, A. Antifungal properties of organic extracts of eight *Cistus* L. species against postharvest citrus sour rot. **Letters Applied in Microbiology**, v.1, p.16-22, 2015.

- KEFELI V. L, KADYROV, C.H. Natural growth inhibitors. **Annual Review of Plant Physiology**, Acad. Press, p. 185–196, 1971.
- KINAY, P., YILDIZ. M. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. **Biological Control**, v. 45, p. 433–440, 2008.
- KORSTEN, L., TAVERNER, P. Citrus. In: REES, D., FARRELL, G., ORCHARD, J. (EDS.), **Crop Post-Harvest: Science and Technology**, v.5, p. 43-79), 2009.
- KUPPER, K.C., CERVANTES, A.L.L., KLEIN, M.N., SILVA, A.C. 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, 2013.
- KURTZMAN, C.P., DROBY, S. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast effective for biocontrol of postharvest fruit rots. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 395–399, 2001.
- LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 468-473, 2003.
- LEITE, R.S.R., BOCCHINI, D.A., DA SILVA MARTINS, E., SILVA, D., GOMES, E., DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 281–288, 2007.
- LIMA, G., IPPOLITO, A., NIGRO, F., SALERNO, F. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 169–178, 1997.
- LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.1, 1999.
- LIMA, J.R., GONDIM, D.M.F., OLIVEIRA, J.T.A., OLIVEIRA, F.S.A., GONÇALVES, L.R.B., VIANA, F.M.P Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 83, p. 58–64, 2013.
- LISKER, N., COHEN, L., CHALUTZ, E., FUCHS, Y. Fungal infections suppress ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in grapefruit. **Physiological Plant Pathology**, v. 22, p. 331-338, 1983.

LIU, J., SUI, Y., WISNIEWSKI, M., DROBY, S., LIU, Y. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 153–160, 2013.

LIU, X., WANG, L.P., LI, Y.C., LI, H.Y., YU, T., ZHENG, X.D. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Journal Applied of Microbiology**, v.107, p.1450–1456, 2009.

LIU, X.; WANG, J.; GOU, P.; MÃO, C.; ZHU, Z-R.; LI, H. *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.1-2, p.223-229, 2007.

LU, L., LU, H., WU, C., FANG, W., YU, C., YE, C., SHI, Y., YU, T., ZHENG, X. *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.85, p. 196–202, 2013.

LUO, Y., ZENG, K., MING, J. Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses. **Science Horticulturae**, v. 135, p. 120–127, 2012.

MAIA, C. C. P. Produção de um agente de controlo biológico recorrendo a subprodutos da indústria agro-alimentar. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana). 2011, 82 f. Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011.

MARJAMAA, K., KUKKOLA, E., LUNDELL, T., KARHUNEN, P., SARANP, A.A. P., FAGERSTEDT, K.V. Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). **Tree Physiology**, v. 26, p. 605-611, 2006.

MCKAY, A. H., FÖSTER, H., ADASKAVEG, J. Distinguishing *Galactomyces citri-aurantii* from *G. geotrichum* and characterizing population structure of the two postharvest sour rot pathogens of fruit crops in California. **Phytopathology**, v. 102, p.528-538, 2012.

- MEKBIB, S.B., REGNIER, T.J.C., KORSTEN, L. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 233-240, 2011.
- METZGER, U., LANKES, U., HARDY, E.H., GORDALLA, B.C., FRIMMEL, F.H. Monitoring the formation of an *Aureobasidium pullulans* biofilm in a bead-packed reactor via flowweighted magnetic resonance imaging. **Biotechnology Letter**, v. 8, p. 1305–1311, 2006.
- MILES, L. A., LOPERA, C. A., GONZALEZ, S., CEPERO DE GARCIA, M. C., FRANCO, A. E., RESTREPO, S. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. **BioControl**, v. 57, p. 697–710, 2012.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Cultura de Citros. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>. Acesso em: 22 out. 2016.
- MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. In: LUZ, W. C. et al. (Orgs.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, 1998. p. 261-284.
- MOUNIR, R., DURIEUX, A., BODO, C., ALLARD, C., SIMON, J.P., ACHBANI, E.H., EL-JAAFARI, S., DOUIRA, A., JIJAKLI, M.H. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. **Biotechnology Letter**, v. 29, p. 553-559. 2007.
- NAKAZAWA, A., NOZUE, M., YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Phasbitis nil*. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 323-328, 2001.
- NANTAWANIT, N., CHANCHAICHAOVIVAT, A., PANIJPAN, B., RUENWONGSA, P. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. **Biological Control**, v.52, p.145–152, 2010.
- NATURDATA, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (1918) <http://naturdata.com/Aureobasidium-pullulans-38082.htm>. Acesso em: 04 nov. 2016.
- NEVES, M. F. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. In: NEVES, M. F. (Coord.). 1. ed. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p.

- NIELSEN, J. IN: Primary metabolism: transport of ammonia, sulfate and phosphate. In: **Physiological Engineering Aspects of *Penicillium chrysogenum***. World Scientific. 1997, 288p.
- O'TOOLE, G. A., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- PALOU, L., SMILANICK, J.L., CRISOSTO, C.H. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1037-1046, 2009.
- PARAFATI, L., VITALE, A., RESTUCCIA, C., CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, v. 47, p. 85-92. 2015.
- PARAFATI, L., VITALE, A., RESTUCCIA, C., CIRVILLERI, G. The effect of locust bean gum (LBG)-based edible coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. **Food Microbiology**, v. 58, p. 87-94, 2016.
- PARAWIRA, W. The status and trends in food, industrial and environmental biotechnology research in Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1377-1384, 2008.
- PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011, v. 1 p. 593- 636.
- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC e Fundag, p.37-60. 2005.
- PITT J.I., HOCKING A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Aspen Publishers Inc., Maryland. 1997, 593p
- 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**, 94: 594-554, 2003.

- POCIECHA, E., PŁAŻEK, A., JANOWIAK, F., ZWIERZYKOWSKI, Z., ABA level, proline and phenolic concentration, and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic *Festulolium* forms with contrasting resistance to frost and pink snow mould (*Microdochium nivale*). **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 73, p. 126–132, 2008.
- PU, L., JINGFAN, F., KAI, C., CHAO-NA, L., YUNJIANG, C. Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. **FEMS Yeast Research**, v.14, p.536–546, 2014.
- RAVELLA, S.R., QUIÑONES, T.S., RETTER, A., HEIERMANN, M., AMON, T., HOBBS, P.J. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymeres**, v.82, p. 728-732, 2010.
- READING, N.C., SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 254, p. 1-11, 2006.
- REED, J.B.; HENDRIX, JR., C.M.; HENDRIX, D.L. **Quality control manual for citrus processing plants**. Book I, Intercit Inc. Safety Harbor, Fla., 1986. 250p
- REES, D., FARRELL, G., ORCHARD, J. **Crop Post-Harvest: Science and Technology**, Perishables. John Wiley & Sons, 480 pp, 2012.
- REIMERS, P.J., LEACH, J.E. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene Xa-10 in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 38, p. 39–55, 1991.
- RÜHMANN, S., PFEIFFER, J., BRUNNER, P., SZANKOWSKI, I., FISCHER, T.C., FORKMANN, G., TREUTTER, D. Induction of stilbene phytoalexins in grapevine (*Vitis vinifera*) and transgenic stilbene synthase-apple plants (*Malus domestica*) by a culture filtrate of *Aureobasidium pullulans*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 62-71, 2013.
- SANGWANICH, S., SANGCHOTE, S., LEELASUPHAKUL, W. Biocontrol of citrus green mould and postharvest quality parameters. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 3381-3386, 2013.
- SANZANI, S.M., SCHENA, L., IPPOLITO, A. Effectiveness of phenolic compounds against citrus green mould. **Molecules**, v. 19, p. 12500-12508, 2014.

SAVASTANO, G., FAWCETT, H. S. A study of decay in citrus fruits produced by inoculations with known mixtures of fungi at different constant temperatures. **Journal of Agriculture Research**, v. 39, p. 163-198, 1929.

SBALCHEIRO, C C. Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). 2006, 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo, 2006.

SCHENA, L., NIGRO, F., PENTIMONE, I., LIGORIO, A., IPPOLITO, A. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, p. 209- 220, 2003.

SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicelular organisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 81-104, 1998.

SINGH, R., GAUR, R., BANSAL, S., BISWAS, P., PANDEY, P. K., JAMAL, F., TIWARI, S., GAUR, M. K. *Aureobasidium pullulans* - An Industrially Important Pullulan Producing Black Yeast. **International Journal of Current Microbiology Applied and Sciences**, v. 10, p. 605-622, 2015.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144-158, 1965.

SMITH, J.L., FRATAMICO, P.M., NOVAK, J.S. Quorum sensing: A primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1053–1070, 2004.

SPADARO, D. Dissecting the mechanisms of action of biocontrol agents to control postharvest diseases of fruit, In: Sherma, N. **Biological controls for preventing food deterioration: strategies for preventing food deterioration**. Wiley-Blackwell, pp. 69-85, 2014.

SPADARO, D., DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends Food Science and Technology**, v. 47, p. 39-49, 2016.

SWIFT, S., DOWNIE, J.A., WHITEHEAD, N.A., BARNARD, A.M.L., SALMOND, G.P.C., WILLIAMS, P. Quorum sensing as a population-density-dependent

determinant of bacterial physiology. **Advances in Microbial Physiology**, v. 45, p. 1999-270, 2001.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKESAKO, K., IKAI, K., HARUNA, F., ENDO, M., SHIMANAKA, K., SONO, E., NAKAMURA, T., KATO, I., YAMAGUCHI, H. Aureobasidins, new antifungal antibiotics: taxonomy, fermentation, isolation, and properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 44, p. 919–924, 1991.

TALIBI, I., ASKARNE, L., BOUBAKER, H., BOUDYACH, E.H., MSANDA, F., SAADI, B., AIT BEN AOUMAR, A. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. **Crop Protection**, v.35, p. 41-46, 2012.

THIPYAPONG, P., MELKONIAN, J., WOLFE, D.W., STEFFENS, J.C. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Science**, v. 167, p. 693–703, 2004.

TIMMER, L.M., BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases in citrus. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction* (ed. Pruski D., Freeman S. and Dickman M.B.). **American Phytopathological Society**, Eagan, MN, 2000, p. 300–316.

TOFFANO, L. Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 28., 2005, São Paulo. In: **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 31, p. 16-16, 2005.

USALL, J., TEIXIDÓ, N., ABADIAS, M., TORRES, R., CAÑAMAS, T., VIÑAS, I. Improving formulation of biocontrol agents manipulating production process. In: Prusky, D., Gullino, M. L. (Eds) **Postharvest Pathology**. Plant Pathology in the 21st century. Vol 2. Springer Science + Business Media, pp. 149-170, 2009.

VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VANCE, C.P., KIRK, T.K., SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259-288, 1980.

- VAUGHN, K.C., LAX, A.R., DUKE, S.O. Polyphenol oxidase: the chloroplast enzyme with no established function. **Physiology Plant**, v. 72, p. 659-665, 1988.
- VERO, S., GARMENDIA, G., GONZÁLEZ, M.B., GARAT, M.F., WISNIEWSKI M. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. **Biocontrol Science and Technology**. v. 19, p. 1033-1049, 2009.
- VIVEKANANTHAN, R., RAVI, M., RAMANATHAN, A., SAMIYAPPAN, R Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate defence against the anthracnose pathogen in mango. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 235–244, 2004.
- VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, p. 2–20, 2010.
- WAGNER, A., HETMAN, B., KOPACKI, M., JAMIOŁKOWSKA, A., KRAWIEC, P., LIPA, T. Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. **Acta Agrobotanica**, v. 66, p. 77–88, 2013.
- WALLING, L.L. Induced resistance: from the basic to the applied. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 445–447, 2001.
- WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York, Marcel Dekker, 2 ed., p. 431-530, 1994.
- WIYONO, S., SCHULZ, D.F., WOLF, G.A. 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, 2008.
- XU, B., ZHANG, H., CHEN, K., XU, Q., YAO, Y., GAO, H. Biocontrol of postharvest *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. **Current Microbiology**, v. 67, p. 255–261, 2013.
- YURLOVA, N. A., HOOG, G. S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 72, p. 141-147, 1997.
- YURLOVA, N.A., MOKROUSOV, I.V., DE HOOG, G.S. Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 57–63, 1995.

ZALAR, P., GOSTINCAR, C., HOOG, G.S., URŠIČ, V., SUDHADHAM, M., GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 21–38, 2008.

ZHANG, D., SPADARO, D., GARIBALDI, A., GULLINO, M.L. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. **Biological Control**, v.54, p. 172–180, 2010.

ZHANG, D., SPADARO, D., GARIBALDI, A., GULLINO, M.L. 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, 2011.

ZHANG, D., SPADARO, D., VALENTE, S., GARIBALDI, A., GULLINO, M.L. 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, 2012.

ZHANG, H., WANG, L., DONG, Y., JIANG, S., ZHANG, H., ZHENG, X. Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 167–171, 2008.

ZHAO, Y., WANG, R., TU, K., LIU, K. Efficacy of preharvest spraying with *Pichia guilliermondii* on postharvest decay and quality of cherry tomato fruit during storage. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 9613-9622, 2011.

ZHENG, Y., SHENG, J., ZHAO, R., ZHANG, J., LV, S., LIU, L., SHEN, L. Preharvest L-Arginine treatment induced postharvest disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6543–6549, 2011.