

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE LEVEDURAS
ENVOLVIDOS NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-
COLHEITA EM CITROS

Luriany Pompeo Ferraz

Bióloga

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE LEVEDURAS
ENVOLVIDOS NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-
COLHEITA EM CITROS**

Luriany Pompeo Ferraz

Orientadora: Profa. Dra. Katia Cristina Kupper

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

2014

Ferraz, Luriany Pompeo
F381e Estudo dos mecanismos de ação de leveduras envolvidos no
biocontrole de doenças de pós-colheita em citros / Luriany Pompeo
Ferraz. – Jaboticabal, 2014
x, 91 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Katia Cristina Kupper
Banca examinadora: Maria Ines Tiraboschi Ferro, Sandra Regina
Ceccato Antonini
Bibliografia

1. *Citrus spp.* 2. *Geotrichum candidum*. 3. *Penicillium digitatum*. 4.
P. italicum. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 632.9:634.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento
da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE LEVEDURAS ENVOLVIDOS NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM CITROS

AUTORA: LURIANY POMPEO FERRAZ

ORIENTADORA: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

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

Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER
Instituto Agrônomo de Campinas / Cordeirópolis/SP

Profa. Dra. MARIA INES TIRABOSCHI FERRO
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Universidade Federal de São Carlos / Araras/SP

Data da realização: 21 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LURIANY POMPEO FERRAZ – Nascida em 01 de maio de 1990 em Descalvado, SP. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em Fevereiro de 2008 no Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, na cidade de Araras, SP, concluindo seu bacharelado e licenciatura em dezembro de 2011. Durante a graduação, estagiou no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, SP, foi bolsista de iniciação científica do CNPq-PIBIC, atuando na área de Controle de Qualidade e Pós-Colheita de citros, sob a orientação da Profa. Dra. Lenice Magali do Nascimento. Em março de 2012 ingressou no curso de Pós- graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Katia Cristina Kupper, como bolsista Capes, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP.

Epígrafe

Dever de Sonhar

“Eu tenho uma espécie de dever, dever de sonhar, de sonhar sempre, pois sendo mais do que um espetáculo de mim mesmo, eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso. E, assim, me construo a ouro e sedas, em salas supostas, invento palco, cenário para viver o meu sonho entre luzes brandas e músicas invisíveis”.

(Fernando Pessoa)

Dedico

A minha mãe **Maria Lucia**, exemplo de mulher, caráter, decência, dignidade e simplicidade. Você me ensinou as lições de vida mais importantes e estarão sempre presentes no meu coração.

Ofereço

A meu pai **Daltayr**, por ser um grande exemplo de generosidade e por todo amor e carinho recebido todos esses anos.

A minha irmã **Lenita** pela paciência, amizade e amor, serei eternamente grata em ter você na minha vida.

A meu namorado **Diego** pela confiança e cumplicidade de estar do meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por **DEUS** e a **Santa Bakhita**, já que Eles colocaram pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria conseguido.

A meus pais, **Maria Lucia** e **Daltayr**, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser a melhor, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional e por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

A minha irmã, **Lenita**, minha caçulinha, meu agradecimento especial, pois, do seu modo, sempre se orgulhou de mim e confiou em meu trabalho. Obrigada pela confiança, pela ajuda, pela paciência e por estar do meu lado!

A meu namorado **Diego**, por ser tão importante na minha vida durante todos esses anos. Sempre me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Obrigada pelo seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor.

A meus tios, tias, primos e primas, especialmente, para as minhas madrinhas, **Nilza e Marcia**, meu padrinho **Odecio** e meus sogros, **Ana Maria e Jorge**, que vibraram comigo, desde a aprovação na prova, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito. Obrigada pela força!

A minha orientadora **Dra. Katia Cristina Kupper**, que acreditou no meu potencial, sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado, para absorver cada vez mais conhecimentos e experiências. Você não foi somente orientadora, mas também, conselheira, confidente, e amiga. Obrigada por tudo!

A minha amiga de infância e de todos os momentos, **Aline**, por se preocupar comigo e mesmo com a distância estar sempre presente. As minhas amigas de sempre, **Carol, Marylia e Jaqueline Rosa**, que sempre torceram por mim e me mandam sempre energias positivas. Obrigada meninas!

Aos anjos que foram aparecendo na minha vida durante a faculdade e que serei eternamente grata por todo carinho, atenção e por toda ajuda. Vocês fizeram toda a diferença, e tenho certeza que foi Deus quem colocou vocês no meu caminho, muito obrigada, **Aline (Fé), Tatiane, Camila Barbato, Marcella Buzo, Marcela Mourão, Vanessa Forner, Fernanda, Priscila, Mariana e Amanda.** Obrigada também as minhas companheiras de apartamento, **Vivian, Camila Martins, Flavia, Natália, Luciana e Sheila** vocês compartilharam comigo meus melhores e piores momentos, se tornando a minha família quando eu estava longe de casa.

A todos os meus amigos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, em especial a **Aline (Fé), Tatiane, Pitt e Mariana,** pessoas que fizeram toda a diferença na minha pesquisa, me ajudaram muito e contribuíram muito para a realização desse trabalho. **Willian, Gilmar, Larissa, Maria Carolina,** obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar e me aguentarem na correria do dia-a-dia. Obrigada também à **Carime, Andréia, Vanessa, Jéssica e Eleonore.** Juntos formamos uma grande equipe na qual fui muito feliz trabalhando com todos vocês.

A todos os meus amigos do Laboratório de Qualidade e Pós-Colheita de Citros, em especial a pesquisadora **Dra. Lenice,** que me inseriu na vida acadêmica e que me ensinou a realizar meus primeiros experimentos. E a todos que passaram por lá, deixando uma marquinha especial: **Maria Gabriela, Marcella, Fernanda, Carol, Jessie, Pedro, Jaqueline, Mônica, Paulo, Rafael, Fabiano, Felipe, Julio, Cassiano e Mayara.**

Ao centro de **Citricultura Sylvio Moreira** por me acolher há mais de cinco anos, e disponibilizar os laboratórios para que eu pudesse realizar meus experimentos. Aos demais amigos e funcionários do Centro de Citricultura, em especial a **Camila, Evandro, Lilian, Francisco e Salete,** que tornaram os meus dias mais divertidos. A **Karina, Fernando, Alvaro, Leonardo, Dr. Marcos, Rodrigo Latado, Vivian, Valéria, Nadji, Isabel, Nidelce, Rose, Silvani, Cida, Marines, Genésio, Spinelli e Socorro,** pela disponibilidade, simpatia e gentileza. Obrigada pela ajuda!

A **Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP- Jaboticabal,** por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era o meu mestrado e me

proporcionar conhecer pessoas especiais, que em pouco tempo se tornaram grandes amigas, muito obrigada. **Rosmeriana, Aline Ferreira, Nayara, Maria Laura e Leilaine**, nunca me esquecerei de vocês. Obrigada também ao técnico de laboratório **Assis**, pela amizade e por me ensinar minhas primeiras técnicas em microbiologia.

A Profa. Dra. **Sandra C. Antonini** e a colega **Ana Paula Bassi**, da Ufscar de Araras e ao Prof. Dr. **Mauricio Bacci Junior** e ao colega **Alexandre F. Somerada**, da Unesp de Rio Claro, pela disponibilidade e atenção em me ensinarem e auxiliarem em alguns testes da minha dissertação, muito obrigada!

A Banca examinadora pelas sugestões no trabalho, Profa. Dra. **Sandra C. Antonini** e Profa. Dra. **Maria Ines Tiraboschi Ferro**.

Agradeço, também, a **CAPES** pelo apoio financeiro, no estudo.

Ninguém vence sozinho...

OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA TABELAS	ix
LISTA FIGURAS.....	x
1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1. Doenças de pós-colheita em frutos cítricos.....	3
3.1.1. Podridão Azeda dos frutos cítricos (<i>Geotrichum candidum</i>)	3
3.1.2. Bolor verde dos frutos cítricos (<i>Penicillium digitatum</i>).....	4
3.1.3. Bolor azul dos frutos cítricos (<i>Penicillium italicum</i>).....	5
3.2. Controle.....	5
3.2.1. Controle Biológico por leveduras	7
3.3. Mecanismos de ação empregados no biocontrole	8
3.3.1. Produção de enzimas hidrolíticas.....	9
3.3.2. Competição por nutrientes.....	10
3.3.3. Produção de toxina <i>killer</i>	11
3.3.4. Indução de Resistência.....	12
3.3.5. Micoparasitismo.....	13
3.3.6. Produção de sideróforos.....	13

3.3.7. Produção de antibiótico.....	14
4. REFERÊNCIAS.....	15
2. CAPÍTULO 2 - MECANISMOS DE AÇÃO DE LEVEDURAS ENVOLVIDOS NO BIOCOTROLE DE <i>Geotrichum candidum</i> , AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO AZEDA EM FRUTOS CÍTRICOS	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. Microrganismos.....	27
2.2. Produção de compostos antifúngicos	27
2.2.1. Produção de compostos antifúngicos voláteis	27
2.2.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura.	28
2.2.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis	29
2.3. Detecção da atividade <i>killer</i>	29
2.4. Competição por nutrientes	30
2.5. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo	30
2.6. Produção de enzimas hidrolíticas	31
2.6.1. Preparo da Parede Celular.....	31
2.7. Atividade enzimática	32
2.7.1. Determinação de açúcares redutores	32

2.7.2. Determinação da atividade enzimática de β -1,3 glucanase	32
2.7.3. Determinação da atividade enzimática de quitinase	33
2.8. Análises Estatísticas	33
3. RESULTADOS.....	34
3.1. Produção de compostos antifúngicos.....	34
3.1.1 Produção de compostos antifúngicos voláteis	34
3.1.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células	34
3.1.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis	35
3.2. Detecção da atividade <i>killer</i>	37
3.3. Competição por nutrientes	37
3.4. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo.....	39
3.5. Produção de enzimas hidrolíticas	40
4. DISCUSSÃO	40
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS.....	44
3. CAPÍTULO 3 - MECANISMOS DE AÇÃO DE <i>Saccharomyces</i> sp. E <i>Meyerozyma</i> <i>caribbica</i> ENVOLVIDOS NO BIOCONTROLE DE <i>Penicillium</i> <i>digitatum</i>	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50

2.1. Microrganismos	50
2.2. Produção de compostos antifúngicos	51
2.2.1. Produção de compostos antifúngicos voláteis	51
2.2.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura.	51
2.2.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis	52
2.3. Detecção da atividade <i>killer</i>	52
2.4. Competição por nutrientes	53
2.5. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo	53
2.6. Produção de enzimas hidrolíticas	54
2.6.1. Preparo da Parede Celular.....	54
2.7. Atividade enzimática	55
2.7.1. Determinação de açúcares redutores	55
2.7.2. Determinação da atividade enzimática de β -1,3 glucanase	55
2.7.3. Determinação da atividade enzimática de quitinase	56
2.8. Análises Estatísticas	56
3. RESULTADOS	57
3.1. Produção de compostos antifúngicos.....	57
3.1.1 Produção de compostos antifúngicos voláteis	57
3.1.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células	57
3.1.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis	58
3.2. Detecção da atividade <i>killer</i>	59

3.3. Competição por nutrientes	60
3.4. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo.....	62
3.5. Produção de enzimas hidrolíticas	62
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	66
6. REFERÊNCIAS.....	66
4. CAPÍTULO 4 - MODO DE AÇÃO DE <i>Candida stellimalicola</i> ENVOLVIDO NO BIOCONTROLE DE <i>Penicillium italicum</i> , AGENTE CAUSAL DO BOLOR AZUL EM FRUTOS CÍTRICOS.....	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1. Microrganismos.....	73
2.2. Produção de compostos antifúngicos	73
2.2.1. Produção de compostos antifúngicos voláteis	73
2.2.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura	74
2.2.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis	74
2.3. Detecção da atividade <i>killer</i>	75
2.4. Competição por nutrientes	75
2.5. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo.....	76

2.6. Produção de enzimas hidrolíticas	76
2.6.1. Preparo da Parede Celular.....	77
2.7. Atividade enzimática	77
2.7.1. Determinação de açúcares redutores	77
2.7.2. Determinação da atividade enzimática de β -1,3 glucanase	78
2.7.3. Determinação da atividade enzimática de quitinase	78
2.8. Análises Estatísticas	79
3. RESULTADOS.....	79
3.1. Produção de compostos antifúngicos.....	79
3.1.1 Produção de compostos antifúngicos voláteis	79
3.1.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células	80
3.1.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis	81
3.2. Detecção da atividade <i>killer</i>	81
3.3. Competição por nutrientes	83
3.4. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo.....	84
3.5. Produção de enzimas hidrolíticas	85
4. DISCUSSÃO	86
5. CONCLUSÃO	88
6. REFERÊNCIAS.....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE LEVEDURAS ENVOLVIDOS NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM CITROS

RESUMO - Dada à importância econômica e social que a citricultura representa para o país, e em particular, para o estado de São Paulo, as plantas cítricas podem ser afetadas por vários agentes fitopatogênicos que, agindo isoladamente, ou em conjunto, sob condições favoráveis, podem tornar-se limitantes à produção em várias regiões produtoras. Dentre tais agentes fitopatogênicos destacam-se *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, responsáveis pelas doenças podridão azeda, bolor verde e bolor azul, respectivamente, que ocorrem na pós-colheita em citros. O método mais efetivo de controle destas doenças é o químico, porém, alternativas de controle são necessárias, de forma a diminuir os riscos ambientais e à saúde humana, em decorrência do uso indiscriminado de fungicidas. Dentre os métodos alternativos, o controle biológico tem emergido como um dos mais promissores para controle de doenças na pós-colheita. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de ação de 24 isolados de leveduras que apresentam potencialidade de controle da podridão azeda e de bolores em frutos cítricos. Nosso estudo sugere que os múltiplos modos de ação, como apresentado pela maioria dos isolados de leveduras testados, como produção de enzimas hidrolíticas (quitinase e β -1,3-glucanase), atividade *killer* e inibição da germinação de conídios do fitopatógeno, foram importantes para o potencial de controle de *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum* e *P. italicum*. Todos os isolados de leveduras apresentaram atividade *killer*, indicando ser esse o mecanismo de ação comum adotado pelos isolados no biocontrole.

“Palavras-chave”: *Citrus* spp., *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*

MECHANISM OF ACTION STUDY OF YEAST BIOCONTROL WRAPPED IN POST-HARVEST IN CITRUS

Abstract – Because of the economic and social importance that citrus industry represent to the country, and in particular to the state of São Paulo, citrus plants can be affected by several pathogenic agents , acting alone or together , under favorable conditions may make limiting the production in some production areas. Among these pathogenic agents have more importance *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* and *Geotrichum candidum*, responsible for diseases that occurring in the post - harvest citrus. The most effective method of controlling these diseases is by means of chemical control, but control alternatives are needed in order to reduce environmental and human health risks due to the indiscriminate use of fungicides. Among the alternative methods, biological control has emerged as one of the most promising for disease control. So the present study was to evaluate the mechanisms of action of 24 yeast isolates that have potential for control of sour rot and mold in citrus fruits. Our study suggests that multiple modes of action, as shown by the majority of yeast isolates tested, which showed production of hydrolytic enzymes (chitinase and β -1,3-glucanase), *killer* activity and inhibition of conidial germination of the pathogen were important for the potential control of *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. All yeast isolates showed *killer* activity, indicating that this is the common mechanism adopted by the biocontrol isolates.

“Keywords”: *Citrus* spp., *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Página
Tabela 1. Atividade <i>killer</i> dos isolados de leveduras em relação à levedura sensível <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006 em meio YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5	37
Tabela 2. Tamanho (cm) da colônia de <i>Geotrichum candidum</i> , retirado da zona de antagonismo, da região mediana da interação e longe da levedura, após cultivo pareado entre o patógeno e os agentes de controle biológico.....	39
Tabela 3. . Produção de quitinase e β -1,3-Glucanase por isolados de leveduras, avaliada através da produção de açúcar redutor.....	40
 Capítulo 3	
Tabela 1. Atividade <i>killer</i> dos isolados de leveduras em relação à levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 em meio YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5.	59
Tabela 2. Tamanho (cm) da colônia de <i>Penicillium digitatum</i> , retirado da zona de antagonismo, da região mediana da interação e longe da levedura, após cultivo pareado entre o patógeno e os agentes de controle biológico.....	62
Tabela 3. . Produção de quitinase e β -1,3-Glucanase por isolados de leveduras, avaliada através da produção de açúcar redutor.....	63
 Capítulo 4	
Tabela 1. Atividade <i>killer</i> dos isolados de leveduras em relação à levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 em meio YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5.	82
Tabela 2. Tamanho (cm) da colônia de <i>Penicillium italicum</i> , retirado da zona de antagonismo, da região mediana da interação e longe da levedura, após cultivo pareado entre o patógeno e os agentes de controle biológico.....	84
Tabela 3. . Produção de quitinase e β -1,3-Glucanase por isolados de leveduras, avaliada através da produção de açúcar redutor.....	85

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Página
Figura 1. Tamanho da colônia de <i>Geotrichum candidum</i> sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	34
Figura 2. Tamanho da colônia de <i>Geotrichum candidum</i> sob influência de compostos antifúngicos livres de células produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	35
Figura 3. Tamanho da colônia de <i>Geotrichum candidum</i> sob influência de compostos antifúngicos termoestáveis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	35
Figura 4. Atividade <i>killer</i> do ACBL-23 mostrando a zona clara (inibição da levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (A). Atividade <i>Killer</i> do ACBL-77 mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (B).	37
Figura 5. Porcentagem de conídios não germinados do fungo <i>Geotrichum candidum</i> sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	38
Figura 6. Porcentagem de conídios não germinados do fungo <i>Geotrichum candidum</i> sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	38
Capítulo 3	
Figura 1. Tamanho da colônia de <i>Penicillium digitatum</i> sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias	

seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	57
Figura 2. Tamanho da colônia de <i>Penicillium digitatum</i> sob influência de compostos antifúngicos livres de células produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	58
Figura 3. Tamanho da colônia de <i>Penicillium digitatum</i> sob influência de compostos antifúngicos termoestáveis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	58
Figura 4. Atividade <i>killer</i> do ACBL-80 mostrando a zona clara (inibição da levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (A). Atividade <i>Killer</i> do ACBL-81 mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (B).	60
Figura 5. Porcentagem de conídios não germinados do fungo <i>Penicillium digitatum</i> sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 26 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	61
Figura 6. Porcentagem de conídios não germinados do fungo <i>Penicillium digitatum</i> sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 26 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	61

Capítulo 4

Figura 1. Tamanho da colônia de <i>Penicillium italicum</i> sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	80
Figura 2. Tamanho da colônia de <i>Penicillium italicum</i> sob influência de compostos antifúngicos livres de células produzidos pelos diferentes isolados de leveduras.	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	80
Figura 3. Tamanho da colônia de <i>Penicillium italicum</i> sob influência de compostos antifúngicos termoestáveis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	81
Figura 4. Atividade <i>killer</i> do ACBL-04 mostrando a zona clara (inibição da levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (A). Atividade <i>Killer</i> do ACBL-05 mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (B).	82
Figura 5. Porcentagem de conídios não germinados do fungo <i>Penicillium italicum</i> sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 22 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	83
Figura 6. Porcentagem de conídios não germinados do fungo <i>Penicillium italicum</i> sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 22 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	83

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país. O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e consegue incríveis 85% de participação no mercado mundial. A citricultura gera, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões (NEVES, 2010).

Não obstante a importância econômica e social que representa a citricultura para o país, este setor enfrenta vários problemas de natureza fitossanitária. Dentre tais problemas, destacam-se as doenças de pós-colheita.

As doenças que ocorrem na fase de pós-colheita normalmente são iniciadas no campo e se desenvolvem durante a colheita, transporte, embalagem e armazenamento. De um modo geral, os produtos mais tenros e suculentos, como os frutos, apresentam maior suscetibilidade ao ataque de fungos causadores de doenças, isto por apresentarem, na maioria dos casos, uma grande disponibilidade de água e nutrientes (AGRIOS, 2005).

As podridões constituem-se a principal causa de danos pós-colheita em citros e se expressam desde a colheita até seu uso pelo consumidor. A porcentagem de frutos cítricos com podridões que ocorrem em uma safra varia de 3 a 6% (PALOU et al., 2001), entretanto, sob condições favoráveis aos fitopatógenos perdas consideráveis em pós-colheita podem ocorrer, atingindo 50% no período de comercialização de laranja (ECKERT, 1993).

Dentre as doenças de pós-colheita, destacam-se os bolores dos frutos cítricos, causados por *Penicillium digitatum* e *P. italicum* e a podridão azeda, causada por *Geotrichum candidum*. Tais patógenos diminuem a qualidade e a quantidade dos frutos de citros, bem como prejudicam os valores nutricionais e de mercado. Essas doenças podem ser prevenidas por meio de uma colheita cuidadosa, de forma a minimizar a produção de injúrias nos tecidos dos frutos.

A restrição ao uso de fungicidas, devido à fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação e obtenção de linhagens resistentes pelo patógeno, têm levado à procura de métodos alternativos de controle, tais como, uso de biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais (CARRÉ et al., 2002). Os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores para uma utilização prática no controle de fitopatógenos em diversas culturas (FRANCO; BETTIOL, 2000; BENATO et al., 2002; CARRÉ et al., 2002; KUPPER et al., 2013 e MORETTO et al., 2014).

Fungicidas, como o sódio-o-fenilfenato, tiabendazol e imazalil são comumente utilizados para o controle de doenças de pós-colheita em citros, assim como outros compostos, como o diclora, difenil e vapores de acetaldeído que são usados como tratamentos complementares, aplicados em envelopes durante o transporte e armazenamento. Estes compostos emitem substâncias voláteis que são capazes de impedir o crescimento de um grande número de microrganismos. O surgimento de linhagens de patógenos resistentes ao tratamento químico bem como as dificuldades decorrentes da implementação de protocolos que garantam a segurança do uso destes produtos, têm tornado cada vez mais problemático o emprego destas substâncias (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002; MERCIER; SMILANICK, 2005). Neste enfoque, existem, ainda, problemas relacionados à poluição ambiental e de saúde pública, que estes compostos notoriamente ocasionam, principalmente, devido às suas propriedades carcinogênicas.

Muitos pesquisadores têm demonstrado a eficácia do controle biológico em diferentes interações entre antagonistas e fitopatógenos. Espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de controle biológico para controle de diferentes fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, agente causal do bolor cinzento em uvas e morangos; de *P. digitatum* em uvas; de *P. italicum* e *P. digitatum* em frutos de laranja; de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Alternaria* em tomate e dos fungos *B. cinerea* e *Rhizopus*, causadores de doenças pós-colheita em maçãs (JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998; MASIH et al., 2001; KUPPER et al., 2013; MORETTO et al., 2014).

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de ação de isolados de leveduras, obtidos do filoplano de plantas cítricas, no controle de doenças de pós-colheita de citros e, que em ensaios prévios mostraram ser eficientes no biocontrole de *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum* e *P. italicum*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Doenças de Pós-colheita em frutos cítricos

3.1.1. Podridão azeda dos frutos cítricos (*Geotrichum candidum*)

A podridão azeda é causada pelo fungo leveduriforme *Geotrichum candidum*. Este fitopatógeno pode ser denominado como *G. candidum* var. *citri-aurantii* (Ferraris) Cif. & F. Cif. sendo esta variedade denotada pela capacidade do fungo em infectar frutas cítricas e crescer em baixos valores de pH (<2,7); *Galactomyces citri-aurantii* (Ferr.) Butler morfologicamente semelhante a *G. candidum*; ou *G. candidum* citrus race variedade denotada pela capacidade do fungo em infectar frutos cítricos. O fungo é comumente encontrado em solos e na superfície de frutos de citros, e assim como fungos ascomicetos, a fase telemórfica do fitopatógeno (*Endomyces geotrichum*) não é comumente observada em solos ou em frutos infectados (BUTLER et al., 1988; FENG et al., 2011; MCKAY et al., 2012).

A podridão azeda dos frutos cítricos está disseminada em todos os países produtores, afetando todas as espécies de cultivares. As variedades de tangerinas geralmente desenvolvem a doença mais rapidamente do que variedades de laranjas ou grapefruits (BROWN, 1979).

A infecção desses frutos ocorre através de ferimentos e lesões que se estendem para o albedo, sendo a podridão mais prevalente em condições favoráveis (25-30 °C e umidade elevada) e na fase de maturação. Os sintomas iniciais da podridão azeda são semelhantes aos dos bolores verde e azul. A lesão aparece pela

primeira vez encharcada de água, de coloração amarelo-escura. A cutícula é facilmente deslizada na epiderme formando camadas enrugadas com subsequente cobertura do micélio branco ou creme, sendo que o fungo degrada o fruto completamente em quatro ou cinco dias, em uma massa viscosa, frequentemente associada ao bolor verde, e até mesmo estimulada por sua presença (SUPRAPTA et al., 1995; BROWN, 2003; TOURNAS, 2005; LIU et al., 2009; PALOU et al., 2009).

3.1.2. Bolor verde dos frutos cítricos (*Penicillium digitatum*)

Os bolores são os principais causadores de doenças de pós-colheita dos citros, em particular o bolor verde, causado por *Penicillium digitatum*, um patógeno frequente em frutos na pós-colheita de citros no Brasil (FEICHTENBERGER et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2005). A ocorrência desta doença depende das condições climáticas e da forma de manipulação dos frutos, desde a colheita até o consumo, podendo a doença ocorrer durante o transporte e armazenamento dos frutos cítricos.

O fungo *P. digitatum* (Pers.) Sacc. 1881 é um ascomiceto pertencente à ordem dos Eurotiales, sobrevivendo saprofiticamente em pomares e outros ambientes na forma de conídios, que são disseminados pelo vento, atingem a superfície dos frutos, penetrando pelos ferimentos. Dessa forma, os frutos são afetados no campo, em fase final de maturação.

Os conídios de *P. digitatum* são hialinos, constituídos por uma única célula, de formato globoso a ovoide, apresenta tamanho que pode variar de 4 a 7 μM x 6 a 8 μM . Em geral, os conídios são produzidos em cadeia (catenulados), contendo pigmentos verdes que dão uma cor característica às colônias em meio de cultura. Os conidióforos são simples com terminação penicilada (em forma de pincel, *Penicillus* = pincel em latim), terminando num grupo de fiálides. As hifas são septadas e colonizam o substrato, liberando enzimas, que atuam na decomposição das substâncias mais complexas, tornando-as assimiláveis, provocando assim a podridão nos frutos. A fase perfeita desse fungo é rara na natureza (BERGAMIM FILHO et al. 1995; LARANJEIRA et al., 2002).

A ocorrência da doença depende muito das condições climáticas e da forma de manipulação dos frutos, desde o pomar até o consumidor. Os frutos, depois de infectados, têm o período de armazenamento reduzido, pela formação de etileno, que acelera o processo de maturação, diminuindo a vida de prateleira. (LARANJEIRA et al., 2005).

3.1.3. Bolor azul dos frutos cítricos (*P. italicum*)

O bolor azul, causado pelo fungo *P. italicum* é menos prevalente que o bolor verde. O fungo pode crescer lentamente em baixas temperaturas e causa o apodrecimento após longos períodos de armazenamento em câmara fria. O ciclo da doença e os sintomas do bolor azul são similares ao bolor verde. O fungo causa podridão mole, e o micélio branco é formado quando as lesões atingem de 2-6 cm de diâmetro, com esporos de coloração azul, os quais são produzidos no centro das lesões. As lesões do bolor azul diferem das ocasionadas pelo *P. digitatum* por possuir uma faixa de micélio branca em torno da área de esporulação, cercada de uma faixa definida de massa aquosa na casca dos frutos (PLAZA et al., 2003). O crescimento ótimo para *P. italicum* ocorre entre 22-24 °C, entretanto em temperaturas abaixo de 10 °C ele pode predominar sobre o *P. digitatum* (TIMER et al., 2000).

3.2. Controle

Vários cuidados podem ser adotados para reduzir as perdas com doenças em pós-colheita, destacando-se a modificação de práticas de manuseio que danificam a superfície da fruta, o que pode diminuir os riscos de infecções iniciadas por ferimentos (JOHNSON; HEATHER, 1995). O controle químico tem sido associado a outros métodos que potencializam a eficiência de controle, destacando-se o uso da refrigeração, tratamentos térmico, radiação, atmosfera controlada e modificada (ZAMBOLIM et al., 2002).

A refrigeração é o principal método para a manutenção da qualidade das frutas na pós-colheita, sendo efetiva por reduzir os processos metabólicos

envolvidos na maturação (ação das enzimas degradativas e oxidativas) (BARKAI-GOLAN, 2001; KADER, 2002).

O tratamento térmico tem apresentado eficiência principalmente no controle de patógenos que apresentam esporos localizados na superfície da casca e em infecções presentes nas primeiras camadas celulares das frutas (SILVERIA, 2005).

Radiações gama e ultra-violeta (UV-C) estão sendo empregadas para o controle de doenças em pós-colheita para frutas de consumo “in natura”, especialmente abacate, citros, uva, morango, pêsego, maçã e nectarina, antes ou após o armazenamento, apresentando poder de induzir resposta de resistência na fruta, além de atuar sobre vários patógenos (NIGRO et al., 2000; NEVES et al., 2002; PASCHOLATI et al., 2004).

A utilização da atmosfera controlada e modificada pode reduzir os processos bioquímicos de maturação e senescência, evitando o desenvolvimento das podridões. Tratamentos utilizando altos níveis de dióxido de carbono por um período de tempo têm mostrado eficiência no aumento dos níveis de componentes antifúngicos, reduzindo o desenvolvimento da doença (PRUSKY et al., 1991; MARI; GUIZZARDI, 1998).

O controle químico tem se mostrado o método mais eficiente na redução de infecções fúngicas. Os fungicidas de contato (ortofenilfenol e dióxido de enxofre) ou sistêmico (tiabendazol e imazalil) são os mais utilizados para o controle para os patógenos de pós-colheita. Os fungicidas sistêmicos garantem maior proteção das frutas durante o período de armazenamento, agindo sobre patógenos causadores de infecção latente, inativando esporos de patógenos associados a fermentos e protegendo a superfície das frutas (BENATO, 1999; ZAMBOLIM et al., 2002).

Para a obtenção de um sucesso mínimo na redução de prejuízos na pós-colheita, se faz primordial a adoção de medidas de controle que conciliem a produção, a proteção do meio ambiente e a preservação da saúde humana. Em geral, as medidas se iniciam no campo com as práticas culturais, nutrição das plantas, podas, remoção do inóculo, controle químico, colheita das frutas nos estádios adequados de maturação e, continuam durante o armazenamento, por meio de cuidados com o manuseio, com a temperatura, umidade relativa, atmosfera controlada, termoterapia e a quimioterapia (CAPPELINE; CEPONIS, 1984).

3.2.1. Controle Biológico por leveduras

De acordo com Cook e Baker (1983), o controle biológico é a redução da soma de inóculo ou atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem. De acordo com Lima et al. (2000), o controle biológico tem como premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas, associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis.

Na pós-colheita, o controle biológico pode substituir totalmente ou atuar em associação com os produtos químicos, tornando a produção de alimentos mais sustentável e ecológica. Os testes para o uso dessa tecnologia ainda se concentram, principalmente, nos laboratórios de pesquisa, no entanto, é possível encontrar no mercado empresas interessadas em desenvolver produtos biológicos para o controle de doenças em frutas e vegetais no período de pós-colheita. Quatro microrganismos antagonistas, duas leveduras (*Candida oleophila* e *Cryptococcus albidus*) e duas linhagens de uma mesma espécie de bactéria (*Pseudomonas syringae*) estão disponíveis comercialmente sob o nome de Aspire[®] (Ecogen Inc., Langhorn, PA), YieldPlus[®] (Anchor Yeast, Cape Town, South Africa), BIOSAVE-110[®] e BIOSAVE-111[®] (EcoScience, Orlando, FL), respectivamente (DROBY et al., 2002).

Espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de controle biológico para controle de *B. cinerea*, agente causal do bolor cinzento em uvas e morangos; de *P. digitatum* em uvas; de *P. italicum* e *P. digitatum* em frutos de laranja; de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Alternaria* em tomate e dos fungos *B. cinerea* e *Rhizopus*, causadores de doenças pós-colheita em maçãs (MEHROTRA et al., 1996; JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998; MASIH et al., 2001; GUETSKY et al., 2001; KUPPER et al., 2013).

Leveduras são definidas como fungos, cujo estado sexual não apresenta corpos de frutificação e o crescimento vegetativo ocorre por brotamento ou fissão. São microrganismos predominantemente unicelulares, imóveis, sendo a maioria sapróbio e alguns parasitas oportunistas (MILLER, 1979; LACHANCE; STARMER, 1998). A habilidade destes microrganismos em assimilar uma larga gama de compostos orgânicos, expande a sua capacidade de dispersão e sobrevivência em

diferentes nichos ecológicos, podendo ser encontrados em ambientes terrestres (plantas, solo, animais, ar) e aquáticos (lagos, rios, mares) (PHAFF; STARMER, 1987).

As leveduras possuem várias características que as tornam boas candidatas como agentes de biocontrole, tais como: possuem alta capacidade de utilização de nutrientes, o que lhes permite proliferar rapidamente (SPADARO et al., 2004; LIMA et al., 1997; LIMA et al., 1999); são produtoras de polissacáridos extracelulares que aumentam a sua sobrevivência em diversos ambientes, restringindo, dessa maneira, o espaço para o desenvolvimento do agente fitopatogênico (MENDÉZ et al., 1999); além de serem tolerantes aos fungicidas frequentemente utilizados na pós-colheita (SPADARO et al., 2004).

A vantagem do uso de leveduras no controle de doenças de pós-colheita deve-se ao fato destes organismos serem os maiores componentes da comunidade microbiana na superfície de folhas, frutos e vegetais (WILSON et al. 1993). Elas são agentes de controle potencialmente mais efetivos, pois são fenotipicamente mais adaptadas a esses nichos e são hábeis na colonização e competição por espaço e nutrientes (FILONOW, 1998).

Outra vantagem da sua utilização no biocontrole de doenças de plantas é a melhor aceitação por parte dos consumidores, devido ao fato das leveduras serem amplamente utilizadas na produção de alimentos e bebidas.

3.3. Mecanismos de ação empregados no biocontrole

O desenvolvimento de doenças infecciosas é caracterizado por uma série de eventos que ocorrem sucessivamente de maneira ordenada. Estes eventos incluem a sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno, sendo este um processo cíclico, designado pelo ciclo das relações patógeno hospedeiro (AGRIOS et al., 2005; BERGAMIM FILHO et al., 1995). Portanto, compreender o mecanismo de ação de agentes de biocontrole é um pré-requisito para se obter isolados antagônicos mais efetivos e, para o desenvolvimento de métodos de produção e formulação mais consistentes, que aumentem a atividade

antagonística e que cumpram alguns requisitos, de pacotes toxicológicos e de registro, necessários para o desenvolvimento de um produto comercial.

No entanto, a elucidação dos mecanismos de ação muitas vezes é dificultada devido à complexa interação patógeno-hospedeiro-antagonista. Inúmeros relatos, sobre o modo de ação dos agentes de controle biológico, têm ajudado nos estudos de biocontrole.

3.3.1. Produção de enzima hidrolíticas

A parede celular de muitos fitopatógenos fúngicos é composta por carboidratos, quase todos sob a forma de polissacarídeos (80 a 90%), tais como quitina, β -1,3 e β -1,6-glucanas, além de proteínas e lipídios em quantidades significativas. Entre os infortúnios ambientais enfrentados pela parede celular, um dos mais desafiadores é a pressão dos microrganismos antagonistas, os quais, em alguns casos, apresentam mecanismos para romper a parede celular e/ou interromper processos relacionados à sua síntese (LIMA et al., 2000, PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A produção de enzimas hidrolíticas por antagonistas capazes de hidrolizar os componentes da parede celular podem desempenhar um importante papel no processo antagônico (LIMA et al., 2000). No entanto, a produção e excreção de enzimas hidrolíticas na capacidade de biocontrole em leveduras dependem do organismo em questão. Muitas vezes, segundo Machado e Linardi (1990), o potencial de produção enzimática está mais fortemente relacionado à característica do isolado do que ao grupo de leveduras propriamente. Com relação a esse mecanismo de ação, foi demonstrado que *Pichia anomala* produz endo- β -1,3-glucanase e induz lise da ponta das hifas entre outras deformações em *B. cinerea* (JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998) e, que *Candida. guilliermondii* e *Candida. oleophila* foram capazes de expressar altos níveis de β -1,3-exoglucanase e quitinase no controle de *B. cinerea* em tomate (SALIGKARIAS et al., 2002).

As β -glucanases são enzimas multifuncionais que hidrolisam polissacarídeos como a celulose, podendo também degradar as β -glucanas (PITSON et al., 1993, KUMAR et. al.,1996). Estas hidrolases participam diretamente do processo de

controle biológico porque hidrolisam β -1,3-1,6-glucanas constituintes da parede celular de alguns patógenos (IORIO et al., 2008; FLEURI et al., 2008).

O produto comercial “Aspire”, é utilizado para o controle biológico de podridões pós-colheita de citros e de frutas como maçã e pêra e, tem como base a levedura *Candida oleophila*, devido à produção de β -glucanases. É relatado ainda, que tal levedura produz várias enzimas degradativas da parede celular de *P. digitatum*, incluindo-se exo- β -1,3-glucanases, quitinases e proteases (BAR-SHIMON et al., 2004).

3.3.2. Competição por espaço e nutrientes

Competição é a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação e, ocorre por alimentos (carboidratos, nitrogênio e fatores de crescimento), por espaço e por oxigênio, sendo a competição por espaço e nutrientes o mecanismo de ação mais observado em leveduras (JANISIEWICZ et al., 2000).

Fungos fitopatogênicos necessitam de portas de entrada (ferimentos, estômatos, etc) para atingirem o tecido da planta, a fim de colonizar e causar a doença. Agentes de biocontrole devem ser capazes de competir efetivamente com o patógeno por esses locais de infecção, sendo que a falta de nutrientes e espaço pode inibir o desenvolvimento do patógeno e prevenir a germinação de propágulos e a infecção (PUNJA; UTKHEDE, 2003). Para Bleve et al. (2006), a competição por espaço e nutrientes é um mecanismo fundamental nos estudos de interações entre levedura-fungo filamentoso.

Segundo Janisiewicz et al. (2002), as hifas dos patógenos têm sido sugeridas como um importante fator na competição por nutrientes entre os antagonistas *Enterobacter cloacae* e *Rhizopus stolonifer* em pêssego, e entre as leveduras antagonistas *Pichia guilhiermondii* e *P. italicum* em frutas cítricas.

Botrytis cinerea, *Penicillium expansum*, *P. italicum* e *P. digitatum* são patógenos frequentes em pós-colheita e cujos conídios requerem a presença de nutrientes no meio externo para que os mesmos possam germinar antes de penetrarem nos frutos. Estes nutrientes são disponibilizados através das lesões que

ocorrem nos frutos, sendo o sitio de infecção o local em que a competição pelas leveduras pode atuar de forma a inibir o desenvolvimento destes patógenos (PLAZA et al., 2004; MENDÉZ et al., 1999).

3.3.3. Produção de toxina *killer*

O fenômeno *killer* é caracterizado por leveduras que produzem e excretam proteínas ou glicoproteínas que são inibidoras de células microbianas sensíveis. Assim, estas proteínas são designadas como "proteínas *killer*" ou "toxinas *killer*". Cepas de leveduras *killer* são imunes às suas próprias toxinas, mas podem ser sensíveis às toxinas de outros organismos (PALFREE; BUSSEY, 1979; POLONELLI; MORACE, 1986; BUSSEY, 1990).

A natureza da levedura *killer* implica em um grande fator de concorrência, considerando-se que as toxinas dessas leveduras podem impedir o desenvolvimento de outros microrganismos, proporcionando uma vantagem seletiva durante as primeiras fases do crescimento microbiano (STOLL et al., 2005).

Após a descoberta inicial do fenômeno *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*, logo se tornou evidente que as cepas *killer* não se restringem somente ao gênero *Saccharomyces*, mas também podem ser encontradas, entre muitos outros gêneros de leveduras. Até agora, as leveduras produtoras de toxinas *killer* foram identificadas em *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces*, indicando que o fenômeno *killer* é de fato generalizado entre leveduras (CASTORIA et al., 2003; RAU et al., 2005).

Toxinas *killer* descritas até o momento são ativas contra uma variedade de diferentes leveduras, e também podem apresentar comportamento antagônico a outros grupos microbianos, como bactérias, e fungos filamentosos (WALKER et al. 1995; IZGÜ; ALTINBAY, 1997). Existem na literatura trabalhos empregando leveduras *killer* no controle de fitopatógenos, inibindo principalmente o seu crescimento micelial (WALKER et al., 1995; COELHO, 2005; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; CABRAL et al., 2009).

3.3.4. Indução de resistência ao hospedeiro

A indução de resistência é um fenômeno que envolve vários mecanismos, como hipersensibilidade, barreiras estruturais e aumento da síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas – RP), como hidrolase β -1,3-glucanase (HAMMERSCHMIDT, 1999). Indução de resistência a patógenos de plantas é uma estratégia promissora de controle de doenças fúngicas, proporcionando resistência sistêmica em longo prazo para vários patógenos (WALLING, 2001). A indução de resistência pode ocorrer de forma física (ARCAS et al., 2000; LIU et al., 2010), química (VENDITTI et al., 2005; ZHANG et al., 2011), e por tratamentos biológicos (DROBY et al., 2002; EL GHAOUTH et al., 2003; NANTAWANIT et al., 2010).

Segundo Pascholatti e Leite (1995), os mecanismos podem ser bioquímicos e/ou estruturais, e atuam de forma dinâmica e coordenada, permitindo que a planta se defenda do ataque dos patógenos. Esses mecanismos de resistência apresentam-se como um método alternativo para o controle de fitopatógenos, sendo que estes podem ser induzidos por elicitores bióticos, como microrganismos (fungos filamentosos, leveduras, bactérias, partículas virais) e moléculas por eles produzidas (oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos); ou abióticos, os quais podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos (metais pesados) e luz ultravioleta (PASCHOLATTI; LEITE, 1995; LEITE et al., 1997).

Leveduras estão sendo utilizadas no controle de doenças de pós-colheita de frutas, resistência à doença pode ser estimulado por *Cryptococcus laurentii* em jujuba (TIAN et al., 2007), e por *Pichia guilliermondii* em pimentões (NANTAWANITET et al., 2010). No entanto o mecanismo pelo qual as leveduras induzem resistência permanece desconhecido, pois ocorrem interações complexas entre patógeno e hospedeiro (DROBY et al., 2009). Estudos anteriores indicaram que *Rhodosporidium paludigenum* pode inibir significativamente várias doenças de pós-colheita em frutas (WANG et al., 2008, 2010a,b).

As enzimas, β -1,3-glucanase (GLU), fenilalanina amônioliase (PAL), peroxidase (POD), e polifenoloxidase (PPO) são estudadas na área de biocontrole de pós-colheita e conhecido por estar envolvido na resistência à doenças de plantas (ZHAO et al., 2008). Uma das proteínas relacionadas com organismos patogênicos

mais importantes e enzimas hidrolíticas, GLU pode inibir diretamente o crescimento de fungos decompondo β -1,3-glucano na parede celular de fungos (EDREVA, 2005).

Segundo Lu et al. (2013) estudos indicaram que o tratamento de pós-colheita de citros com *R. paludigenum* induz altos níveis de resistência a doenças contra *P. digitatum* e aumenta significativamente a atividade das enzimas relacionadas com a defesa, que é um importante mecanismo de leveduras.

Resistência das plantas contra o ataque de fungos fitopatogênicos está relacionada à enzima peroxidase, conhecida por participar de vários processos fisiológicos. Essa enzima oxida compostos fenólicos e participa da síntese do hormônio vegetal etileno. Avaliando a ação da levedura *S. cerevisiae*, no perfil eletroforético de peroxidases em plantas de milho e sorgo, Roncatto e Pascholatti (1998) observaram que a suspensão de células ou mesmo o filtrado da levedura foi capaz de alterar o padrão de atividade da enzima peroxidase nas plantas.

3.3.5. Micoparasitismo

O micoparasitismo é uma forma de parasitismo causada por microrganismos que atacam outros organismos, muitas vezes, os da mesma espécie. Arras et al. (2002) observaram uma rápida colonização do micélio de *P. digitatum* por *Candida famata*, com ação lítica e fagocítica da levedura contra a hifa fúngica. A forte ligação de células de *P. guilliermondii* ao micélio de *P. italicum* causou a degradação da parede celular da hifa próxima do local onde as células de leveduras se aderiram.

3.3.6. Produção de sideróforos

Sideróforos são definidos como ligantes específicos de Fe^{3+} (III), chegando a apresentar constante de estabilidade ($K_f \approx 10^{30}$). São produzidos por microrganismos, onde desempenham a função de sequestrar e transportar Fe^{3+} (III). São quelantes de baixo peso molecular (400-2000 g/mol), excretados sob condições de deficiência de ferro (NEILANDS, 1995).

Os sideróforos podem ser produzidos por espécies microbianas aeróbicas e, facultativamente, por espécies anaeróbicas. Estão incluídas nestas espécies, bactérias entéricas, bactérias patogênicas a humanos, animais e fungos de plantas,

microrganismos de solo, espécies gram-positivas e negativas, cianobactérias e algas superiores, bactérias fixadoras de nitrogênio e alguns tipos de leveduras (BENITE et al., 2002).

Sansone et al. (2005) observaram que *Rhodotorula glutinis* apresenta a capacidade de produzir compostos sideróforos (ácido rhodotorúlico), os quais foram capazes de inibir a germinação de esporos e a severidade da podridão em maçã causada pelo fungo *B. cinerea*.

3.3.7. Produção de antibióticos

Microrganismos podem produzir substâncias ativas em baixas concentrações (menores que 10 ppm) que são tóxicas para outros microrganismos (MENDÉZ et al., 1999). Agentes de biocontrole mais ativos constituem-se as bactérias produtoras de antibióticos.

Segundo Spadaro et. al. (2002), *Bacillus subtilis* produz iturina, um péptido com forte ação antifúngica. *Pseudomonas cepacia* sintetiza pirrolnitrina, capaz de controlar a podridão causada por *B. cinerea* e *P. expansum* em pomóideas (MENDÉZ et al., 1999).

Prefere-se que a antibiose não seja o principal mecanismo de ação de um microrganismo antagonista para uso na pós-colheita, pela possibilidade de deixar resíduos nos frutos para consumo *in natura*.

A produção de compostos antimicrobianos por leveduras tem sido observada em diversos estudos. McCormack et al (1994) isolaram leveduras habitantes de filoplano e observaram que *Aureobasidium pullulans*, presente neste ambiente, foi capaz de produzir dois compostos antibióticos, os quais foram isolados e estudados pelos autores.

4. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. [S.l.]: Elsevier, 2005.

ARCAS, M. C.; BOTÍA, J. M.; ORTUÑO, A. M.; DEL RÍO, J. A. UV irradiation altersthelevels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 7, p. 617–622, 2000.

ARRAS, G.; SCHERM, B.; MIGHELI, Q. Improving biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 12, n. 5, p. 547-553, 2002.

BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, New York, v. 45, n. 3, p. 140-148, 2004.

BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest diseases of fruits and vegetables**: development and control. Amsterdam: Elsevier, 2002. 418 p.

BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p.90-93, 1999.

BENATO, E. A.; SIGRIS, J. M. M.; HANASHIRO, M. M.; MAGALHÃES, M. J. M.; BINOTTI, C. S. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 4, p. 299-304, 2002.

BENITE, A. M.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos. Uma resposta dos microrganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.

BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatolgia**. 3. ed. Piracicaba: Ceres, 1995. 919 p.

BLEVE, G.; GRIECO, F.; COZZI, G.; LOGRIECO, A.; VISCONTI, A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A.niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-209, 2006.

BROWN, G. E. Biology and control of *Geotrichum candidum*, the cause of citrus sour rot, **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Goldenrod, v. 92, p. 186-189, 1979. Disponível em: <<http://fshs8813.wpengine.com/proceedings-o/1979-vol-92/186-189%20%28BROWN%29.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2014.

BROWN, G. E. Sour rot. **Causal organism and disease cycle**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Science Extension Service Fact Sheet, 2003. 137 p.

BUSSEY, H. Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast "killer toxin". **Experientia**, Basel, v. 46, n. 2, p. 193-200, 1990.

BUTLER, E. E.; FOGLE, D.; MIRANDA, M. *Galactomyces citri-aurantii*, a newly found teleomorph of *Geotrichum citri-aurantii* the cause of sour rot of citrus fruit. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 33, p. 197-212, 1988.

CABRAL, A. S.; CARVALHO, P. M. B.; PINOTTI, T.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; MACRAE, A. Killer yeast inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of 'witches' broom disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 108-110, 2009.

CAPPELLINI, R. A.; CEPONIS, M. J. Postharvest losses in fresh fruits and vegetables: postharvest losses in perishable crops. In: MOLINE, H. E. (Ed.). **Postharvest pathology of fruits and vegetables**: postharvest losses in perishable crops. Berkeley: University of California Agricultural Experiment Station, 1984. p. 24-30.

CARRÉ, V.; ZANELLA, A. L.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.; PAGLIOSA, L. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; GONÇALVES JUNIOR, A. C. Fungitoxicidade de quitosana e extrato de *Artemisia camphorata* a *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 291, 2002. Resumo.

CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; DE CURTIS, F.; DE CICCIO, V. Resistance of Postharvest Biocontrol Yeasts to Oxidative Stress: A Possible New Mechanism of Action. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 564-572, 2003.

COELHO, A. R. **Controle de *Penicillium expansum* / Biodegradação de Patulina**: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita. 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

COOK, R. J.; BACKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS, 1983. 539 p.

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*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 92, n. 4, p. 393-399, 2002.

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**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 137-145, 2009.

ECKERT, J. W. Post-harvest diseases of citrus fruits. **Agriculture Outlook**, Washington, DC, v. 54, p. 225-232, 1993.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, Sofia, v. 31, n. 1-2, p. 105–124, 2005.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 3, p. 344–348, 2003.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 25-35, 2006.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agrônoma Ceres, 2005. v. 2, cap. 28, p. 239-269.

FENG, L.; WU, F.; LI, J.; JIANG, Y.; DUAN, X. Antifungal activities of *Polyhexamethylene biguanide* and *Polyhexamethylene guanide* against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 61, n. 2-3, p. 160–164, 2011.

FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 8, n. 2, p. 243-256, 1998.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1224-1231, 2008.

FRANCO, D. A.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 602-606, 2000.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; DINOOR, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 7, p. 621-627, 2001.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 77-84, 1999.

IORIO, E.; TOROSANTUCCI, A.; BROMURO, C.; CHIANI, P.; FERRETTI, A.; GIANNINI, M.; CASSONE, A.; PODO, F. *Candida albicans* cell wall comprises a branched β -D-(1,6)-glucan with β -D-(1,3)-side chains. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 343, n. 6, p. 105-1061, 2008.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D. *Killer* toxins of certain yeast strains have potential inhibitory activity on Gram-positive bacteria. **Microbios**, Cambridge, v. 89, n. 358, p. 15-22, 1997.

JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 411-441, 2002.

JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1196-1200, 2000.

JIJAKLI, M.H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 335-343, 1998.

JOHNSON, G. I., HEATHER, N. W. Postharvest disease and pest control in tropical fruit. In: CHAMP, B. R.; HIGHLEY, E. (Ed.). **Postharvest technology for agricultural products in Vietnam**. Canberra: ACIAR, 1995. p. 100-126.

KADER, A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. 3. ed. Riverside: VC. Regents, 2002. 535 p.

KUMAR, N. N.; DEOBAGKAR, D. N. Multifunctional glucanases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 1-15, 1996.

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**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 20-31, 2013.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts, a taxonomy study**. 4th. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 21-30.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLLETA FILHO, H. D. Fungos, procaríotos e doença abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, 2005. cap. 18, p. 509-566.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Controle de doenças causadas por fungos e bactérias em citros. In: ZAMBOLIM, L.;

RIBEIRO DO VALE, F. X.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas frutíferas**. Viçosa, 2002. v. 2, p. 141-214.

LEITE, B.; RONCATO, L. D.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: LUZ, C. W.; FERNANDES, J. M. S.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAAP, 1997. v. 5, p. 235-280.

LIMA, G.; ARRU, S.; DE CURTIS, F.; ARRAS G. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 23, n. 3, p. 223-229, 1999.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERMO, M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 169-178, 1997.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 263-304.

LIU, F.; TU, K.; SHAO, X.; ZHAO, Y.; TU, S.; SU, J.; HOU, Y.; ZOU, X. Effect of hot air treatment in combination with *Pichia guilliermondii* on postharvest anthracnose rot of loquat fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 65–71, 2010.

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 of Applied Microbiology**, Chichester, v. 107, n. 5, p. 1450–1456, 2009.

LU, L.; LU, H.; WUC, C.; FANGD, W.; YUA, C.; YEA, C.; SHIA, Y.; YUA, T.; ZHENG, X. Preharvest application of antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum* induced resistance against postharvest diseases in mandarin orange. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 67, n. 2, p. 130–136, 2013.

MACHADO, K. M. G.; LINARDI, V. R. Production of amylase and beta-galactosidase by yeasts. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 33, p. 247-253, 1990.

MASIH, E. I.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; MARMARAS, I.; AIT-BARKA, E.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 202, n. 2, p. 227-232, 2001.

MARI, M.; GUIZZARDI, M. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, n. 1, p. 59-66, 1998.

MCCORMACK, P. J.; WILDMAN, H. G.; JEFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, n. 3, p. 927-931, 1994.

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**, St. Paul, v. 102, n. 5, p. 528-538, 2012.

MEHROTRA, N. K.; SHARMA, N.; GHOSH (NAYEK), R.; NIGAM, M. Biological control of green and blue mould disease of citrus fruit by yeast. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 49, n. 4, p. 350-354, 1996.

MENDÉZ, S. V.; MONDINO, P. Control biológico postcosecha en Uruguay. **Horticultura Internacional**, Reus, v. 7, n. 26, p. 29-36, 1999.

MERCIER, I. E.; SMILANICK, J. L. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 32, n. 3, p. 401-407, 2005.

MILLER, M. W. Yeasts in food spoilage: an update. **Food Technology**, Chicago, v. 33, p. 76-80, 1979.

MORETTO, C. ; CERVANTES, A. L. L.; BATISTA FILHO, A.; KUPPER, K. C. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, n. 22, p. 433–438, 2014.

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**, Maryland Heights, v. 52, n. 2, p. 145–152, 2010.

NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 10, p. 26723-26726, 1995.

NEVES, L. C.; MANZIONE, R. L.; VIEITES, R. L. Radiação gama na conservação pós-colheita da nectarina (*Prunus pérsica* var. *nucipersica*) frioconservada. **Revista brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 676-679, 2002.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Editora Marcos Fava Neves, 2010. 137 p.

NIGRO, F. et al. Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. **Journal of Plant Pathology**, Bologna, v. 82, n. 1, p. 29-37, 2000.

PALFREE, G. F.; BUSSEY H. Yeast *killer* toxin: purification and the characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 93, n. 3, p. 487-493, 1979.

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**, Des Moines, v. 72, n. 5, p. 1037-1046, 2009.

PALOU, L.; USALL, J.; PONS, J.; CERDÀ, M. C.; VIÑAS, I. Micoflora em centrales cítrícolas de Tarragona: production protección vegetal. **Revista Investigación Agraria**, Madrid, v. 16, n. 1, p. 447-462, 2001.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. Piracicaba: Ceres, 1995. cap. 22, p. 417-422.

PASCHOLATI, S. F. et al., O fenômeno da indução de resistência e o controle de doenças pós- colheita. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2., 2004, Lavras-MG. **Anais...** Lavras: NEFIT/UFLA, 2004. p. 2-6.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soils. **The yeasts**. London: Academic Press, 1987. p. 123-180.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDOUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal b-glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 15, n. 3, p. 178-190, 1993.

PLAZA, P.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; VINAS I. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 75-82, 2004.

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

POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 24, n. 5, p. 866-869, 1986.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R. A.; KOBILER, I. Effect of CO₂ treatment on the induction of antifungal diene in unripe avocado fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, p. 325-334, 1991.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

- RAU, U.; NGUYEN, L. A.; SCHULZ, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; ROEPER, H. et al. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 66, n. 5, p. 551-559, 2005.
- RONCATTO, M. C.; PASCHOLATTI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 3, p. 395-402, 1998.
- SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTONA, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. A study on mode of action. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 25, n. 2, p. 151-161, 2002.
- SANSONE, G.; REZZA, I.; CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M. I. S. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 245-251, 2005.
- SILVERIA, N. S. S.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, S. S. L. I.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogenese e controle. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 18, n. 4, p. 283-298, 2005.
- SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 185-194, 2004.
- SPADARO, D.; VOLA, R.; PIANO, S.; GULLINO, M. L. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 123-143, 2002.
- STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. **Mycological Research**, London, v. 109, n. 3, p. 342-356, 2005.
- SUPRAPTA, D. N.; ARAI, K.; IWAI, H. Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. **Mycoscience**, Tokyo, v. 36, n. 3, p. 277-282, 1995.
- TIAN, S. P.; YAO, H. J.; DENG, X.; XU, X. B.; QIN, G. Z.; CHAN, Z. L. Characterization and expression of β -1,3-glucanase genes in jujube fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 3, p. 260-268, 2007.
- TIMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. **Compendium of postharvest diseases**. 2. ed. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2000.

TOURNAS, V. H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 31, n. 1, p. 33–44, 2005.

VENDITTI, T.; MOLINU, M. G.; DORE, A.; AGABBIO, M.; D'HALLEWIN, G. Sodium carbonate treatment induces scoparone accumulation, structural changes, and alkalization in the Albedo of wounded citrus fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 9, p. 3510–3518, 2005.

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between *killer* yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v. 127, n. 3, p. 213–222, 1995.

WALLING, L. L. Induced resistance: from the basic to the applied. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 10, p. 445–447, 2001.

WANG, Y.; WANG, P.; XIA, J.; YU, T.; LOU, B.; WANG, J.; ZHENG, X. D. Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 103–108, 2010a.

WANG, Y.; YU, T.; XIA, J.; YU, D.; WANG, J.; ZHENG, X. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 53, n. 2, p. 178–182, 2010b.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 183–189, 1993.

ZAMBOLIM, L. Controle integrado de doenças em pós-colheita de frutíferas tropicais. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: NEFIT/UFLA, 2002. p. 139–182.

ZHANG, C.; WANG, J.; ZHANG, J.; HOU, C.; WANG, G. Effects of aminobutyric acid on control of postharvest blue mould of apple fruit and its possible mechanisms of action. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 61, n. 2–3, p. 145–151, 2011.

ZHAO, Y., TU, K., SHAO, X., JING, W., SU, Z. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 113–120, 2008.

CAPÍTULO 2 - Mecanismos de ação de leveduras envolvidos no biocontrole de *Geotrichum candidum*, agente causal da podridão azeda em frutos cítricos

Resumo - A podridão azeda, ocasionada pelo fungo *Geotrichum candidum*, é uma das principais doenças que ocorrem na pós-colheita em citros. A ausência de produtos químicos registrados para o controle dessa doença tem levado à busca de métodos e estratégias alternativas e, dentre esses, a utilização de leveduras como agentes de controle biológico. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os mecanismos de ação de oito isolados de leveduras, obtidos do filoplano de plantas cítricas que apresentam potencial para o controle da podridão azeda. Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que a maioria dos isolados de leveduras avaliados não produziu substâncias antifúngicas, em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento do fitopatógeno; a competição por nutrientes não foi uma estratégia de biocontrole usada pelas leveduras. A atividade *killer* e a produção de enzimas hidrolíticas são os principais mecanismos de ação envolvidos no biocontrole de *G. candidum*.

“Palavras-chave”: Fator *Killer*, *Endomyces geotrichum*, enzimas hidrolíticas, *Saccharomyces cerevisiae*

CHAPTER 2 - Action mechanisms of yeasts involved in the biocontrol of *Geotrichum candidum*, the causal agent of citrus sour rot

Abstract - Sour rot is one of the major post-harvest diseases of citrus plants and is caused by the fungal pathogen *Geotrichum candidum*. The lack of chemicals certified for the control of this disease has led to the consideration of alternative methods and strategies, such as the use of yeasts as biocontrol agents. The aim of the present study was to assess the modes of action of eight yeast isolates obtained from the phylloplane of citrus plants and previously shown to be effective in controlling sour rot. The findings revealed that most of the isolates analyzed did not produce antifungal compounds in amounts sufficient to inhibit the growth of *G. candidum*. Additionally, the yeast strains were not found to use nutrient competition as a biocontrol strategy. Instead, *killer* activity and hydrolytic enzyme production were identified as the major mechanisms involved in the biocontrol of *G. candidum*.

“Keywords”: *Saccharomyces cerevisiae*; *killer* factor; *Endomyces geotrichum*; hydrolytic enzymes

1. INTRODUÇÃO

A citricultura ocupa lugar de destaque no agronegócio brasileiro, com grande visibilidade internacional em função da produção e comercialização do suco de laranja concentrado e congelado. O Brasil é responsável por 50% da produção de laranja e 85% da participação no mercado mundial de suco de laranja. O PIB do setor citrícola é da ordem de US\$ 6,5 bilhões, com faturamento total de US\$ 14,6 bilhões. Além da importância econômica que o setor representa, a citricultura gera cerca de 230 mil empregos, tendo assim grande importância social para o país (NEVES et al., 2010).

Não obstante a importância econômica que o setor citrícola tem para a economia nacional, os pomares são acometidos por uma série de pragas e doenças que são responsáveis por reduções consideráveis na quantidade e na qualidade dos frutos disponíveis para o mercado. Dentre as principais doenças que ocorrem na fase de pós-colheita em citros, pode-se destacar a podridão azeda, causada pelo fungo *Geotrichum candidum*.

A podridão azeda está disseminada em todos os países produtores, afetando todas as espécies e cultivares, sendo que as variedades de tangerinas geralmente desenvolvem a doença mais rapidamente do que variedades de laranjas ou grapefruits (BROWN, 2003). Não existem produtos químicos registrados para o controle desta doença, portanto, a busca por métodos alternativos se fazem necessários. A utilização de espécies de leveduras é uma estratégia interessante, principalmente, pela capacidade de colonização e sobrevivência na superfície dos frutos por um longo período de tempo (LAHLALI et al., 2011).

As leveduras são potencialmente efetivas, pois são fenotipicamente mais adaptadas nas superfícies de folhas, frutos e vegetais, além de serem hábeis na colonização e competição por espaço e nutrientes (FILONOW, 1998), o que dá a esse grupo de microrganismos vantagens quanto à utilização como agentes de biocontrole de patógenos na pós-colheita.

Apesar do conhecimento sobre algumas funções das leveduras no ambiente, muito ainda há para ser descoberto, principalmente sobre os seus mecanismos de ação em diferentes ambientes e no antagonismo a outros organismos (ROSA-

MAGRI et al., 2011). Estes agentes biológicos podem atuar na prevenção da infecção, na redução da colonização de tecidos no hospedeiro, na redução da esporulação ou na sobrevivência do patógeno, podendo proporcionar diferentes níveis de controle (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar os mecanismos de ação de oito isolados de leveduras, obtidos do filoplano de plantas cítricas, no controle do *G. candidum* e, que em ensaios prévios mostraram ser eficientes no biocontrole do patógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Os isolados de ACBL - agente de controle biológico leveduras (ACBL-23; ACBL-42; ACBL-44 (*Rhodotorula mucilaginosa*); ACBL-50 (*Saccharomyces* sp.); ACBL-52; ACBL- 68; ACBL-77 (*Sporobolomyces koalae*) e ACB-K1 (*S. cerevisiae*)) e o isolado de *Geotrichum candidum*, utilizados neste estudo, pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil. Os isolados de leveduras utilizados neste estudo foram obtidos de 14 municípios do Estado de São Paulo e, após estudos prévios de antagonismo *in vitro* e *in vivo* foram selecionados como agentes potenciais para o biocontrole da podridão azeda em frutos cítricos (CUNHA, 2013).

2.2. Produção de compostos antifúngicos

2.2.1. Produção de compostos antifúngicos voláteis

Para a determinação da produção de compostos voláteis cultivou-se o fungo simultaneamente com os isolados de leveduras, utilizando placas bipartidas, as quais impedem que exsudatos não voláteis produzidos pela levedura tenham contato com o fungo através do meio de cultura. Para tal, um disco de 5 mm de

diâmetro de *G. candidum* mais o meio de cultura foi depositado em um dos lados da placa contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), e do outro lado um disco do mesmo tamanho contendo cada isolado de levedura foi depositado sobre o meio de cultura YEPD (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2% de glicose, 2% de ágar, 0,01% de ampicilina e 0,01% de ácido nalidíxico, dissolvidos em 1 litro água destilada). Após 10 dias de incubação das culturas a 25 °C foi realizada a avaliação, medindo-se o diâmetro da colônia de *G. candidum* em dois sentidos perpendiculares e, comparada ao cultivo do fungo na placa controle (sem a presença da levedura).

2.2.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura

Para cada isolado de levedura, uma alçada do microrganismo foi retirada de colônia ativa (48 horas de cultivo em YEPD) e transferida para frascos de Erlenmeyers de capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD, sendo posteriormente, a cultura incubada sob agitação a 150 rpm, na ausência de luz por 72 horas.

Em seguida, a cultura correspondente a cada isolado foi filtrada em papel de filtro (Whatman n°4) e em membrana Millipore® (0,45 µM), a fim de se obter um filtrado livre de células de levedura, adaptação da técnica de Frighetto e Melo, (1995). Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para 90 mL de BDA fundente. Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos em placas de Petri e, após a solidificação, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro, contendo o fitopatógeno, foi transferido para o centro das placas. O controle correspondeu ao fitopatógeno cultivado em meio BDA sem a adição dos filtrados das células. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 25 °C durante sete dias em fotoperíodo de 12h e, a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia de *G. candidum*.

2.2.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Para cada isolado de levedura, um disco de meio com o crescimento do microrganismo foi colocado em frascos Erlenmeyer de capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD, e incubado sob agitação de 150 rpm, no escuro por 72 horas, como citado no item 2.2.2. Em seguida, amostras de 10 mL de cada isolado de levedura foram transferidas para frascos contendo 90 mL de BDA e, esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos para placas de Petri e, após solidificação, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro contendo o fitopatógeno foi transferido para o centro das placas. O controle correspondeu ao patógeno crescido em meio BDA sem a presença dos metabólitos. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 25 °C durante sete dias e a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia de *G. candidum*, em dois sentidos perpendiculares.

2.3. Detecção da atividade *Killer*

Para esse ensaio foi preparado, inicialmente, uma suspensão (1×10^5 células mL⁻¹) de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 (sensível ao fator *killer*), após cultivo em meio YEPD por 24 horas a 28 °C. Uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi, então, espalhada sobre o meio de cultura YEPD + azul de metileno, tamponado a pH 4,3-4,7, segundo a metodologia descrita por Ceccato-Antonini et al. (2004). Após secagem, os isolados de leveduras, a serem avaliados quanto à presença do fator *killer*, foram inoculados na placa com palitos estéreis (em pontos), sendo em seguida, as culturas incubadas a 28 °C, por três dias. Os isolados foram considerados produtores de toxina *Killer* quando apresentaram um halo de inibição de crescimento e zona azul adjacente, indicando a morte celular da levedura sensível.

2.4. Competição por nutrientes

Para a detecção da competição de nutrientes, entre o *G. candidum* e as leveduras antagonistas, lâminas de microscopia contendo meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose (0; 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 %) foram preparadas. Posteriormente, 10 µL de uma suspensão de 1×10^5 conídios mL⁻¹ do fitopatógeno e 10 µL de uma suspensão de 1×10^8 células mL⁻¹ de cada isolado de levedura foram depositados em locais pré demarcados nas lâminas. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 25 °C por 16 horas. A avaliação procedeu através da contagem de conídios germinados e não germinados, num total de 100 conídios avaliados ao acaso. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo encontrava-se maior ou igual ao tamanho do conídio.

2.5. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo

Os isolados de leveduras foram pareados com o *G. candidum* seguindo a metodologia descrita por Dennis e Webster, (1971). O teste foi realizado em placa de Petri, em meio de cultura BDA, no qual foi colocado de um lado, o fitopatógeno (disco de micélio com 5 mm de diâmetro) e a 3 cm de distância foi depositada a levedura (disco de 5 mm de diâmetro).

A partir da observação do halo de inibição entre os isolados de leveduras antagonistas e o fungo, após cultivo pareado em placa de Petri, foi realizado um experimento para quantificar o crescimento micelial do patógeno retirado da zona de antagonismo (micélio localizado adjacente do halo de inibição de crescimento fúngico), com o intuito de verificar se as hifas encontravam-se viáveis. Com o objetivo de comparação do crescimento micelial, foram realizadas retiradas de micélio fúngico (disco de 5 mm de diâmetro) de placas apresentando antagonismo, de três diferentes locais: na região de inibição, na região mediana (próxima ao halo de inibição) e, para fins de comparação, do micélio longe da levedura (onde o micélio não sofreu a ação inibitória da levedura). As culturas foram incubadas por 10 dias em estufa para BOD a 25 °C em fotoperíodo 12 horas. A avaliação constou da

medição do diâmetro do crescimento micelial do patógeno, em dois sentidos perpendiculares.

2.6. Produção de enzimas hidrolíticas

Este experimento teve por objetivo avaliar a produção e liberação de enzimas hidrolíticas pelos isolados de leveduras, seguindo a metodologia de Fialho et al. (2005). Os isolados foram transferidos através de uma alça de inoculação para 20 mL de meio YEPD líquido e incubados sob agitação constante de 150 rpm por 72 horas no escuro. Após esse período, 1 mL da suspensão foi transferida para tubos Falcon de 15 mL contendo 10 mL de meio YEPD e YEPD modificado (com preparado de parede celular do fungo testado, a 1% em substituição à glicose). O cultivo foi realizado em triplicata, sob agitação a 150 rpm. No tempo de 24 horas de incubação, uma amostra de 1,5 mL foi retirada e centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e utilizado para análise das atividades de β -1,3-glucanase e quitinase.

2.6.1. Preparo de parede celular (PPC)

Para a preparação da parede celular (PPC), 1 mL da suspensão de esporos (1×10^5 esporos mL⁻¹) do fitopatógeno foi cultivado em 50 mL de meio batata dextrose por 8 dias, sob agitação constante à 150 rpm. O micélio fúngico foi coletado pela filtragem em papel de filtro Whatman (nº 1), lavado três vezes com água destilada e homogeneizado em tampão fostafo 0,1M (pH 7,2) por 2 minutos e mantido a -20 °C *overnight*. Posteriormente, o material foi descongelado e novamente homogeneizado. Em seguida, aproximadamente 20 mL do micélio fúngico foi transferido para um frasco onde foi macerado com nitrogênio líquido e a parede celular do fungo foi armazenada em freezer -80 °C para utilização posterior. Metodologia adaptada de Bar-Simon et al. (2004).

2.7. Atividades enzimáticas

2.7.1. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores, liberados durante os ensaios enzimáticos, foi realizada segundo a metodologia descrita por Miller (1959), utilizando o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS). Para tal, 250 μL da mistura de reação foram adicionados a 250 μL do reagente ADNS e a solução foi aquecida em banho com água fervente por 10 minutos. Após o resfriamento em gelo, até a temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, a solução foi diluída com 2,5 mL de água destilada homogeneizada e foi determinada a absorbância a 540 nm, contra o branco apropriado.

2.7.2. Determinação da atividade enzimática - β -1,3-glucanase

Para a avaliação da produção de β -1,3-glucanase foi utilizada a técnica de quantificação colorimétrica de glicose liberada do substrato laminarina, através da dosagem de açúcares redutores (item 2.7.1). A reação foi realizada com 200 μL de tampão McIlvaine, pH 6,0; 100 μL da amostra de cultivo e 100 μL de laminarina (4 mg mL⁻¹). A mistura da reação foi incubada a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Após esse período, a reação foi paralisada com a adição de 200 μL do reagente ADNS à mistura da reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados. A leitura de absorbância a 540 nm foi feita contra a mistura de reação contendo tampão em substituição ao meio de cultivo, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle negativo que consistiu na mistura da reação na presença de tampão substituindo o substrato. As leituras de absorbâncias foram plotadas em curva padrão para glicose e a atividade enzimática foi expressa em U/L, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1g de açúcar redutor liberado (glicose) da laminarina nas condições de ensaio.

2.7.3. Determinação da atividade enzimática – quitinase

A avaliação da produção de quitinase foi realizada pela técnica de N-acetil glucosamina (NAG), a partir do substrato glicol quitina. Para a realização da análise, 100 µL da amostra de meio de cultivo da levedura foram misturados com 200 µL de tampão McIlvaine, pH 6,0 e 100 µL de glicol quitina 0,01% (p/v) neste mesmo tampão. Após incubação por 60 minutos a 50 °C, a reação foi interrompida pela adição de 200 µL do reagente ADNS à mistura de reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberado, como anteriormente descrito (item 2.7.1). A cubeta de referência (branco) consistiu na mistura da reação na presença tampão em substituição ao meio de cultivo. O valor da leitura foi subtraído do obtido pelo controle negativo que apresentou o tampão em substituição ao substrato (glicol quitina). A atividade enzimática foi expressa em U/L, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1g de açúcar redutor liberado (N-acetilglucosamina) enzimaticamente da glicol quitina, nas condições do ensaio.

2.8. Análises Estatísticas

Para todos os ensaios de produção de compostos antifúngicos e para a análise de crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para o teste de competição por nutrientes, utilizou-se um esquema fatorial com oito repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. As análises foram realizadas utilizando o software ASSISTAT.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de compostos antifúngicos

3.1.1. Produção de compostos antifúngicos voláteis

No ensaio realizado para determinação de compostos antifúngicos voláteis, os resultados obtidos mostraram que somente o isolado de levedura ACBL-52 produziu metabólitos voláteis que afetaram o tamanho da colônia do fitopatógeno em 9,3% de inibição (Figura 1).

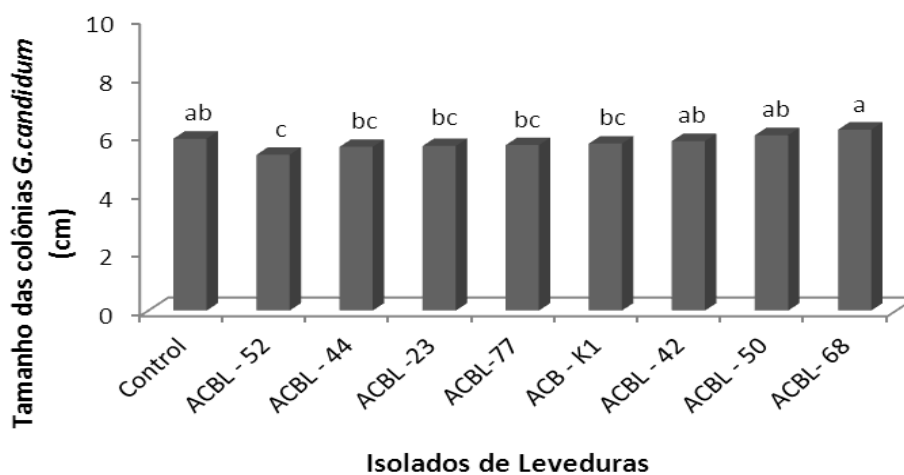


Figura 1. Tamanho da colônia de *Geotrichum candidum* sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.1.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura

No teste para determinação de compostos antifúngicos livres de células, produzidos pelos isolados de leveduras avaliados, os dados apresentados na Figura 2 mostraram que as leveduras produziram compostos que favoreceram o crescimento micelial do *G. candidum*.

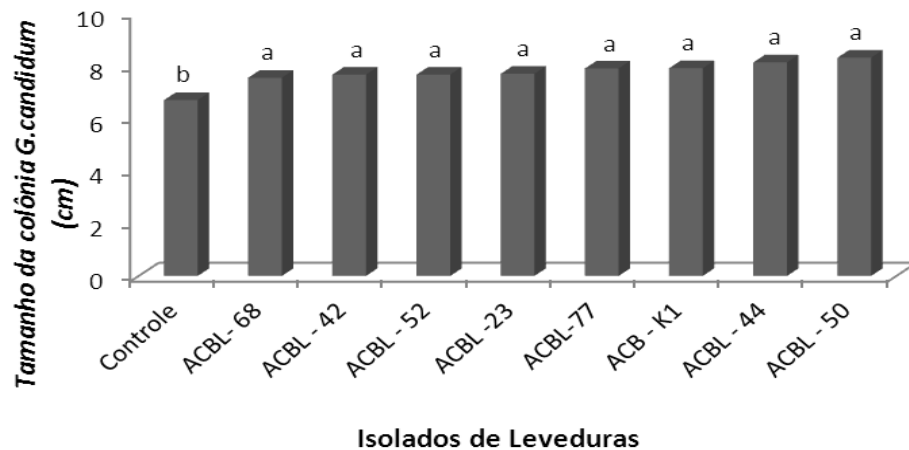


Figura 2. Tamanho da colônia de *Geotrichum candidum* sob influência de compostos antifúngicos livres de células produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.1.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Com relação ao teste de compostos antifúngicos termoestáveis os dados obtidos mostraram que, todos os isolados de leveduras produziram metabólitos que favoreceram o crescimento micelial do *G. candidum*, mesmo em alta temperatura (Figura 3).

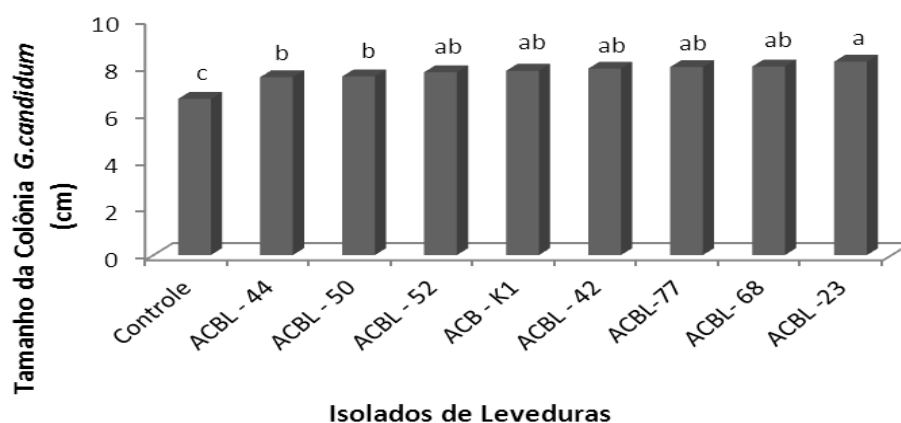


Figura 3. Tamanho da colônia de *Geotrichum candidum* sob influência de compostos antifúngicos termoestáveis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.2. Detecção da atividade Killer

No ensaio realizado, cujo o objetivo era determinar a atividade *Killer* dos isolados de levedura testados, observou-se que os oito deles apresentaram resultados positivos quanto à atividade *killer*. Como observado na Tabela 1, os isolados apresentaram halo de inibição, linha ou zona azul (morte celular) ou zona clara (inibição, porém sem morte celular) ao redor da colônia, indicando a ação *killer* sobre a levedura sensível (Figura 4).

Tabela 1. Atividade *killer* dos isolados de leveduras em relação à levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006 em meio YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5.

Isolados de leveduras	Atividade <i>Killer</i>
ACBL-23 ⁽¹⁾	Zona Clara
ACBL-42	Zona Clara/Linha Azul/Halo
ACBL-44	Zona Azul
ACBL-50	Zona Clara
ACBL-52	Zona Clara/Linha Azul
ACBL-68	Zona Azul
ACBL-77	Zona Azul/Linha Azul/Halo
ACB-K1	Zona Clara

⁽¹⁾ACBL-44: *Rhodotorula mucilaginosa*; ACBL-50: *Saccharomyces* sp.; ACBL-77: *Sporobolomyces koalae*; ACB-K1: *Saccharomyces cerevisiae*.

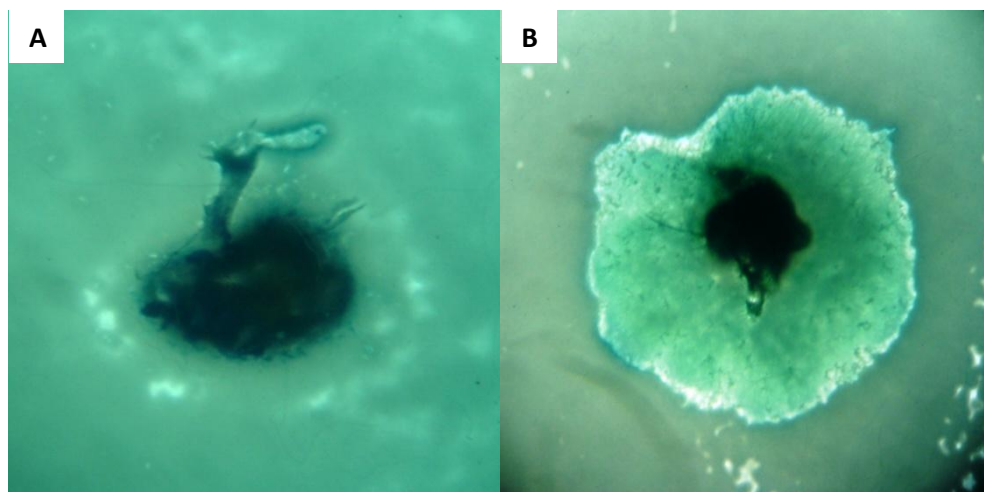


Figura 4. Atividade *killer* do ACBL-23 mostrando a zona clara (inibição da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28°C, pH 4,5 (A). Atividade *Killer* do ACBL-77 mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (B).

3.3. Competição por nutrientes

No ensaio realizado para determinar se as leveduras testadas competem por nutrientes com o fitopatógeno, os resultados mostraram que todos os isolados de leveduras inibiram a germinação dos conídios de *G. candidum*, independente das concentrações de glicose utilizadas (Figura 5 e 6). Os isolados ACBL-68, ACB-K1 e ACBL-23 foram os que proporcionaram maiores valores de inibições da germinação de conídios do patógeno, proporcionando 94,4%; 92,7% e 90,5% de inibição, respectivamente.

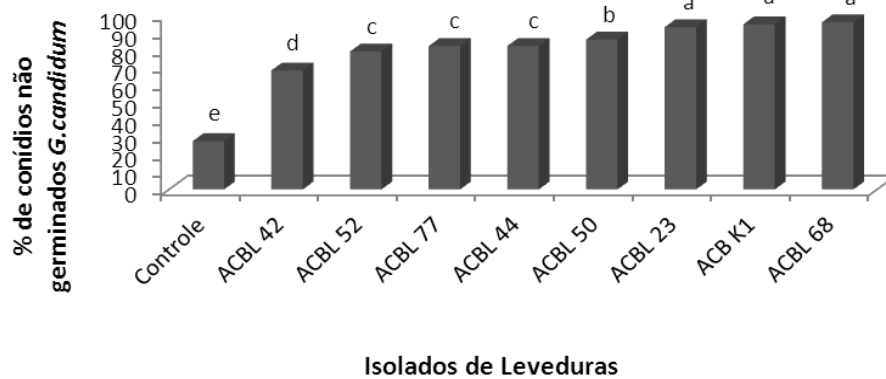


Figura 5. Porcentagem de conídios não germinados do fungo *Geotrichum candidum* sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

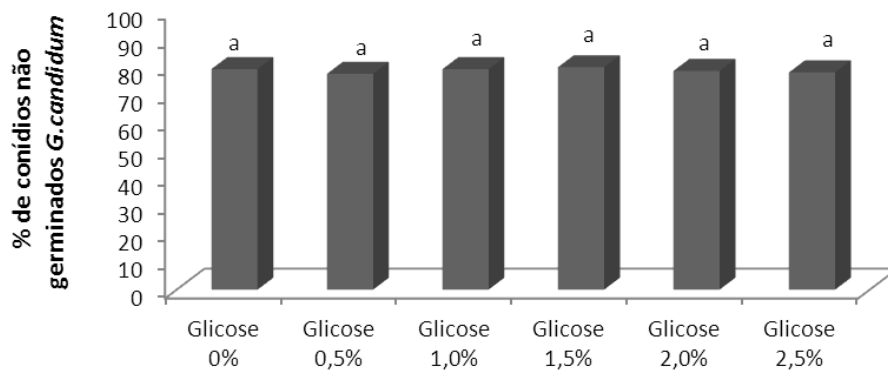


Figura 6. Porcentagem de conídios não germinados do fungo *Geotrichum candidum* sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.4. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo

A avaliação do crescimento micelial do *G. candidum*, após a sua hifa ser retirada da zona de antagonismo, com os diferentes isolados de leveduras, mostrou que com exceção do ACB-K1, os demais isolados de leveduras não afetaram a viabilidade das hifas do fitopatógeno. Quando o fungo foi retirado da região mediana (próxima ao halo de inibição) ou longe da levedura, o crescimento do patógeno não foi afetado, apresentando crescimento normal (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho (cm) da colônia de *Geotrichum candidum*, retirado da zona de antagonismo, da região mediana da interação e longe da levedura, após cultivo pareado entre o patógeno e os agentes de controle biológico.

Isolados de leveduras	Região do halo de inibição	Região Mediana da interação	Região longe da levedura
Controle	8,66 a ⁽²⁾	8,25 a	8,39 a
ACBL-23 ⁽¹⁾	8,28 a	8,52 a	8,50 a
ACBL-42	8,73 a	8,49 a	8,60 a
ACBL-44	8,92 a	8,48 a	8,50 a
ACBL-50	8,31 a	8,57 a	8,28 a
ACBL-52	8,18 a	8,71 a	8,67 a
ACBL-68	8,30 a	8,35 a	8,38 a
ACBL-77	8,23 a	7,61 a	8,18 a
ACB-K1	7,28 b	8,20 a	8,22 a

⁽¹⁾ACBL-44: *Rhodotorula mucilaginosa*; ACBL-50: *Saccharomyces* sp.; ACBL-77: *Sporobolomyces koalae*; ACB-K1: *Saccharomyces cerevisiae*. ⁽²⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.5. Produção de enzimas hidrolíticas

Quando se avaliou a capacidade das leveduras em produzir enzimas hidrolíticas, somente os isolados ACBL-23 e ACB-K1 produziram atividade enzimática para β -1,3-glucanase, enquanto que, com exceção do ACBL-23 e ACBL-44, os demais isolados apresentaram atividade enzimática para quitinase (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de quitinase e β -1,3-Glucanase por isolados de leveduras, avaliada através da produção de açúcar redutor.

Isolados	Quitinase AR(g/L) ⁽¹⁾	β -1,3-Glucanase AR (g/L) ⁽¹⁾
ACBL-23 ⁽²⁾	0	0,004
ACBL-42	0,089	0
ACBL-44	0	0
ACBL-50	0,011	0
ACBL-52	0,001	0
ACBL-68	0,017	0
ACBL-77	0,089	0
ACB-K1	0,067	0,039

⁽¹⁾ AR -Açúcar redutor. ⁽²⁾ ACBL-44: *Rhodotorula mucilaginosa*; ACBL-50: *Saccharomyces* sp.; ACBL-77: *Sporobolomyces koalae*; ACB-K1: *Saccharomyces cerevisiae*.

4. DISCUSSÃO

Compreender o mecanismo de ação de agentes de biocontrole é um pré-requisito para obter isolados antagônicos mais efetivos, além de contribuir para o desenvolvimento de métodos de produção e formulação mais consistentes. Pelos resultados obtidos nesta pesquisa, verificou-se que, com exceção do ACBL-44, que apresentou apenas um mecanismo de ação, os demais isolados de leveduras

apresentaram dois ou mais mecanismos que foram responsáveis no controle do fitopatógeno.

Este estudo mostrou que não houve produção de substâncias antifúngicas (voláteis - Figura 1, livres de células - Figura 2 e termoestáveis - Figura 3) pela maioria dos isolados de leveduras, que pudessem afetar o desenvolvimento de *G. candidum*. Embora o ACBL-52 tenha produzido metabólitos voláteis em quantidades suficientes para reduzir, significativamente, o tamanho da colônia do patógeno, a porcentagem de inibição da colônia foi de apenas 9,3% em relação à colônia do fungo no tratamento testemunha. Esses dados não estão de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura, segundo Bruce et al. (2003) em um estudo sobre a produção de compostos voláteis por leveduras no controle de fitopatógenos, observou-se que a produção de tais compostos pode ser influenciada pelo meio de cultivo. De acordo com os autores, quando *S. cerevisiae* foi cultivada em meio tripton de soja, o microrganismo produziu metabólitos voláteis que inibiu cerca de 75% o crescimento dos fungos causadores de podridões em madeira, dentre eles, *Sclerophoma pithyophila*. Em estudos realizados por Fialho (2005), o autor relatou que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de produzir compostos voláteis que controlaram em até 83% o desenvolvimento do fungo *Phyllosticta citricarpa*. A razão pela qual não foi encontrada produção de compostos voláteis pela maioria dos isolados de leveduras testados em nosso estudo, talvez se deva ao fato da utilização de apenas um meio de cultivo estudado.

Embora a maioria dos isolados de leveduras testados neste trabalho não tenha apresentado produção de compostos antifúngicos, não significa que esses microrganismos não apresentem esse mecanismo de ação. McCormack et al. (1994), por exemplo, ao isolar leveduras habitantes do filo-plano, observaram que *Aureobasidium pullulans*, presente neste ambiente, foi capaz de produzir dois compostos antibióticos, os quais foram isolados e estudados pelos autores.

A competição entre os microrganismos por fatores ambientais essenciais, como nutrientes e espaço, apresenta-se como um dos mecanismos de controle biológico fundamental nos estudos das interações levedura-patógeno (BLEVE et al., 2006). Os dados observados, com relação à avaliação da existência desse mecanismo de ação pelas leveduras do respectivo estudo mostraram que, a

competição por nutrientes não é uma estratégia de controle usada por esses microrganismos, uma vez que, a redução da germinação dos conídios do fitopatógeno não dependeu do aumento da concentração de glicose adicionada ao meio de cultura, sugerindo que a levedura não compete pelos nutrientes do meio com o fungo (Figura 5). Porém, outros autores não corroboram com os nossos resultados. Chanchaichaovivat et al. (2008) ao estudarem os possíveis mecanismos de ação da levedura *Pichia guilliermondii* contra o fungo *Colletotrichum capsici* para controle de antracnose em pimenta, verificaram que, o aumento das concentrações de açúcar reduziu a germinação do conídio do patógeno, sugerindo que a levedura compete pelos nutrientes do meio com o fungo, inibindo seu desenvolvimento. Saravanakumar et al. (2008), estudando um isolado de *Metschnikowia pulcherrima* no controle dos fitopatógenos *Botryti scinerea*, *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*, observaram que a levedura foi capaz de controlar o fungo através da competição por ferro do meio.

De acordo com a literatura, algumas espécies de leveduras podem, ainda, apresentar a habilidade de produzir compostos antimicrobianos, como a toxina *killer*, que pode causar a morte de fungos filamentosos. No respectivo trabalho verificou-se que todas as leveduras testadas mostraram resultados positivos referente ao fator *killer* mostrando ser esse o principal mecanismo de ação adotado no biocontrole de *G. candidum* (Tabela 1). Esses resultados corroboram com os obtidos por outros autores. Walker et al. (1995) foram os pioneiros em constatar a suscetibilidade de fitopatógenos às leveduras micocinogênicas, ampliando as perspectivas de aplicação deste grupo de leveduras. Weiler e Schimitt (2003) obtiveram resultados positivos no controle de *Fusarium oxysporum* com a levedura *killer Zygosaccharomyces bailii*. *Pichia membranifaciens*, através da ação da sua toxina *killer*, foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* (SANTOS et al., 2004). Coelho (2005), em seu estudo do controle de *Penicillium expansum* em maçã, observou que as leveduras *Candida guilliermondii* e *Pichia ohmeri*, ambas *killer*, foram capazes de controlar o fungo em testes *in vitro*.

Um dos objetivos desse estudo foi verificar a produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados de leveduras. Com exceção dos isolados ACBL-23 e o ACBL-44, os demais antagonicos foram capazes de produzir quitinase, quando na presença da

parede do fitopatógeno. Com relação à β -1,3-glucanase, verificou-se que apenas dois isolados (ACBL-23 e ACB-K1) foram capazes de produzir essa enzima (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang et al. (2011) que, ao avaliarem o potencial antagônico de *Pichia guilliermondii* contra *Botrytis cinerea*, verificaram que o controle do patógeno foi em consequência da produção de β -1,3-glucanase e quitinase pela levedura, em meio de cultura contendo a parede celular do fungo, a sacarose ou glicose como fontes de carbono. Saravanakumar et al. (2009) verificaram que a levedura *Metschnikowia pulcherrima* apresentou maior produção de quitinase em relação à *Rhodotorula* sp. e, em quantidade ainda maior, quando na presença da parede celular de *B. cinerea*. A maior produção da enzima por *M. pulcherrima* foi responsável pela maior eficiência de controle do mofo cinzento em maçã.

Alterações nas hifas de *G. candidum* ocorram quando colônias do fungo foram retiradas da zona de antagonismo durante o pareamento com a levedura ACB-K1 e cultivado em um novo meio de cultura, ocasionando, a redução no desenvolvimento da colônia do patógeno. Acredita-se que, essa alteração na hifa possa ter ocorrido pela produção de toxina *killer* pelo antagônico ou, também, pela produção de enzimas hidrolíticas, como a β -1,3-glucanase e quitinase. Não se conhece a natureza da toxina *killer* dos isolados estudados neste trabalho, porém, os componentes da parede celular do patógeno são os locais primários de reconhecimento dessas toxinas e enzimas (Gooday, 1995). Masih et al. (2000) estudaram a ação da levedura *Pichia anomala*, isolada da superfície de maçã, no controle do fungo *B. cinerea*, e observaram deformações na hifa do fungo, quando em contato com as células da levedura, como coagulação e extravasamento do conteúdo citoplasmático.

Nosso estudo sugere que os múltiplos modos de ação, como apresentado pelo ACB-K1, que mostrou produção de duas enzimas hidrolíticas (quitinase e β -1,3-glucanase), atividade *Killer* e inibição da germinação de conídios do fitopatógeno, foram importantes para o potencial de controle de *G. candidum*, fato esse confirmado pela redução da colônia do patógeno, retirada da zona de antagonismo, supondo que possa ter havido alterações de hifas. Por outro lado, todos os isolados de leveduras testados apresentaram atividade *killer*, indicando ser esse o

mecanismo de ação comum adotado pelos isolados no biocontrole. Estudos posteriores são necessários de modo a se conhecer a natureza da toxina *killer* dos isolados estudados neste trabalho.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- a) a atividade *Killer* foi o mecanismo de ação comum adotado pelos isolados de leveduras para o biocontrole de *G. candidum*;
- b) A maioria dos isolados testados apresentou atividade enzimática;
- c) ACB-K1 (*S. cerevisiae*) é um forte candidato a agente de controle biológico da podridão azeda devido aos múltiplos modos de ação que ele apresenta.

6. REFERÊNCIAS

- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, New York, v. 45, n. 3, p. 140-148, 2004.
- BLEVE, G.; GRIECO, F.; COZZI, G.; LOGRIECO, A.; VISCONTI, A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A.niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-209, 2006.
- BROWN, G. E. Sour rot. **Causal organism and disease cycle**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Science Extension Service Fact Sheet, 2003. 137 p.
- BRUCE, A.; DOUGLAS, S.; SUSAN, V.; RON, E. W. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of *sapstain fungi*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 51, n. 2, p. 101-108, 2003.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D.; SILVA, A. C. Determination of yeast *Killer* activity in fermentation sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2004.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; BHINYO, P.; RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling *chilli anthracnose* after harvest. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 47, n. 2, p. 207-215, 2008.

COELHO, A. R. **Controle de *Penicillium expansum* / Biodegradação de Patulina:** perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita. 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

CUNHA, T. **Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros.** 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

DENNIS, C. E.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, [London], v. 57, n. 3, p. 359-363, 1971.

FIALHO, M. B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros.** 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 8, n. 2, p. 243-256, 1998.

FRIGHETTO, R. T. S., MELO, I. S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I. S. DE; SANHUEZA, R. M. V. (Coord.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. p. 40-46. Manual Técnico.

GOODAY, G. W. Cell walls. In: GOW, N. A. R.; GADD, G. M. (Ed.). **The growing fungus.** London: Chapman and Hall, 1995. p. 41-62.

LAHLALI, R.; HAMADI, Y. E. L.; GUILLI, M.; JIJAKLI, M. H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 56, n. 3, p. 217–224, 2011.

MASIH, E. I.; ALIE, I.; PAUL, B. Can the grey mold disease of grape-vine be controlled by yeast? **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v. 189, n. 2, p. 233-237, 2000.

MCCORMACK, P. J.; WILDMAN, H. G.; JEFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, n. 3, p. 927-931, 1994.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Editora Marcos Fava Neves, 2010. 137 p

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

ROSA-MAGRI, M. M.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CECATO-ANTONINI, S. R. C. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 1, p. 1-5, 2011.

SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 4, p. 331-338, 2004.

SARAVANAKUMAR, D.; CIAVORELLA, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 121-128, 2008.

SARAVANAKUMAR, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 2, p. 183–193, 2009.

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between *killer* yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v. 127, n. 3, p. 213-222, 1995.

WEILER, F.; SCHMITT, M. J. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, Chichester, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2003.

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**, Maryland Heights, v. 57, n. 3, p. 193-201, 2011.

CAPÍTULO 3 - Mecanismos de ação de *Saccharomyces* sp. e *Meyerozyma caribbica* envolvidos no biocontrole de *Penicillium digitatum*

Resumo – O bolor verde, causado pelo fungo *Penicillium digitatum*, é considerada a principal doença de pós-colheita de citros. Os fungicidas do grupo dos benzimidazóis são os mais utilizados no Brasil para o seu controle, entretanto, possuem várias restrições de uso, dentre essas, a de selecionar linhagens do patógeno resistentes aos principais princípios ativos utilizados. Dessa maneira, a busca de produtos alternativos para o controle da doença se faz necessário e, dentre esses, a utilização de leveduras tem apresentado potencial de biocontrole de bolores em frutos cítricos. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de ação que estão envolvidos na atividade antagonística. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o modo de ação de oito isolados de leveduras, obtidos do filoplano de plantas cítricas de diferentes municípios do Estado de São Paulo que mostraram potencial de controle do bolor verde. Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram a atividade *Killer* e a produção de quitinase foram os principais mecanismos de ação adotados pelos isolados de leveduras para o biocontrole de *P. digitatum*. Nosso trabalho sugere que os múltiplos modos de ação (produção de toxina *killer*, atividade enzimática e inibição da germinação de conídios do patógeno) apresentados pelo ACBL-80 (*Saccharomyces* sp.), ACBL-82 (*Saccharomyces* sp.) e ACBL-86 (*Meyerozyma caribbica*), possibilitam a esses microrganismos serem fortes candidatos a agentes de controle biológico do bolor verde.

“Palavras-chave”: Germinação, Atividade *Killer*; Enzimas Hidrolíticas

CHAPTER 3 - Action mechanisms of *Saccharomyces* sp. and *Meyerozyma caribbica* involved in the biocontrol of *Penicillium digitatum*

Abstract - Green mold, caused by *Penicillium digitatum*, is considered the main postharvest disease of citrus. Fungicides benzimidazoles group are the most used in Brazil for its control, however, have several restrictions on use, among these, to select resistant strains of the pathogen main active ingredient. Thus, the search for alternative products for disease control is necessary and, among these, the use of yeast has shown potential biocontrol fungi in citrus fruits. However, only a few are known about the mechanisms involved in the antagonistic activity. So the present study aimed to evaluate the mode of action of eight strains of yeast, obtained from the phylloplane of citrus plants from different counties of São Paulo that showed potential for control of green mold. The results obtained in this study showed a *Killer* activity and chitinase production were the main mechanisms of action adopted by the yeast isolates for the biocontrol of *P. digitatum*. This work suggests that multiple modes of action (*killer* toxin production, enzyme activity and inhibition of conidial germination of the pathogen) presented by ACBL-80 (*Saccharomyces* sp.), ACBL-82 (*Saccharomyces* sp.) and ACBL-86 (*Meyerozyma caribbica*), enable these microorganisms are strong candidates for biological control agents of green mold.

“Keywords”: Germination, Factor *Killer*, *Enzymes hydrolytic*

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de citros é de aproximadamente 102 milhões toneladas por ano e é oriunda de extensa área cultivada, com 7,3 milhões de ha, superando grande parte de outras fruteiras tropicais e subtropicais como a banana, maçã, manga, pêra, pêssego e mamão. Os maiores países produtores de laranjas são o Brasil e os Estados Unidos, que juntos representam cerca de 45% do total mundial (MATTOS, 2012). Diante da importância econômica que o setor citrícola representa para a economia nacional, preocupações com a obtenção de frutas cítricas isentas de resíduos de agrotóxicos, têm levado agricultores e pesquisadores a buscarem estratégias de controle viáveis e, dentre essas a utilização de leveduras tem mostrado potencial para o controle das doenças que ocorrem na pós-colheita.

O fungo *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde, é considerado o principal patógeno de pós-colheita de citros e está disseminado em todos os países produtores, afetando todas as espécies e variedades cítricas (ECKERT; EAKS, 1989). O fitopatógeno ocasiona uma podridão mole no fruto, recobrando-o com micélio branco e grande número de esporos, os quais lhe dão uma coloração verde. A ocorrência da doença depende muito das condições climáticas e da forma de manipulação dos frutos, desde a colheita até o consumidor, já que a infecção ocorre mediante ferimentos na casca do fruto (LARANJEIRA et al., 2005).

Como forma de controlar esse patógeno, são utilizados o tratamento químico, a irradiação, a termoterapia e práticas culturais para reduzir o inóculo que vem do campo. Os tratamentos químicos são os mais comumente utilizados, em pré e pós-colheita. Sendo os fungicidas do grupo dos benzimidazóis os mais utilizados no Brasil para o controle desta doença. No entanto, estes princípios ativos possuem várias restrições de uso, devido à seleção de linhagens de *Penicillium* resistentes pelo patógeno com o uso exagerado destes produtos (BUS et al., 1991; ZHU et al., 2006; SCHMIDT et al., 2006; BOUBAKER et al., 2009). A situação se agrava no caso de frutos para exportação, uma vez que existem diferenças entre as legislações dos países consumidores quanto à aceitação de determinados fungicidas, bem como, na concentração de resíduos tolerada nos frutos (FRANCO; BETTIOL, 2000).

Com alternativa de controle, as leveduras são potencialmente efetivas, pois são fenotipicamente mais adaptadas nas superfícies de folhas, fruto e vegetais, além de serem hábeis na colonização e competição por espaço e nutrientes (FILONOW, 1998), o que dá a esse grupo de microrganismos vantagens quanto à utilização como agentes de biocontrole de patógenos na pós-colheita.

Apesar do conhecimento sobre algumas funções das leveduras no ambiente, muito ainda há para ser descoberto, principalmente sobre os seus mecanismos de ação em diferentes ambientes e no antagonismo a outros organismos (ROSA-MAGRI et al. 2011). Estes agentes biológicos podem atuar na prevenção da infecção, na redução da colonização de tecidos no hospedeiro, na redução da esporulação ou na sobrevivência do patógeno, podendo proporcionar diferentes níveis de controle (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar os mecanismos de ação de oito isolados de leveduras que apresentam potencial para o biocontrole do bolor verde em frutos cítricos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Os isolados de leveduras (ACBL-76 (*Saccharomyces sp.*); ACBL-78; ACBL-80 (*Saccharomyces sp.*); ACBL-81 (*Saccharomyces sp.*); ACBL-82- (*Saccharomyces sp.*); ACBL- 84 (*Candida stellimalicola*); ACBL-86 (*Meyerozyma caribbica*); ACBL-87) e o isolado de *Penicillium digitatum*, utilizados neste estudo, pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil. Os isolados de leveduras utilizados neste estudo foram obtidos de 14 municípios do Estado de São Paulo e, após estudos prévios de antagonismo *in vitro* e *in vivo* foram selecionados como agentes potenciais para o biocontrole do bolor verde em frutos cítricos (CUNHA, 2013).

2.2. Produção de compostos antifúngicos

2.2.1. Produção de compostos antifúngicos voláteis

Para a determinação da produção de compostos voláteis cultivou-se o fungo simultaneamente com os isolados de leveduras, utilizando placas bipartidas, as quais impedem que exsudatos não voláteis produzidos pela levedura tenham contato com o fungo através do meio de cultura. Para tal, um disco de 5 mm de diâmetro de *P. digitatum* mais o meio de cultura foi depositado em um dos lados da placa contendo meio de cultura BDA, e do outro lado um disco do mesmo tamanho contendo cada isolado de levedura foi depositado sobre o meio de cultura YEPD. Após 10 dias de incubação das culturas a 26 °C foi realizada a avaliação, medindo-se o diâmetro micelial do *P. digitatum* em dois sentidos perpendiculares e, comparada ao cultivo do fungo na placa controle (sem a presença da levedura).

2.2.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura

Para cada isolado de levedura, uma alçada do microrganismo foi retirada de colônia ativa (48 horas de cultivo em YEPD) e transferida para frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD e, posteriormente, a cultura foi incubada sob agitação a 150 rpm, na ausência de luz por 72 horas.

Em seguida, a cultura correspondente a cada isolado foi filtrada em papel de filtro (Whatman n° 4) e em membrana Millipore® (0,45 µM), a fim de se obter um filtrado livre de células de levedura (adaptação da técnica de Frighetto e Melo, (1995). Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para 90 mL de BDA fundente. Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos em placas de Petri e, após a solidificação, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro, contendo o fitopatógeno, foi transferido para o centro das placas. O controle correspondeu ao fitopatógeno cultivado em meio BDA sem a adição dos filtrados de células. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 26 °C durante sete dias em fotoperíodo de 12h e, a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia do *P. digitatum*.

2.2.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Para cada isolado de levedura um disco de meio com o crescimento do microrganismo foi colocado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD, e incubado sob agitação de 150 rpm, no escuro por 72 horas, como citado no item 2.2.2. Em seguida, amostras de 10 mL de cada isolado de levedura foram transferidas para frascos contendo 90 mL de BDA e, esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos para placas de Petri e, após a solidificação dos meios, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro contendo o fitopatógeno foi transferido para o centro das placas. O controle correspondeu ao patógeno crescido em meio BDA sem a presença dos metabólitos. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 26 °C durante sete dias e, a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia de *P. digitatum*,

2.3. Detecção da atividade *Killer*

Para esse ensaio foi preparado, inicialmente, uma suspensão (1×10^5 células mL^{-1}) de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 (sensível ao fator *killer*), após cultivo em meio YEPD por 24 horas à 28 °C. Uma alíquota de 100 μL desta suspensão foi, então, espalhada sobre o meio de cultura YEPD + azul de metileno, tamponado a pH 4,3-4,7, segundo a metodologia descrita por Ceccato-Antonini et al. (2004). Após secagem, os isolados de leveduras, a serem testados quanto à presença do fator *killer*, foram inoculados com palitos estéreis (em pontos), sendo a seguir, as culturas incubadas a 28 °C, por três dias. Os isolados foram considerados micocinogênicos (produtores de toxina *Killer*) quando produziram um halo de inibição de crescimento e zona azul adjacente, indicando a morte celular da levedura sensível.

2.4. Competição por nutrientes

Para a detecção da competição de nutrientes, entre o *P. digitatum* e a levedura antagonista, lâminas de microscopia contendo meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose (0,0; 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 %) foram preparadas. Posteriormente, 10 µL de uma suspensão de 1×10^5 conídios mL⁻¹ do fitopatógeno e 10 µL de uma suspensão de 1×10^8 células mL⁻¹ de cada isolado de levedura foram depositados em locais pré demarcados das lâminas. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 26°C por 16 horas. A avaliação procedeu através da contagem de conídios germinados e não germinados, num total de 100 conídios avaliados ao acaso. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo encontrava-se maior ou igual ao tamanho do conídio.

2.5. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo

Os isolados de leveduras foram pareados com o *P. digitatum* seguindo a metodologia descrita por Dennis e Webster, (1971). O teste foi realizado em placa de Petri, em meio de cultura BDA, no qual foi colocado de um lado, o fitopatógeno (disco de micélio com 5 mm de diâmetro) e à 3 cm de distância foi depositada a levedura (disco de 5 mm de diâmetro).

A partir da observação do halo de inibição entre os isolados de leveduras antagonistas e o fungo após cultivo pareado em placa de Petri, foi realizado um experimento para quantificar o crescimento micelial do patógeno retirado da zona de antagonismo (micélio localizado adjacente do halo de inibição de crescimento fúngico), com o intuito de verificar se as hifas encontravam-se viáveis. Com o objetivo de comparação do crescimento micelial, foram realizadas retiradas de micélio fúngico (disco de 5 mm de diâmetro) de placas apresentando antagonismo, de três diferentes locais: na região de inibição, na região mediana (próxima ao halo de inibição) e, para fins de comparação, do micélio longe da levedura (onde o micélio não está sofrendo a ação inibitória da levedura). As culturas foram incubadas por 10 dias em estufa para BOD a 26 °C em fotoperíodo 12 horas. A avaliação

constou da medição do diâmetro do crescimento micelial do patógeno, em dois sentidos perpendiculares.

2.6. Produção de enzimas hidrolíticas

Este experimento teve por objetivo avaliar a produção e liberação de enzimas hidrolíticas pelos isolados de leveduras, seguindo a metodologia de Fialho et al. (2005). Os isolados foram transferidos através de uma alça de inoculação para 20 mL de meio YEPD líquido e incubados sob agitação constante de 150 rpm por 72 horas no escuro. Após esse período, 1 mL da suspensão foi transferida para tubos Falcon de 15 mL contendo 10 mL de meio YEPD e YEPD modificado (com preparado de parede celular do fungo testado, a 1% em substituição à glicose). O cultivo foi realizado em triplicata, sob agitação a 150 rpm. No tempo de 24 horas de incubação, uma amostra de 1,5 mL foi retirada e centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e utilizado para análise das atividades de β -1,3-glucanase e quitinase.

2.6.1. Preparo de parede celular (PPC)

Para a preparação da parede celular (PPC), 1 mL da suspensão de esporos (1×10^5 esporos mL⁻¹) do fitopatógeno foi cultivado em 50 mL de meio batata dextrose por oito dias, sob agitação constante à 150 rpm. O micélio fúngico foi coletado por filtração em papel de filtro Whatman (nº 1), lavado três vezes com água destilada e homogeneizado em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) por 2 minutos e mantido a -20 °C *overnight*. Posteriormente, o material foi descongelado e novamente homogeneizado. Em seguida, aproximadamente 20 mL do micélio fúngico foi transferido para um frasco onde foi macerado com nitrogênio líquido e a parede celular do fungo foi armazenada em freezer -80 °C para utilização posterior. Metodologia adaptada de Bar-Simon et al. (2004).

2.7. Atividades enzimáticas

2.7.1. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores, liberados durante os ensaios enzimáticos, foi realizada segundo a metodologia descrita por Miller (1959), utilizando o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS). Para tal, 250 µL da mistura de reação foram adicionados a 250 µL do reagente ADNS e a solução foi aquecida em banho com água fervente por 10 minutos. Após o resfriamento em gelo, até a temperatura de 25 °C, a solução foi diluída com 2,5 mL de água destilada homogeneizada e foi determinada a absorbância a 540 nm, contra o branco apropriado.

2.7.2. Determinação da atividade enzimática - β -1,3-glucanase

Para a avaliação da produção de β -1,3-glucanase foi utilizada a técnica de quantificação colorimétrica de glicose liberada do substrato laminarina, através da dosagem de açúcares redutores (item 2.7.1). A reação foi realizada com 200 µL de tampão McIlvaine, pH 6,0; 100 µL da amostra de cultivo e 100 µL de laminarina (4 mg mL⁻¹). A mistura da reação foi incubada a 50 °C por 1 hora. Após esse período, a reação foi paralisada com a da adição de 200 µL do reagente ADNS à mistura da reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados. A leitura de absorbância a 540 nm foi feita contra a mistura de reação contendo tampão em substituição ao meio de cultivo, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle negativo que consistiu na mistura da reação na presença de tampão substituindo o substrato. As leituras de absorbâncias foram plotadas em curva padrão para glicose e a atividade enzimática foi expressa em U/L, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1g de açúcar redutor liberado (glicose) da laminarina nas condições de ensaio.

2.7.3. Determinação da atividade enzimática – quitinase

A avaliação da produção de quitinase foi realizada pela técnica de N-acetil glucosamina (NAG), a partir do substrato glicol quitina. Para a realização da análise, 100 µL da amostra de meio de cultivo da levedura foram misturados com 200 µL de tampão McIlvaine, pH 6,0 e 100 µL de glicol quitina 0,01% (p/v) neste mesmo tampão. Após incubação por 60 minutos a 50 °C, a reação foi interrompida pela adição de 200 µL do reagente ADNS à mistura de reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados, como citado anteriormente (item 2.7.1). A cubeta de referência (branco) consistiu na mistura da reação na presença tampão em substituição ao meio de cultivo. O valor da leitura foi subtraído do obtido pelo controle negativo que apresentou o tampão em substituição ao substrato (glicol quitina). A atividade enzimática foi expressa em U/L, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1g de açúcar redutor liberado (N-acetilglucosamina) enzimaticamente da glicol quitina, nas condições do ensaio.

2.8. Análises Estatísticas

Para todos os ensaios de produção de compostos antifúngicos e para a análise de crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para o teste de competição por nutrientes, utilizou-se um esquema fatorial com oito repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. As análises foram realizadas utilizando o software ASSISTAT.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de Compostos antifúngicos

3.1.1. Produção de Compostos antifúngicos voláteis

No ensaio realizado para determinação de compostos antifúngicos voláteis, os resultados obtidos mostraram que, os isolados de leveduras não foram capazes de produzir metabólitos voláteis que afetassem o tamanho da colônia do patógeno (Figura 1).

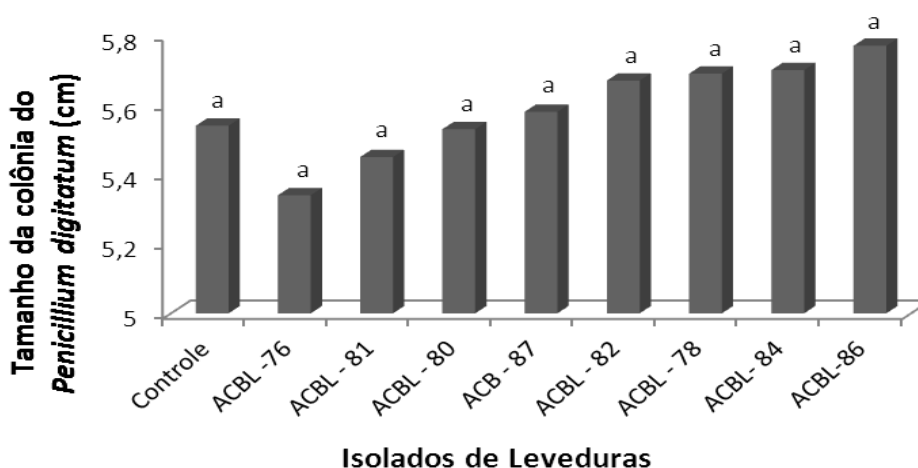


Figura 1. Tamanho da colônia de *Penicillium digitatum* sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.1.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células de leveduras

No teste de compostos antifúngicos livres de células, os resultados apresentados na Figura 2 mostraram que somente os isolados ACBL-78 e ACBL-80 (*Saccharomyces* sp). produziram compostos antifúngicos livres de células que reduziram o tamanho da colônia do patógeno.

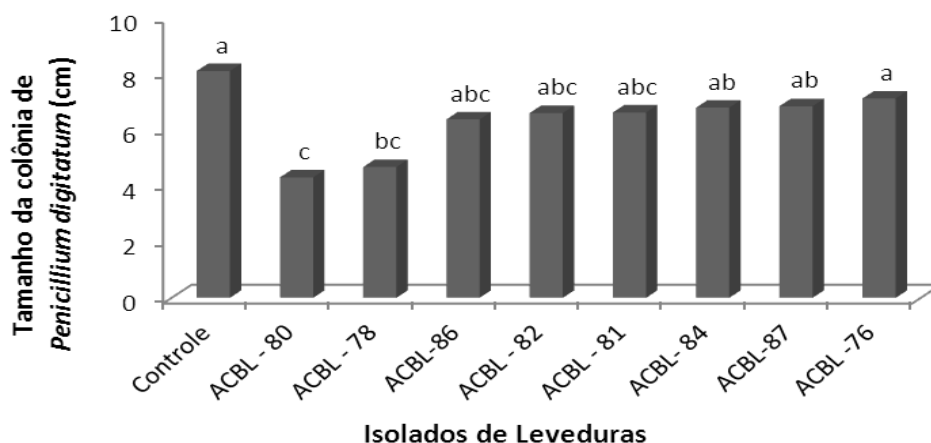


Figura 2. Tamanho da colônia de *Penicillium digitatum* sob influência de compostos antifúngicos livres de células produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.1.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Com relação ao teste de compostos antifúngicos termoestáveis, os dados obtidos mostraram que os isolados de leveduras ACBL-76 (*Saccharomyces* sp.), ACBL-81 (*Saccharomyces* sp.), ACBL-82 (*Saccharomyces* sp.) e ACBL-84 (*Candida stellimalicola*) produziram metabólitos termoestáveis que reduziram, significativamente, o tamanho da colônia do patógeno (Figura 3).

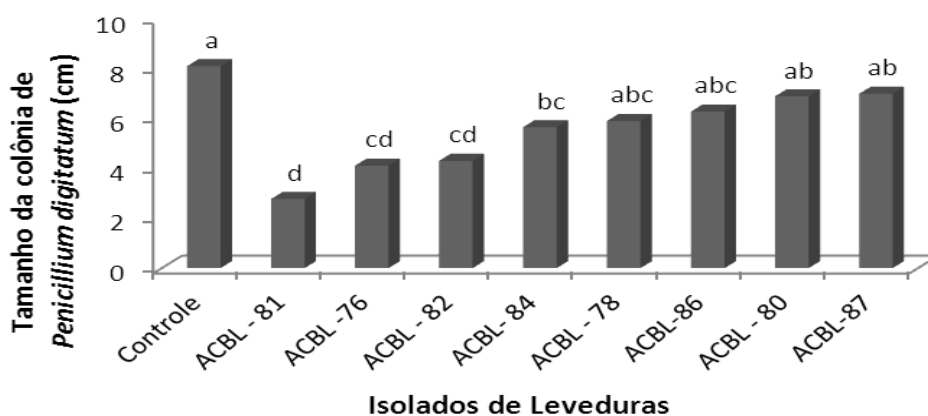


Figura 3. Tamanho da colônia de *Penicillium digitatum* sob influência de compostos antifúngicos termoestáveis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.2. Detecção da atividade *Killer*

No ensaio utilizado para se determinar a atividade *Killer* pelas leveduras testadas, observou-se que todos os isolados apresentaram resultados positivos quanto à atividade *killer*. Como observado na Tabela 1, isolados apresentaram linha ou zona azul (morte celular) ou zona clara (inibição, porém sem morte celular) ao redor da colônia, indicando a ação *killer* sobre a levedura sensível (Figura 4).

Tabela 1. Atividade *killer* dos isolados de leveduras em relação à levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006 em meio YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5.

Isolados de leveduras	Atividade <i>Killer</i>
ACBL-76 ⁽¹⁾	Zona Clara
ACBL-78	Zona Azul
ACBL-80	Zona Clara
ACBL-81	Zona Clara; Zona Azul, Halo
ACBL-82	Zona Clara
ACBL-84	Linha Azul
ACBL-86	Zona Azul
ACBL-87	Zona Clara; Linha Azul

⁽¹⁾ACBL-76: *Saccharomyces* sp.; ACBL-80: *Saccharomyces* sp.; ACBL-81: *Saccharomyces* sp., ACBL-82: *Saccharomyces* sp.; ACBL-84: *Candida stellimalicola*; ACBL-86: *Meyerozyma caribbica*.

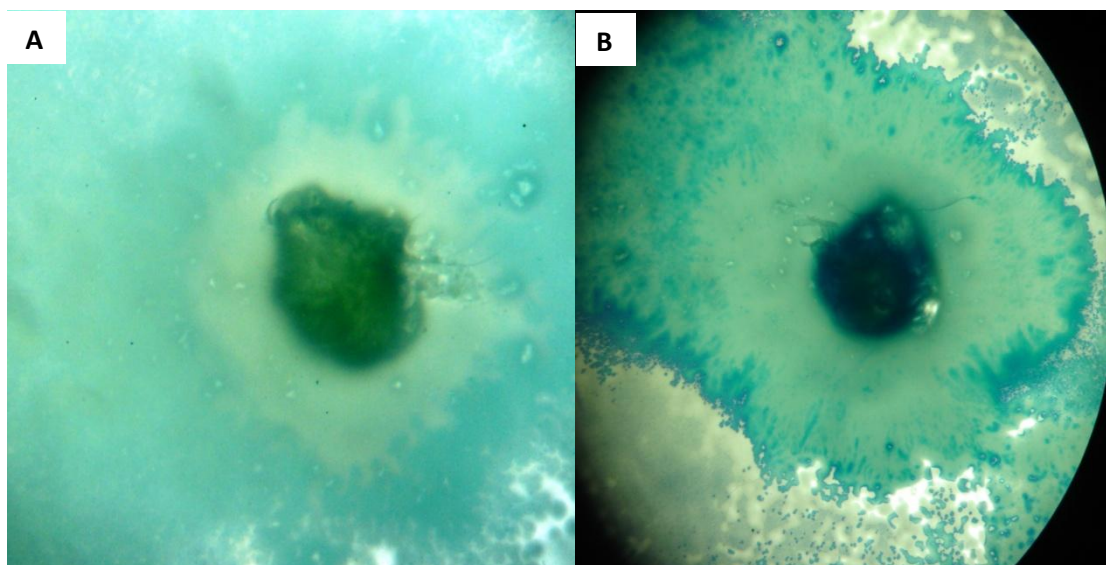


Figura 4. Atividade *killer* do ACBL-80 (*Saccharomyces* sp.), mostrando a zona clara (inibição da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28°C, pH 4,5 (A). Atividade *Killer* do ACBL- 81 (*Saccharomyces* sp.), mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (B).

3.3. Competição por nutrientes

No ensaio realizado para determinar se as leveduras testadas competem por nutrientes com o fitopatógeno, os resultados mostraram que, todos os isolados de leveduras inibiram a germinação dos conídios de *P. digitatum* (Figura 5). Os isolados ACBL-84 (*Candida stellimalicola*), ACBL-78, ACBL-76 (*Saccharomyces* sp.) foram os que proporcionaram maiores valores de inibições da germinação de conídios do patógeno, proporcionando 96,63%, 94,81% e 94,26% de inibição, respectivamente. A inibição de conídios foi diminuindo conforme foi aumentando a concentração de glicose (Figura 6).

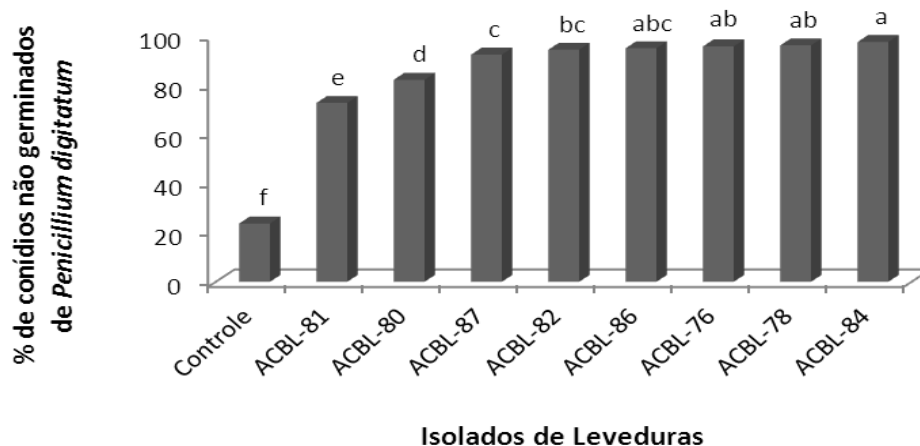


Figura 5. Porcentagem de conídios não germinados do fungo *Penicillium digitatum* sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 26 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

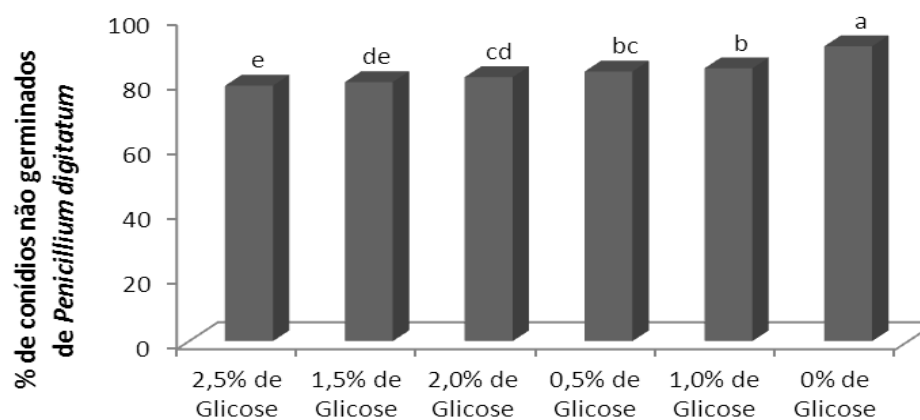


Figura 6. Porcentagem de conídios não germinados do fungo *Penicillium digitatum* sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 26 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.4. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo

A avaliação do crescimento micelial do *P. digitatum*, após a sua hifa ser retirada da zona de antagonismo, com os diferentes isolados de leveduras, mostrou que os isolados de leveduras não afetaram a viabilidade das hifas do fitopatógeno. Quando o fungo foi retirado da região mediana (próxima ao halo de inibição) ou longe da levedura, o crescimento do patógeno não foi afetado, apresentando crescimento normal (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho (cm) da colônia de *P. digitatum*, retirado da zona de antagonismo, da região mediana da interação e longe da levedura, após cultivo pareado entre o patógeno e os agentes de controle biológico.

Isolados de leveduras	Região do halo de inibição	Região Mediana da interação	Região longe da levedura
Controle	7,69 a ⁽²⁾	7,99 a	7,89 ab
ACBL-76 ⁽¹⁾	7,15 a	6,94 a	8,24 a
ACBL-78	7,57 a	7,83 a	7,97 ab
ACBL-80	6,78 a	7,95 a	6,28 b
ACBL-81	7,04 a	6,87 a	7,79 ab
ACBL-82	7,85 a	6,78 a	7,63 ab
ACBL-84	8,28 a	7,41 a	8,15 a
ACBL-86	8,30 a	6,90 a	6,99 ab
ACBL-87	7,62 a	7,64 a	8,18 a

⁽¹⁾ACBL-76: *Saccharomyces* sp.; ACBL-80: *Saccharomyces* sp.; ACBL-81: *Saccharomyces* sp., ACBL-82: *Saccharomyces* sp.; ACBL-84: *Candida stellimalicola*; ACBL-86: *Meyerozyma caribbica*.⁽²⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.5. Produção de enzimas hidrolíticas

Para o ensaio onde se determinou a capacidade dos isolados de levedura produzirem enzimas hidrolíticas, verificou-se que todos produziram atividade

enzimática para quitinase. No entanto, os isolados de levedura não apresentaram atividade enzimática para β -1,3-glucanase (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de quitinase e β -1,3-Glucanase por isolados de leveduras, avaliada através da produção de açúcar.

Isolados	Quitinase AR(g/L) ⁽¹⁾	β -1,3-Glucanase AR (g/L) ⁽¹⁾
ACBL-76 ⁽²⁾	0,074	0
ACBL-78	0,059	0
ACBL-80	0,06	0
ACBL-81	0,064	0
ACBL-82	0,073	0
ACBL-84	0,079	0
ACBL-86	0,055	0
ACBL-87	0,063	0

⁽¹⁾AR-Açúcar redutor. ⁽²⁾ ACBL-76: *Saccharomyces* sp.; ACBL-80: *Saccharomyces* sp.; ACBL-81: *Saccharomyces* sp., ACBL-82: *Saccharomyces* sp.; ACBL-84: *Candida stellimalicola*; ACBL-86: *Meyerozyma caribbica*.

4. DISCUSSÃO

O respectivo estudo teve como objetivo avaliar os mecanismos de ação de oito isolados de leveduras que apresentam potencial para o biocontrole do bolor verde em frutos cítricos. Compreender o mecanismo de ação de agentes de biocontrole é importante, principalmente, quando se pretendem obter métodos de produção e formulações de bioprodutos mais consistentes.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que, com exceção do ACBL-86 (*Meyerozyma caribbica*) e ACBL-87, os demais isolados de leveduras produziram substâncias antifúngicas em quantidades suficientes para inibirem o desenvolvimento micelial de *P. digitatum*. ACBL-76, ACBL-81, ACBL-82

(*Saccharomyces* sp.) e ACBL-84 (*Candida stellimalicola*), produziram substâncias que apresentaram atividade antimicrobiana somente quando as mesmas foram submetidas à alta temperatura (Figura 3). Possivelmente, componentes presentes nas células dessas leveduras foram responsáveis pelo antagonismo quando as mesmas foram liberadas ao meio de cultura após a autoclavagem. Por outro lado, embora os isolados ACBL-78 e ACBL-80 (*Saccharomyces* sp.) tenham produzidos metabólitos livres de células do antagonístico que afetaram o desenvolvimento do patógeno, essas substâncias não suportaram a alta temperatura (Figura 2). Lima et al. (2013) ao estudarem a produção de compostos antifúngicos por leveduras, verificaram que suspensões livres de células e de metabólitos termoestáveis não tiveram nenhum efeito no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, não corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Verificou-se que, todas as leveduras testadas mostraram resultados positivos referente ao fator *killer* mostrando ser esse o principal mecanismo de ação adotado no biocontrole de *P. digitatum* (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores. Segundo Platania et al. (2012), *Wickerhamomyces anomalus*, quando cultivado sobre meio acidificado, demonstrou atividade micocinogênica contra *P. digitatum*, como indicado pelo grande halo de inibição e danos sobre as hifas do fitopatógeno em decorrência da atividade de β -Glucanase. Portes et al. (2013) também avaliaram o antagonismo das leveduras *Candida glabrata*, *C. albidans*, *S. cerevisiae* e *Pichia kluyveri*, produtoras de toxina *killer* contra *P. expansum* e *Aspergillus ochraceus*, observando que tal produção foi eficiente no controle dos dois fitopatógenos.

A competição por nutrientes não foi um dos mecanismos de ação adotado pelas leveduras testadas neste estudo, uma vez que, o aumento da concentração de glicose não favoreceu o antagonismo (Figura 5 e 6). Dados similares foram obtidos por Lutz et al. (2013), onde relataram que a capacidade de biocontrole de várias leveduras à *P. expansum* foi significativamente afetada, de forma negativa, na presença de uma fonte de açúcar. Porém, outros autores não corroboram com esses resultados. Castoria et al. (2001), por exemplo, relataram ser a competição por nutrientes um dos mecanismos de ação da levedura *Aureobasidium pullulans* (LS-30), um antagonista importante de vários patógenos que ocorrem na pós-colheita,

como *Botrytis cinerea*, *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*. Mekbib et al. (2011) ao estudarem o modo de ação das leveduras *Cryptococcus laurentii* e *C. sake* para controle de *P. digitatum*, notaram que a competição por nutrientes (extrato de casca de laranja e extrato de malte) é provavelmente o principal modo de ação desses microrganismos, pois favoreceram a ação antagônica das leveduras na inibição da germinação do patógeno. Resultados semelhantes, também, foram relatados por Bautista-Rosales et al. (2013) ao estudarem o mecanismo de ação de *Meyerozyma caribbica* no controle de *C. gloeosporioides*, onde a competição por nutrientes, principalmente quando a sacarose foi usada como fonte de carbono, foi apontada como um dos principais modo de ação da levedura.

A maioria dos isolados de leveduras testada apresentou múltiplos mecanismos de ação que possam estar envolvidos na eficiência de biocontrole de *P. digitatum*. Resultados indicaram que os mecanismos de ação, tais como, a produção de substâncias antifúngicas, atividade *killer*, atividade enzimática (produção de quitinase) e a inibição da germinação de conídios do patógeno foram as atividades mais importantes apresentadas pelas leveduras, o que poderia explicar as porcentagens de inibições (acima de 80%) das colônias de *Penicillium* promovidas pelos isolados ACBL-82 (*Saccharomyces* sp.), ACBL-84 (*Candida stellimalicola*) e ACBL-76 (*Saccharomyces* sp.), assim como, pela eficiência de controle in vivo pelos isolados ACBL-80, ACBL-82 (*Saccharomyces* sp.) e ACBL-86 (*M. caribbica*) (CUNHA, 2013). Dados semelhantes foram encontrados por Lutz et al. (2013) ao estudarem os possíveis mecanismos de ação associados ao biocontrole das leveduras *Cryptococcus albidus*, *Pichia membranifaciens* e *Cryptococcus victoriae* contra *P. expansum* e *B. cinerea*. Segundo os autores, os isolados de leveduras exibiram diferentes mecanismos, tais como, a colonização de ferimentos, inibição da germinação, secreção de toxinas *killer* e, principalmente, a produção de enzimas hidrolíticas, como protease, quitinase e glucanase. A produção de quitinase por leveduras (*Metschnikowia pulcherrima* e *Rhodotorula* sp.) também foi constatado por Saravanakumar et al. (2009) contra *B. cinerea* em maçãs. Os autores notaram que *M. pulcherrima* apresentou maior produção da enzima em relação a *Rhodotorula* sp., quando na presença da parede celular do fitopatógeno, como observado no

presente estudo, onde todos os isolados de leveduras testados apresentaram produção de quitinase na presença da parede de *Penicillium* (Tabela 3).

Nosso estudo sugere que os isolados ACBL-80 (*Saccharomyces* sp.), ACBL-82 (*Saccharomyces* sp.) e ACBL-86 (*M. caribbica*) apresentam potencial para o biocontrole de *P. digitatum*, uma vez que, os mesmos apresentaram múltiplos mecanismos de ação, tais como, produção de toxina *killer*, atividade enzimática (produção de quitinase) e inibição da germinação de conídios do patógeno; além da produção de substâncias antifúngicas pelos isolados *Saccharomyces* sp (ACBL-80 e ACBL-82). Estudos posteriores são necessários de modo a se conhecer a natureza da toxina *killer* dos isolados estudados neste trabalho.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- a) a atividade *Killer* e a produção de quitinase foram os principais mecanismos de ação adotados pelos isolados de leveduras para o biocontrole de *P. digitatum*;
- b) os múltiplos modos de ação (produção de toxina *killer*, atividade enzimática e inibição da germinação de conídios do patógeno) apresentados pelo ACBL-80 (*Saccharomyces* sp.), ACBL-82 (*Saccharomyces* sp.) e ACBL-86 (*M. caribbica*), possibilitam a eles serem fortes candidatos a agentes de controle biológico do bolor verde.

6. REFERÊNCIAS

BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, New York, v. 45, n. 3, p. 140-148, 2004.

BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 65, n. 3, p. 293–301, 2013.

BOUBAKER, H.; SAADI, B.; BOUDYACH, E. H.; BENAOUMAR, A. A. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to imazalil and thiabendazole in Morocco. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 8, n. 4, p. 152-158, 2009.

BUS, V. G.; BONGERS, A. J.; RISSE, L. A. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 11, p. 1098-1100, 1991.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonistic of postharvest pathogens of fruits: study on its mode of action. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2001.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D.; SILVA, A. C. Determination of yeast Killer activity in fermentation sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2004.

CUNHA, T. **Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros**. 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

DENNIS, C. E.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, [London], v. 57, n. 3, p. 359-363, 1971.

ECKERT, J. W.; EAKS, I. L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: REUTER, W.; CALAVAN, E. C.; CARMAN, G. E. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1989. v. 5.

FIALHO, M. B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 8, n. 2, p. 243-256, 1998.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. **Controle de bolor verde em pós-colheita de citros com produtos alternativos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 1-4. (Pesquisa em Andamento, 10). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/14565/1/controldebolor.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2014.

FRIGHETTO, R. T. S.; MELO, I. S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I. S. de; SANHUEZA, R. M. V. (Coord.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. p. 40-46. Manual Técnico.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLLETA FILHO, H. D. Fungos, procaríotos e doença abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, 2005. cap. 18, p. 509-566.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. R. B.; BRANDÃO, L. R.; ROSA, C. A.; VIANA, F. M. P. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 53, n. 7, p. 590-599, 2013.

LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; RODRIGUEZ, M. E.; SOSA, M. C.; SANGORRÍN, M. P. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 2-3, p. 166-172, 2013.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Introdução citricultura**. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundag, 2012.

MEKBIB, S. B.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Efficacy and mode of action of yeasts antagonistics for control of *Penicillium digitatum* in oranges. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, n. 4, p. 233-240, 2011.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco Orange fruit (*Citrus sinensis*). **Biological Control**, Maryland Heights, v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

PORTES, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; SIMER, P.; LUNKES, A. M.; COELHO, A. R. Role of killer factors in the inhibitory activity of bio-control yeasts against *Penicillium expansum* and *Aspergillus ochraceus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 4, p. 619-627, 2013.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

ROSA-MAGRI, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; ANTONINI, S. R. C. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 1, p. 1-5, 2011.

SARAVANAKUMAR, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 2, p. 183–193, 2009.

SCHMIDT, L. S.; GHOSOPH, J. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Mutation at β -tubulin codon 200 indicated thiabendazole resistance in *Penicillium digitatum* collected from California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 765-777, 2006.

ZHU, J. W.; XIE, Q. Y.; LI, H. Y. Occurrence of imazalil-resistance biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistance molecular mechanism. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 7, n. 2, p. 362-365, 2006. Supplement.

CAPÍTULO 4 - Modo de ação de *Candida stellimalicola* envolvido no biocontrole de *Penicillium italicum*, agente causal do bolor azul em frutos cítricos

Resumo - O bolor azul, ocasionado pelo fungo *Penicillium italicum*, é uma das principais doenças que ocorrem na fase de pós-colheita em frutos cítricos. Atualmente, o controle do bolor azul ocorre principalmente pela utilização de fungicidas sintéticos, tais como o Imazalil e Tiabendazol. Entretanto, são necessários métodos alternativos para o controle da doença, principalmente devido à preocupação com a contaminação do ambiente, ao desenvolvimento de linhagens do patógeno resistentes aos princípios ativos e aos riscos para a saúde humana e ao meio ambiente. Espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de controle biológico na busca de métodos e estratégias de controle da doença. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar os mecanismos de ação de oito isolados de leveduras, obtidos do filoplano de plantas cítricas e, que em ensaios prévios mostraram ser eficientes no controle da doença. Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que a maioria dos isolados de leveduras avaliados não produziu substâncias antifúngicas, em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento do fitopatógeno. A competição por nutrientes não é uma estratégia de biocontrole usada pelas leveduras. A atividade *killer* é o principal mecanismo de ação envolvido no biocontrole de *P. italicum*. Isolados de *Candida stellimalicola* (ACBL-04 e ACBL-07) apresentaram múltiplos modos de ação contra o fitopatógeno, podendo os mesmos serem considerados como fortes candidatos a agentes de controle biológico para o bolor azul.

“Palavras-chave”: Controle Biológico, atividade *Killer*, quitinase.

CHAPTER 4 - Action mode of *Candida stellimalicola* involved in the biocontrol of *Penicillium italicum*, the causal agent of blue mold in citrus fruits

Abstract – Blue mold, caused by *Penicillium italicum*, is main diseases that occur in the post -harvest citrus fruits. Currently, the control of blue mold occurs mainly through the use of fungicides such as imazalil and Thiabendazole. However, alternative ways to control the disease is needed, mainly due to concerns about environment contamination, the development of resistant strains of the pathogen of the active principles and the risks to human health and the environment necessary methods. Species of yeasts have been used as biological control agents in search of methods and strategies for disease control. So the present study aimed to evaluate the mechanisms of action of eight strains of yeast obtained from citrus plants and phylloplane, which in preliminary tests have shown to be effective in controlling the disease. The results of this study showed that most of the evaluated yeast isolates did not produce antifungal substances, in sufficient quantities to inhibit the growth of the pathogen. Competition for nutrients is not a strategy used by the biocontrol yeast. The *killer* activity is the main mechanism of action involved in the biocontrol of *P. italicum*. *Candida stellimalicola* isolates (ACBL-04 and ACBL-07) had multiple modes of action against the pathogen, they may be considered as strong candidates for biological control agents for blue mold.

“Keywords”: Biological Control, *Killer* Factor; chitinase

1. INTRODUÇÃO

O bolor azul, ocasionado pelo fungo *Penicillium italicum*, é uma das principais doenças que ocorrem na fase de pós-colheita em frutos cítricos (ZHANG et al., 2005). Os frutos são infectados através de ferimentos, ocasionados durante a colheita e transporte dos frutos, e o ciclo da doença é relativamente curto (3-5 dias a 25 °C), ocasionando perda na quantidade e na qualidade dos frutos (PALOU et al., 2002).

Atualmente, o controle do bolor azul ocorre principalmente pela utilização de fungicidas sintéticos, tais como o Imazalil e Tiabendazol. Entretanto, são necessários métodos alternativos para o controle da doença, principalmente devido à preocupação com a contaminação do ambiente, ao desenvolvimento de linhagens do patógeno resistentes aos princípios ativos e aos riscos para a saúde humana, uma vez que, os produtos utilizados deixam resíduos nos frutos, os quais são consumidos *in natura* (WISNIEWSKI; WILSON, 1992; HOLMES; ECKERT, 1999; PALOU et al., 2002).

Dentre os métodos alternativos ao uso de fungicidas sintéticos para o controle de doenças de frutas e vegetais, destaca-se o controle biológico com a utilização de microrganismos antagonistas. Pesquisas recentes têm demonstrado a utilização de leveduras no controle de doenças fúngicas em pós-colheita (CHANCHAOVIVAT et al., 2007; HERNÁNDEZ-MONTIEL et al., 2010; KUPPER et al., 2013, MORETTO et al., 2014).

As leveduras apresentam características que as tornam eficientes como agentes de biocontrole de fungos patogênicos, sem produzir micotoxinas ou substâncias antibióticas, como algumas espécies bacterianas antagonistas, o que poderia deixar algum resíduo nos frutos (DROBY et al., 2002; GAMAGAE et al., 2004; ZHANG et al., 2005). O sucesso da utilização de leveduras no controle biológico tem estimulado o interesse de várias empresas no desenvolvimento de bioprodutos para o controle de podridões de pós-colheita de frutas. Duas leveduras antagonistas (*Candida oleophila* e *Cryptococcus albidus*) estão disponíveis comercialmente sob os nomes comerciais Aspire® (Ecogen Inc., Langhorn, PA) e

YieldPlus® (Anchor Yeast, Cidade do Cabo, África do Sul), respectivamente (DROBY et al., 2002).

Considerando o exposto, este trabalho teve por objetivo, avaliar os mecanismos de ação de oito isolados de leveduras, obtidos do filoplano de plantas cítricas, no controle do *P. italicum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Os isolados de ACBL - agente de controle biológico leveduras (ACBL-04 (*Candida stellimalicola*), ACBL-05, ACBL-06 (*Candida stellimalicola*), ACBL-07 (*Candida stellimalicola*), ACBL-08 (*Candida stellimalicola*), ACBL- 10 (*Candida stellimalicola*), ACBL-11 e ACBL-14 (*Cryptococcus* sp.)) e o isolado de *Penicillium italicum*, utilizados neste estudo, pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil. Os isolados de leveduras utilizados neste estudo foram obtidos de 14 municípios do Estado de São Paulo e, após estudos prévios de antagonismo *in vitro* e *in vivo* foram selecionados como agentes potenciais para o biocontrole do bolor azul em frutos cítricos (CUNHA, 2013).

2.2. Produção de Compostos antifúngicos

2.2.1. Produção de Compostos antifúngicos voláteis

Para a determinação da produção de compostos voláteis cultivou-se o fungo simultaneamente com os isolados de leveduras, utilizando placas bipartidas, as quais impedem que exsudatos não voláteis produzidos pela levedura tenham contato com o fungo através do meio de cultura. Para tal, um disco de 5 mm de diâmetro de *P. italicum* mais o meio de cultura foi depositado em um dos lados da placa contendo meio de cultura BDA, e do outro lado um disco do mesmo tamanho contendo cada isolado de levedura foi depositado sobre o meio de cultura YEPD. Após dez dias de incubação das culturas a 22 °C foi realizada a avaliação, medindo-

se o diâmetro micelial do *P. italicum* em dois sentidos perpendiculares e, comparada ao cultivo do fungo na placa controle (sem a presença da levedura).

2.2.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura

Para cada isolado de levedura, uma alçada do microrganismo foi retirada de colônia ativa (48 horas de cultivo em YEPD) e transferida para frascos de Erlenmeyers de capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD e, posteriormente, a cultura incubada sob agitação a 150 rpm, na ausência de luz por 72 horas.

Em seguida, a cultura correspondente a cada isolado foi filtrada em papel de filtro (Whatman nº4) e em membrana Millipore® (0,45 µM), a fim de se obter um filtrado livre de células de levedura (adaptação da técnica de Frighetto e Melo, (1995). Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para 90 mL de BDA fundente. Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos em placas de Petri e, após a solidificação, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro, contendo o fitopatógeno, foi transferido para o centro das placas. O controle correspondeu ao fitopatógeno cultivado em meio BDA sem a adição dos filtrados de células. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 22 °C durante sete dias em fotoperíodo de 12h e, a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia do *P. italicum*.

2.2.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Para cada isolado de levedura um disco de meio com o crescimento do microrganismo foi colocado em frascos Erlenmeyers de capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD, e incubado sob agitação de 150 rpm, no escuro por 72 horas, como citado no item 2.2.2. Em seguida, amostras de 10 mL de cada isolado de levedura foram transferidas para frascos contendo 90 mL de BDA e, esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos para placas de Petri e, após a solidificação dos meios, um disco de meio de

cultura de 5 mm de diâmetro contendo o fitopatógeno foi transferido para o centro das placas. O controle correspondeu ao patógeno crescido em meio BDA sem a presença dos metabólitos. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 22 °C durante sete dias e, a avaliação foi efetuada por meio da medição do diâmetro médio da colônia de *P. italicum*.

2.3. Detecção da atividade *Killer*

Para esse ensaio foi preparado, inicialmente, uma suspensão (1×10^5 células mL^{-1}) de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 (sensível ao fator *killer*), após cultivo em meio YEPD por 24 horas à 28 °C. Uma alíquota de 100 μL desta suspensão foi, então, espalhada sobre o meio de cultura YEPD + azul de metileno, tamponado a pH 4,3-4,7, segundo a metodologia descrita por Ceccato-Antonini et al. (2004). Após secagem, os isolados de leveduras, a serem testados quanto à presença do fator *killer*, foram inoculados com palitos estéreis (em pontos), sendo a seguir, as culturas incubadas a 28 °C, por três dias. Os isolados foram considerados micocinogênicos (produtores de toxina *Killer*) quando produziram um halo de inibição de crescimento e zona azul adjacente, indicando a morte celular da levedura sensível.

2.4. Competição por nutrientes

Para a detecção da competição de nutrientes, entre o *P. italicum* e a levedura antagonista, lâminas de microscopia contendo meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose (0,0; 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 %) foram preparadas. Posteriormente, 10 μL de uma suspensão de 1×10^5 conídios mL^{-1} do fitopatógeno e 10 μL de uma suspensão de 1×10^8 células mL^{-1} de cada isolado de levedura foram depositados em locais pré demarcados das lâminas. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 22 °C por 17 horas. A avaliação procedeu através da contagem de conídios germinados e não germinados, num total de 100 conídios avaliados ao acaso. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo encontrava-se maior ou igual ao tamanho do conídio.

2.5. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo

Os isolados de leveduras foram pareados com o *P. italicum* seguindo a metodologia descrita por Dennis e Webster (1971). O teste foi realizado em placa de Petri, em meio de cultura BDA, no qual foi colocado de um lado, o fitopatógeno (disco de micélio com 5 mm de diâmetro) e à 3 cm de distância foi depositado a levedura (disco de 5 mm de diâmetro).

A partir da observação do halo de inibição entre os isolados de leveduras antagonísticos e o fungo após cultivo pareado em placa de Petri, foi realizado um experimento para quantificar o crescimento micelial do patógeno retirado da zona de antagonismo (micélio localizado adjacente do halo de inibição de crescimento fúngico), com o intuito de verificar se as hifas encontravam-se viáveis. Com o objetivo de comparação do crescimento micelial, foram realizadas retiradas de micélio fúngico (disco de 5 mm de diâmetro) de placas apresentando antagonismo, de três diferentes locais: na região de inibição, na região mediana (próxima ao halo de inibição) e, para fins de comparação, do micélio longe da levedura (onde o micélio não está sofrendo a ação inibitória da levedura). As culturas foram incubadas por dez dias em estufa para BOD a 22 °C em fotoperíodo 12 horas. A avaliação constou da medição do diâmetro do crescimento micelial do patógeno, em dois sentidos perpendiculares.

2.6. Produção de enzimas hidrolíticas

Este experimento teve por objetivo avaliar a produção e liberação de enzimas hidrolíticas pelos isolados de leveduras, seguindo a metodologia de Fialho et al. (2005). Os isolados foram transferidos através de uma alça de inoculação para 20 mL de meio YEPD líquido e incubados sob agitação constante de 150 rpm por 72 horas no escuro. Após esse período, 1 mL da suspensão foi transferida para tubos Falcon de 15 mL contendo 10 mL de meio YEPD e YEPD modificado (com preparado de parede celular do fungo testado, a 1% em substituição à glicose). O cultivo foi realizado em triplicata, sob agitação a 150 rpm. No tempo de 24 horas de

incubação, uma amostra de 1,5 mL foi retirada e centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e utilizado para análise das atividades de β -1,3-glucanase e quitinase.

2.6.1. Preparo de parede celular (PPC)

Para a preparação da parede celular (PPC), 1 mL da suspensão de esporos (1×10^5 esporos mL^{-1}) do fitopatógeno foi cultivado em 50 mL de meio batata dextrose por oito dias, sob agitação constante à 150 rpm. O micélio fúngico foi coletado por filtração em papel de filtro Whatman (nº 1), lavado três vezes com água destilada e homogeneizado em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) por 2 minutos e mantido a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ *overnight*. Posteriormente, o material foi descongelado e novamente homogeneizado. Em seguida, aproximadamente 20 mL do micélio fúngico foi transferido para um frasco onde foi macerado com nitrogênio líquido e a parede celular do fungo foi armazenada em freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para utilização posterior. Metodologia adaptada de Bar-Simon et al. (2004).

2.7. Atividades enzimáticas

2.7.1. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores, liberados durante os ensaios enzimáticos, foi realizada segundo a metodologia descrita por Miller (1959), utilizando o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS). Para tal, 250 μL da mistura de reação foram adicionados a 250 μL do reagente ADNS e a solução foi aquecida em banho com água fervente por dez minutos. Após o resfriamento em gelo, até a temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$, a solução foi diluída com 2,5 mL de água destilada homogeneizada e foi determinada a absorbância a 540 nm, contra o branco apropriado.

2.7.2. Determinação da atividade enzimática - β -1,3-glucanase

Para a avaliação da produção de β -1,3-glucanase foi utilizada a técnica de quantificação colorimétrica de glicose liberada do substrato laminarina, através da dosagem de açúcares redutores (item 2.7.1). A reação foi realizada com 200 μ L de tampão McIlvaine, pH 6,0; 100 μ L da amostra de cultivo e 100 μ L de laminarina (4 mg mL⁻¹). A mistura da reação foi incubada a 50 °C por 1 hora. Após esse período, a reação foi paralisada com a da adição de 200 μ L do reagente ADNS à mistura da reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados. A leitura de absorbância a 540 nm foi feita contra a mistura de reação contendo tampão em substituição ao meio de cultivo, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle negativo que consistiu na mistura da reação na presença de tampão substituindo o substrato. As leituras de absorbâncias foram plotadas em curva padrão para glicose e a atividade enzimática foi expressa em U/L, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1g de açúcar redutor liberado (glicose) da laminarina nas condições de ensaio.

2.7.3. Determinação da atividade enzimática – quitinase

A avaliação da produção de quitinase foi realizada pela da técnica de N-acetil glucosamina (NAG), a partir do substrato glicol quitina. Para a realização da análise, 100 μ L da amostra de meio de cultivo da levedura foram misturados com 200 μ L de tampão McIlvaine, pH 6,0 e 100 μ L de glicol quitina 0,01% (p/v) neste mesmo tampão. Após incubação por 60 minutos a 50 °C, a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L do reagente ADNS à mistura de reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados, como anteriormente citados (item 2.7.1). A cubeta de referência (branco) consistiu na mistura da reação na presença tampão em substituição ao meio de cultivo. O valor da leitura foi subtraído do obtido pelo controle negativo que apresentou o tampão em substituição ao substrato (glicol quitina). A atividade enzimática foi expressa em U/L, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1g de açúcar redutor liberado (N-acetilglucosamina) enzimaticamente da glicol quitina, nas condições do ensaio.

2.8. Análises Estatísticas

Para todos os ensaios de produção de compostos antifúngicos e para a análise de crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para o teste de competição por nutrientes, utilizou-se um esquema fatorial com oito repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. As análises foram realizadas utilizando o software ASSISTAT.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de Compostos antifúngicos

3.1.1. Produção de Compostos antifúngicos voláteis

No ensaio realizado para determinação de compostos antifúngicos voláteis, os resultados obtidos mostraram que somente o isolado de levedura ACBL-14 produziu uma pequena quantidade de metabólitos voláteis que afetou 1,24% de inibição do tamanho da colônia do patógeno (Figura 1).

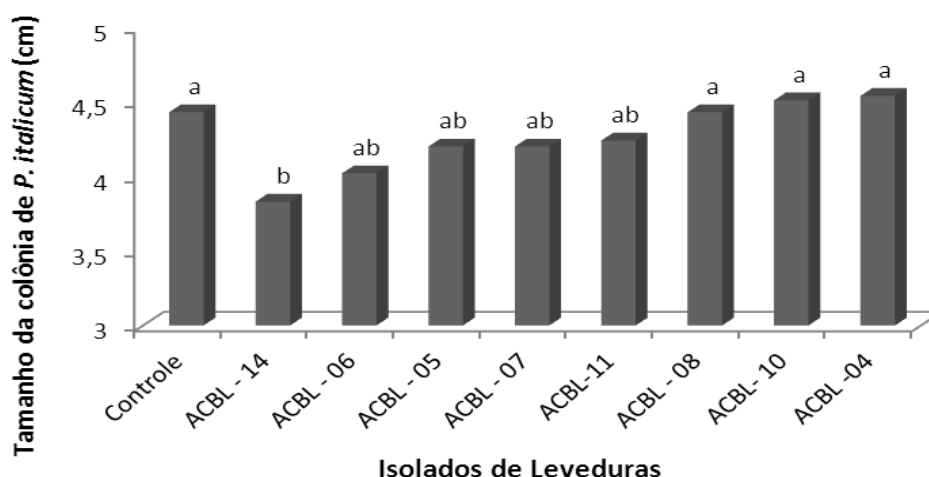


Figura 1. Tamanho da colônia de *Penicillium italicum*, sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.1.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células de leveduras

No teste de produção de compostos antifúngicos livres de células, os resultados mostraram que todos os isolados de leveduras avaliados não produziram tais compostos em quantidades suficientes para inibirem o tamanho da colônia de *Penicillium italicum* (Figura 2).

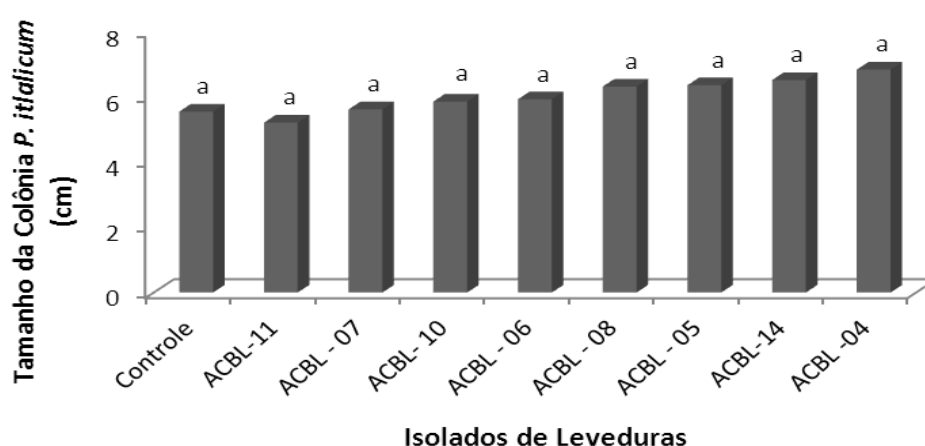


Figura 2. Tamanho da colônia de *Penicillium italicum* sob influência de compostos antifúngicos livres de células produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.1.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Com relação ao teste de compostos antifúngicos termoestáveis, os dados obtidos mostraram que todos os isolados de leveduras testados não produziram metabólitos termoestáveis e, em quantidades suficientes, para inibirem o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno (Figura 3).

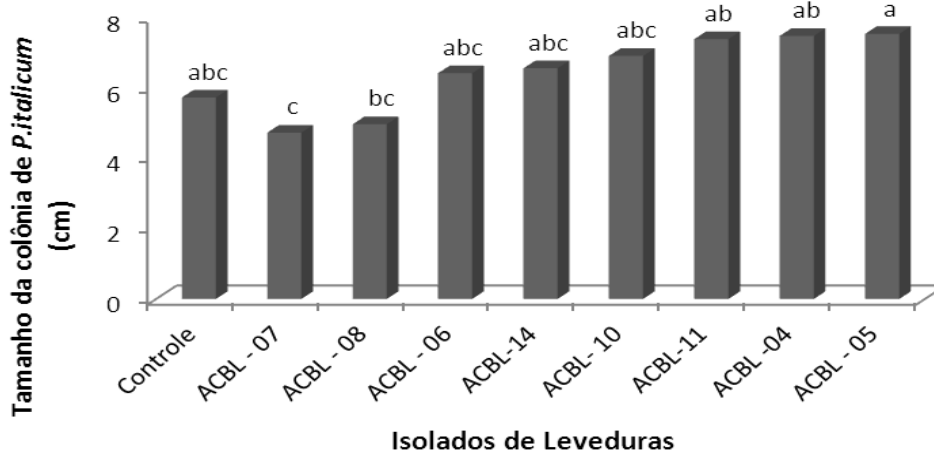


Figura 3. Tamanho da colônia de *Penicillium italicum* sob influência de compostos antifúngicos termoestáveis produzidos pelos diferentes isolados de leveduras. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.2. Detecção da atividade *Killer*

No ensaio, cujo objetivo era determinar a atividade *Killer* dos isolados de leveduras, observou-se que, todos os isolados de leveduras testadas apresentaram resultados positivos quanto à atividade *killer*. Como observado na Tabela 1, isolados apresentaram linha ou zona azul (morte celular) ou, zona clara (inibição, porém sem morte celular) ao redor da colônia indicando a ação *killer* sobre a levedura sensível (Figura 4).

Tabela 1. Atividade *killer* dos isolados de leveduras em relação à levedura sensível *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 em meio YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5.

Isolados de leveduras	Atividade <i>Killer</i>
ACBL-04 ⁽¹⁾	Zona Clara
ACBL-05	Zona Clara/Zona azul
ACBL-06	Zona Clara
ACBL-07	Zona Clara/Linha azul
ACBL-08	Zona Clara/Linha azul
ACBL-10	Zona Clara
ACBL-11	Zona Clara
ACBL-14	Zona Clara

⁽¹⁾ ACBL-04:*Candida stellimalicola*; ACBL-05; ACBL-06:*Candida stellimalicola*; ACBL-07:*Candida stellimalicola*; ACBL-08: *Candida stellimalicola*; ACBL- 10: *Candida stellimalicola*; ACBL-11 e ACBL-14:*Cryptococcus* sp.

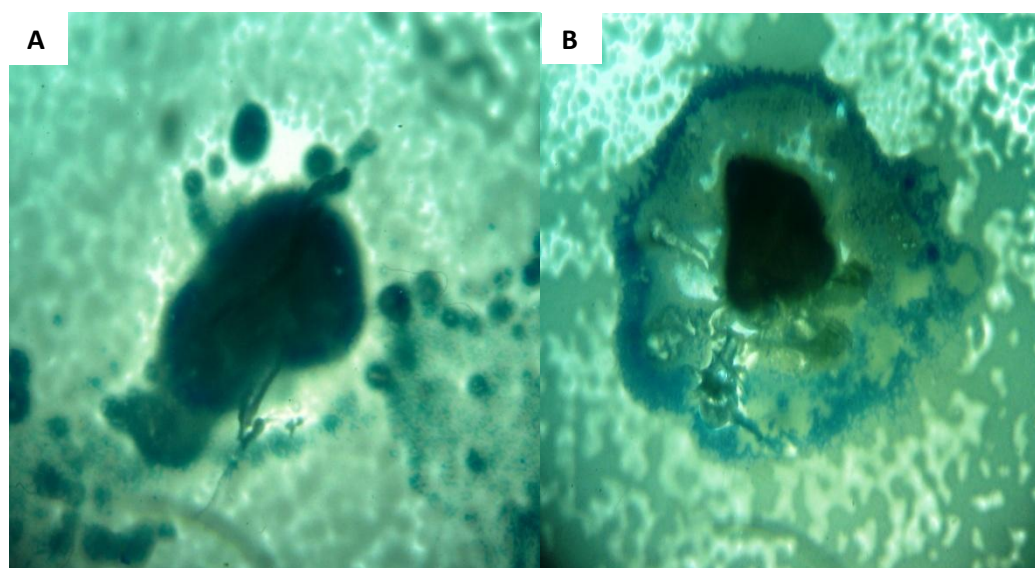


Figura 4. Atividade *killer* do ACBL-04 (*Candida stellimalicola*) mostrando a zona clara (inibição da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (A). Atividade *Killer* do ACBL- 05 mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 28 °C, pH 4,5 (B).

3.3. Competição por nutrientes

No ensaio realizado para determinar se as leveduras testadas competem por nutrientes com o fitopatógeno, os resultados mostraram que todos os isolados de leveduras inibiram a germinação dos conídios de *P. italicum* independente das concentrações de glicose utilizadas (Figura 5 e 6). Os isolados ACBL-07 e ACBL-08 foram os que proporcionaram maiores valores de inibições da germinação de conídios do patógeno, proporcionando 78,18 e 68,20% de inibição, respectivamente.

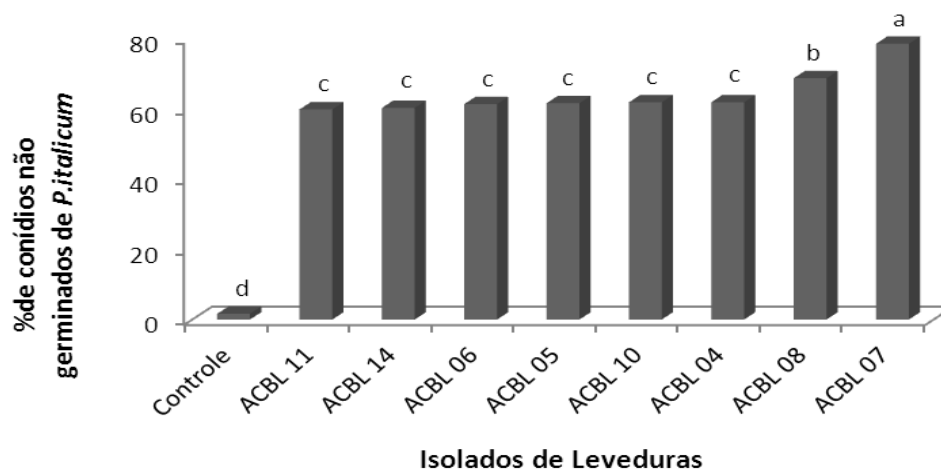


Figura 5. Porcentagem de conídios não germinados do fungo *Penicillium italicum* sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 22 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

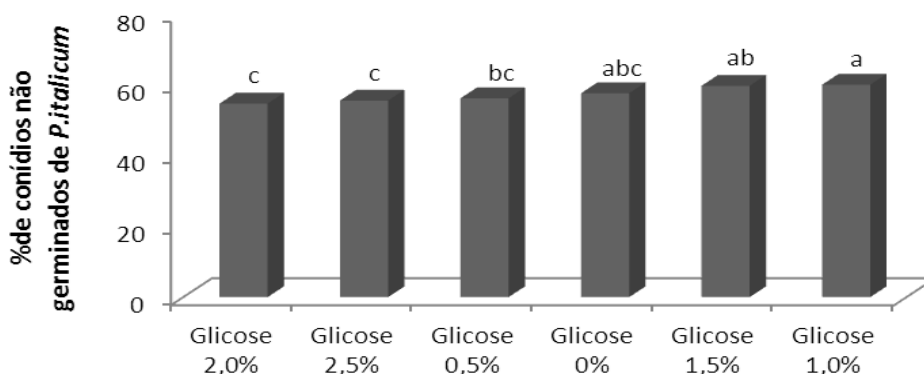


Figura 6. Porcentagem de conídios não germinados do fungo *Penicillium italicum* sob ação das leveduras em meio ágar-água com diferentes concentrações de glicose, a 22 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.4. Avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno retirado da zona de antagonismo

A avaliação do crescimento micelial do *P. italicum*, após a hifa ser retirada da zona de antagonismo com os diferentes isolados de leveduras, mostrou que todos os isolados de leveduras não afetaram a viabilidade das hifas do fitopatógeno. Quando o fungo foi retirado da região mediana (próxima ao halo de inibição) ou longe da levedura, o crescimento do patógeno não foi afetado, apresentando crescimento normal (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho (cm) da colônia de *Penicillium italicum*, retirado da zona de antagonismo, da região mediana da interação e longe da levedura, após cultivo pareado entre o patógeno e os agentes de controle biológico.

Isolados de leveduras	Região do halo de inibição	Região Mediana da interação	Região longe da levedura
Controle	2,53 a ⁽²⁾	2,00 a	2,00 a
ACBL-04 ⁽¹⁾	2,08 a	2,41 a	2,03 a
ACBL-05	2,28 a	2,11 a	2,25 a
ACBL-06	2,16 a	2,45 a	2,35 a
ACBL-07	2,11 a	2,06 a	2,46 a
ACBL-08	2,53 a	2,33 a	2,40 a
ACBL-10	2,2 a	2,10 a	2,03 a
ACBL-11	2,43 a	2,41 a	2,38 a
ACBL-14	2,36 a	2,50 a	2,45 a

⁽¹⁾ ACBL-04: *Candida stellimalicola*; ACBL-05; ACBL-06: *Candida stellimalicola*; ACBL-07: *Candida stellimalicola*; ACBL-08: *Candida stellimalicola*; ACBL-10: *Candida stellimalicola*; ACBL-11 e ACBL-14: *Cryptococcus* sp. ⁽²⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.5. Produção de enzimas hidrolíticas

Quando se avaliou a capacidade dos isolados de leveduras quanto à produção de enzimas hidrolíticas, somente os isolados ACBL-04 (*Candida stellimalicola*), ACBL-07 (*Candida stellimalicola*) e ACBL-11 produziram atividade enzimática com produção de quitinase. Os demais isolados não apresentaram atividade enzimática para quitinase e nem para β -1,3-glucanase. (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de quitinase e β -1,3-Glucanase por isolados de leveduras, avaliada através da produção de açúcar.

Isolados	Quitinase AR(g/L) ⁽¹⁾	β -1,3-Glucanase AR (g/L) ⁽¹⁾
ACBL-04 ⁽²⁾	0,007	0
ACBL-05	0	0
ACBL-06	0	0
ACBL-07	0,003	0
ACBL-08	0	0
ACBL-10	0	0
ACBL-11	0,031	0
ACBL-14	0	0

⁽¹⁾AR-Açúcar redutor. ⁽²⁾ACBL-04:*Candida stellimalicola*; ACBL-05; ACBL-06:*Candida stellimalicola*; ACBL-07:*Candida stellimalicola*; ACBL-08: *Candida stellimalicola*; ACBL- 10: *Candida stellimalicola*; ACBL-11 e ACBL- 14:*Cryptococcus* sp.

4. DISCUSSÃO

O respectivo estudo mostrou que não houve produção de substâncias antifúngicas (voláteis, termoestáveis e livres de células) pela maioria dos isolados de leveduras testada, que pudessem afetar o desenvolvimento de *P. italicum*. Embora o ACBL-14 tenha produzido metabólitos voláteis em quantidades suficientes para reduzir, estatisticamente, o tamanho da colônia do patógeno, a porcentagem de inibição da colônia foi de apenas 1,24% (Figura 1) em relação à colônia do fungo no tratamento testemunha. Esses dados estão em parte de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura. Wang et al. (2010) avaliaram a capacidade antagonística de *Rhodosporidium paludigenum* contra *Botrytis cinerea* visando o controle do bolor cinzento em tomate cereja; de acordo com os autores, tratamentos com metabólitos termoestáveis e livres de células da levedura não inibiram, significativamente, a germinação de conídios do fitopatógeno. Lima et al. (2013) não encontraram resultados positivos de controle ao estudarem a produção de compostos antifúngicos produzidos por leveduras contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Zhang et al. (2011) trabalhando com filtrados livres de células de *Pichia guilliermondii* contra *B. cinerea*, também não encontraram resultados positivos para o biocontrole. Em contrapartida, Fialho et al. (2010) ao estudarem isolados de *Saccharomyces cerevisiae* para o controle de *Guignardia citricarpa* em citros, verificaram a produção de compostos orgânicos voláteis pelos antagonistas.

A competição entre os microrganismos, por nutrientes e espaço, apresenta-se como um dos mecanismos de controle biológico fundamental nos estudos das interações levedura-patógeno (BLEVE et al., 2006). Os dados observados, com relação à avaliação da existência desse mecanismo de ação pelas leveduras do respectivo estudo mostraram que, apesar de inibir a germinação do fitopatógeno a competição por nutrientes não é uma estratégia de controle usada por esses microrganismos, uma vez que a redução da germinação dos conídios do fitopatógeno não dependeu do aumento da concentração de glicose adicionada ao meio de cultura, sugerindo que a levedura não compete pelos nutrientes do meio com o fungo (Figura 5 e 6). Esses dados não corroboram com outros autores, segundo Zhang et al. (2011), ao serem testadas algumas fontes de açúcar, como

sacarose, frutose e glicose em diferentes concentrações, de maneira a otimizar a atividade antagônica de *Pichia guilliermondii* contra *B. cinerea*, os autores verificaram que, tanto *in vivo* como *in vitro*, concentrações de 0,5 e 1% das respectivas fontes de açúcar foram capazes de aumentar a atividade antagonística da levedura, sem beneficiar o fitopatógeno. Chanchaichaovivat et al. (2008) avaliando possíveis mecanismos de ação pela levedura *P. guilliermondii* no controle da antracnose (*C. capsici*) em pimenta, observaram que o aumento das concentrações de açúcar reduziu a germinação do esporo fúngico, sugerindo que a levedura compete pelos nutrientes do meio com o fungo, inibindo seu desenvolvimento. Fialho et al. (2010) ao testarem diferentes fontes de carbono, relataram que para obter maior inibição no crescimento micelial de *G. citricarpa*, foi necessária a adição de 4% de glicose no meio contendo *S. cerevisiae* (ACB-CR1). Kupper et al. (2013) trabalhando com dois isolados de *S. cerevisiae* ACB-K1 e ACB-CR1 observaram que os mesmos foram eficientes em inibir a germinação de *P. digitatum* em 78 a 85,7%, de maneira que a adição de sacarose a 0,5% favoreceu ainda mais a inibição da germinação dos conídios pelos isolados da levedura.

No respectivo trabalho verificou-se que todas as leveduras testadas mostraram resultados positivos referente ao fator *killer* sugerindo ser esse o principal mecanismo de ação adotado no biocontrole de *P. italicum* (Tabela 1). Esses resultados corroboram com os obtidos por outros autores (WALKER et al., 1995; WEILER; SCHIMITT, 2003; SANTOS et al., 2004; COELHO, 2005; PLATANIA et al., 2012; LIMA et al., 2013) que constataram a susceptibilidade de fitopatógenos às leveduras micocinogênicas, ampliando as perspectivas de aplicação deste grupo de antagonistas.

Os múltiplos modos de ação apresentados pelos isolados ACBL-04 (*Candida stellimalicola*), ACBL-07 (*Candida stellimalicola*) e ACBL-11, os quais mostraram produção de quitinase na presença da parede do fungo, atividade *Killer* e inibição da germinação de conídios do fitopatógeno foram importantes para o biocontrole de *P. italicum*. Assim como, para os isolados ACBL-05, (ACBL-06, ACBL-08 e ACBL-10) *C. stellimalicola* e ACBL-14 (*Cryptococcus* sp.) que apresentaram atividade *killer* e inibição da germinação de conídios do fungo. No entanto, estudos posteriores são necessários de modo a se conhecer a natureza da toxina *killer* destes isolados.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- a) a atividade *Killer* foi o mecanismo de ação comum adotado pelos isolados de leveduras para o biocontrole de *P. italicum*.
- b) *Candida stellimalicola* (ACBL-04 e ACBL-07) e o isolado ACBL-11 apresentaram múltiplos modos de ação contra o patógeno *P. italicum*, podendo esses isolados serem considerados fortes candidatos a agentes de controle biológico para o bolor azul.

6. REFERÊNCIAS

- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, New York, v. 45, n. 3, p. 140-148, 2004.
- BLEVE, G.; GRIECO, F.; COZZI, G.; LOGRIECO, A.; VISCONTI, A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A.niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-209, 2006.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D.; SILVA, A. C. Determination of yeast *Killer* activity in fermentation sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 13-23, 2004.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; BHINYO, P.; RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling *chilli anthracnose* after harvest. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 47, n. 2, p. 207-215, 2008.
- COELHO, A. R. **Controle de *Penicillium expansum* / Biodegradação de Patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita.** 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

CUNHA, T. **Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros**. 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

DENNIS, C. E.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, [London], v. 57, n. 3, p. 359-363, 1971.

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*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 92, n. 4, p. 393-399, 2002.

FIALHO, M. B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FIALHO, M. B.; TOFFANO, L.; PEDROSO, M. P.; AUGUSTO, F.; PASCHOLATI, S. F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 925-932, 2010.

FRIGHETTO, R. T. S.; MELO, I. S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I. S. de; SANHUEZA, R. M. V. (Coord.). **Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. p. 40-46. Manual Técnico.

GAMAGAE, S. U.; SIVAKUMAR, D.; WIJESUNDERA, R. L. C. Evaluation of post-harvest application of sodium bicarbonate-incorporated wax formulation and *Candida oleophila* for the control of anthracnose of papaya. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 23, n. 7, p. 575-579, 2004.

HOLMES, G. J.; ECKERT, J. W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 9, p. 716–721, 1999.

KUPPER, K. C.; CERVANTES, A. L. L.; KLEIN, M. N.; SILVA, A. C. Avaliação de micro-organismos antagonísticos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 20-31, 2013.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. R. B.; BRANDÃO, L. R.; ROSA, C. A.; VIANA, F. M. P. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 53, n. 7, p. 590-599, 2013.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

PALOU, L.; USALL, J.; MUÑOZ, J. A.; SMILANICK, J. L.; VIÑAS, I. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 93–96, 2002.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G. Efficacy of *killer* yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco Orange fruit (*Citrus sinensis*). **Biological Control**, Maryland Heights, v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 4, p. 331-338, 2004.

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between *killer* yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v. 127, n. 3, p. 213-222, 1995.

WANG, Y.; YU, T.; XIA, J.; YU, D.; WANG, J.; ZHENG, X. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodospiridium paludigenum*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 53, n. 2, p. 178–182, 2010.

WEILER, F.; SCHMITT, M. J. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, Chichester, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2003.

WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 2, p. 94–98, 1992.

ZHANG, H. Y.; ZHENG, X.; XI, Y. F. Biological control of postharvest blue mould of orange by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. **BioControl**, Lima, v. 50, p. 331-342, 2005.

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**, Maryland Heights, v. 57, n. 3, p. 193-201, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avaliando-se os mecanismos de ação dos 24 isolados de leveduras testados e, potencias agentes de controle biológico para doenças que ocorrem na pós-colheita de citros, pode-se concluir que a atividade *Killer* foi o mecanismo de ação comum apresentado por esses microrganismos e que grande parte dos isolados (17) foi capaz de produzir enzimas hidrolíticas, quando em contato com a parede celular dos fundos fitopatogênicos.

Com o presente trabalho podemos considerar que alguns isolados de leveduras testados, pela capacidade de apresentarem múltiplos modos de ação, podem ser considerados fortes candidatos a agentes de controle biológico de doenças de pós-colheita em citros, como é o caso de *Saccharomyces cerevisiae* (ACB-K1) para o controle da podridão azeda (*G. candidum*); *Saccharomyces* sp. (ACBL-80, ACBL-82) e *Meyerozyma caribbica* (ACBL-86) para o controle do bolor verde (*P. digitatum*) e *Candida stellimalicola* (ACBL-04 e ACBL-07) e o isolado ACBL-11, para o controle do bolor azul (*P. italicum*).