

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

**POTENCIAL DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO E DO
FILOPLANO DE PLANTAS CÍTRICAS NO BIOCONTROLE
DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA DE CITROS**

Tatiane da Cunha
Bióloga

2013

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

**POTENCIAL DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO E DO
FILOPLANO DE PLANTAS CÍTRICAS NO BIOCONTROLE
DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA DE CITROS**

Tatiane da Cunha

Orientadora: Prof^a Dr^a Katia Cristina Kupper

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

2013

Cunha, Tatiane da
C972p Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros / Tatiane da Cunha. – Jaboticabal, 2013
xii, 130 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Katia Cristina Kupper

Banca examinadora: Sérgio Florentino Pascholati, Bem-Hur Mattiuz

Bibliografia

1. *Citrus spp.*, 2. *Controle biológico*, 3. *Geotrichum spp.*, 4. *Penicillium spp.*, 5. Levedura. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461:632.937



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: POTENCIAL DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO E DO FILOPLANO DE PLANTAS CÍTRICAS NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA DE CITROS

AUTORA: TATIANE DA CUNHA

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 Agronômico de Campinas / Cordeirópolis/SP


Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI
Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 06 de dezembro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TATIANE DA CUNHA – Nascida em 25 de maio de 1989 em Leme, SP. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em Março de 2007 no Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, na cidade de Araras, SP, concluindo seu bacharelado e licenciatura em dezembro de 2010. Durante a graduação, estagiou junto ao Departamento de Entomologia na área de Controle Biológico de Pragas, na Esalq – USP, Piracicaba, SP, sob a orientação do Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, também foi bolsista de iniciação científica do CNPq-PIBIC no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, SP, atuando na área de Biologia Molecular, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Rocha Latado. Em agosto de 2011 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 Prof^a. Dr^a. Katia Cristina Kupper, como bolsista Fapesp, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Dedico

Aos meus pais **Valentim** e **Celina**,

Pelo amor, carinho, confiança e respeito. Vocês me ensinaram valores com os quais saberei consolidar minha vida e carreira! Vocês são exemplos de caráter e humildade a serem seguidos.

Ao meu irmão **Thiago** e sua esposa **Mariane**,

Pelo amor e carinho que sempre tiveram por mim, e por sempre acreditarem no meu trabalho, vocês são um orgulho para mim!

Ao meu namorado e companheiro de tantos anos **Rafael**,

Pelo grande apoio, respeito, confiança, e amor que dedicou à mim durante todos esses anos, pois ao seu lado todas as conquistas se tornam nossas!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me dar uma família maravilhosa, a qual sempre acreditou nos meus sonhos e colocar pessoas especiais no meu caminho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**Fapesp**), pela concessão da bolsa de estudos (processo 2011/13874-3) e financiamento do projeto (processo 2011/13006-1).

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal e ao curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária pela oportunidade de ensino.

Minha orientadora Dr^a **Katia Cristina Kupper**, que me deu a oportunidade de desenvolver este projeto, me orientando como pessoa e como profissional, ajudando na minha trajetória, mais que uma orientadora uma amiga.

À banca examinadora do Exame Geral de Qualificação e da Defesa, Prof. Dr. **Sérgio Florentino Pascholati**, Prof. Dr. **Antonio Carlos Monteiro**, Prof. Dr. **Ben-Hur Mattiuz** e aos demais professores, por participarem desta importante etapa em minha vida e pelo acréscimo ao trabalho com suas observações e conselhos.

A meu pai **Valentim**, minha mãe **Celina**, meu irmão **Thiago** e minha cunhada **Mariane**, que são meu maior orgulho, os quais amo imensamente e sei o quanto acreditam em mim, e sempre por mais dificuldades que eu tivesse me prepararam para o mundo e nunca somente para eles, muito obrigada pelos valores que aprendi, tendo vocês como exemplo de vida.

Meu namorado e companheiro de tantos anos **Rafael**, que me compreendeu, me ajudou, e sempre me levou a acreditar que eu era capaz de conseguir sempre mais, a quem eu amo e respeito muito e vejo nele um parceiro, com o qual quero dividir minha vida.

Meus avós **João Cunha** e **Anézia**, e minha tia **Judite**, que sempre me ensinaram a dar sempre o melhor de mim para alcançar meus objetivos.

As minhas amigas que me ajudaram muito, **Aline**, que sempre ajuda a todos com seu coração enorme e que muito me ensinou sobre o que é ser parte de uma equipe, a **Luriany**, sempre de bem com a vida que tornou os momentos de trabalho muito mais descontraídos e muito me ajudou e **Carolina**, que muito me ajudou na

parte molecular e pela convivência no apartamento em Araras. Vocês são pessoas especiais que levarei por toda a minha vida.

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, a **Mariana** pela amizade e por me ensinar toda a prática no laboratório e por me ajudar sempre que podia, **Maria Carolina**, pela amizade, conversas, ajuda e risadas, **Gilmar**, pela sua amizade, bons momentos, as muitas risadas e ajuda nos experimentos, principalmente nos *in vivo*, mais que um amigo um irmão, **Pitt**, pela ajuda, amizade e pelas conversas, **Eleonore**, pela ajuda, amizade e conversas, **Willian**, pela amizade e ajuda nos experimentos, **Jéssica**, pela amizade e auxílio no projeto, **Andréia**, pela amizade, **Vanessa** e **Larissa**. Vocês transformaram o trabalho diário em momentos mais agradáveis, vou sentir saudades de todos e da convivência com vocês.

Aos meus amigos da sala 13, **Camilla**, que se tornou mais que uma colega de trabalho uma amiga muito especial, **Lilian**, uma amiga sempre sorridente que tornou meus momentos na sala mais agradáveis e **Evandro**, que se tornou um amigo. Pessoas com as quais dividi bons momentos e sentirei muitas saudades.

Aos demais amigos e funcionários do Centro de Citricultura, **Francisco**, **Franz**, **Leonardo Boava**, **Gabriela (Shakira)**, **Salette**, **Maria Amélia**, **Rodrigo Latado**, **Valéria**, **Valéria Mafra**, **Vivian**, **Isabel**, **Nidelce**, **Rose**, **Silvani**, **Cida**, **Lenice**, **Takita**, pelos momentos agradáveis e apoio.

Aos meus amigos de Jaboticabal, professores e funcionários, Prof^a **Maria Inês**, **Gabriela**, **Cláudia**, **Gregório**, **Tirinha**, **Tieti**, e em especial **Gabriela (Xu)** e **Marcela (Piçarra)**, que são pessoas especiais, com as quais dividi bons momentos.

Ao *packing-house*, **Lucato** que disponibilizou os frutos para os experimentos.

A todos que de uma forma ou de outra colaboraram para o término de mais uma etapa na minha vida.

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Página

Tabela 1. Isolados de levedura obtidos de solo, folha, flor e fruto de citros de diferentes localidades do estado de São Paulo.....26

Capítulo 3

Tabela 1. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 1.....41

Tabela 2. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 2.....42

Tabela 3. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 3.....43

Tabela 4. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 4.....44

Tabela 5. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 5.....45

Capítulo 4

Tabela 1. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 1.....64

Tabela 2. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 2.....64

Tabela 3. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 3.....66

Tabela 4. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 4.....67

Tabela 5. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 5.....69

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3

- Figura 1.** Efeito do isolado de levedura ACBL-77 no crescimento micelial de *Geotrichum candidum in vitro*. A – Controle; B- Inibição do patógeno (→) pelo isolado ACBL-77(→).....40
- Figura 2.** Efeito de diferentes isolados de levedura na inibição da germinação de conídios de *G. candidum*. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.....46
- Figura 3.** Efeito dos isolados de levedura ACB-K1(B) e ACBL-68 (C) na inibição da germinação de conídios de *G. candidum* observados em microscópio óptico comum (aumento de 400 X). Controle (A).....46
- Figura 4.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *G. candidum*, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e 90% de UR. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.....47
- Figura 5.** Efeito *in vivo* dos melhores tratamentos (ACBL-23, ACBL-44, ACBL-68, ACBL-77 e Imazalil) no desenvolvimento do tamanho médio de lesões ocasionadas por *G. candidum* em frutos de Laranja Pêra tratados de maneira preventiva (A) e curativa (B), armazenados por 15 dias à 25°C e 90% de UR.....48
- Figura 6.** Diagrama de Ven demonstrando os melhores tratamentos utilizados preventiva (A) e curativamente (B) no progresso da podridão azeda em frutos de laranja Pêra. Intersecção demonstra os tratamentos que foram eficientes utilizados das duas maneiras, curativa e preventivamente.....40

Figura 7. Porcentagem de frutos de Laranja Pêra com sintomas de podridão azeda, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e 90% de UR, por 15 dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.....50

Figura 8. Isolados de levedura, ACBL-23, ACBL-44 e ACBL-77, mais eficientes no controle da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra tratados preventivamente e inoculados com *Geotrichum candidum*.....51

Capítulo 4

Figura 1. Efeito do isolado de levedura ACBL-87 no crescimento micelial de *Penicillium digitatum in vitro*. A – Controle; B- Inibição do patógeno (\rightarrow) pelo isolado ACBL-87(\rightarrow).....70

Figura 2. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *P. digitatum*, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 90% de UR. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.....71

Figura 3. Efeito *in vivo* dos melhores tratamentos para o desenvolvimento do tamanho médio de lesões ocasionadas por *P. digitataum* em frutos de Laranja Lima tratados de maneira preventiva, armazenados por 7 dias à $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 90% de UR...72

Figura 4. Porcentagem de frutos de Laranja Lima com sintomas do bolor verde, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 90% de UR, por 7 dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias....73

Figura 5. Isolados de levedura, ACBL-80, ACBL-82 e ACBL-86, mais eficientes no controle do bolor verde em frutos de Laranja Lima tratados preventivamente e inoculados com *Penicillium digitatum*.....74

Capítulo 5

Figura 1. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 1.....85

Figura 2. Antagonismo *in vitro* do isolado de levedura ACBL-04 (A), apresentando 100% de inibição do tamanho da colônia de *P. italicum* pela técnica de semeadura por profundidade. Controle (B).....86

Figura 3. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 2.....87

Figura 4. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 3.....87

Figura 5. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 4.....88

Figura 6. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 5.....89

Figura 7. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *P. italicum*, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados em câmara fria (10°C±2) durante 10 dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.....90

Figura 8. Efeito *in vivo* dos melhores isolados de levedura no desenvolvimento do tamanho médio de lesões ocasionadas por *P. italicum* em frutos de Laranja Pêra tratados de maneira preventiva (A) e curativa (B), armazenados por 10 dias em câmara fria (10°C±2) por 10 dias.....91

Figura 9. Diagrama de Ven demonstrando os melhores tratamentos utilizados preventiva (A) e curativamente (B) no progresso do bolor azul em frutos de laranja Pêra. Intersecção demonstra os tratamentos que foram eficientes utilizados das duas maneiras, curativa e preventivamente.....92

Figura 10. Porcentagem de frutos de Laranja Pêra com sintomas do bolor azul, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a em câmara fria (10°C±2), por 10 dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.....93

Figura 11. Isolados de levedura, ACBL-04, ACBL- e ACBL-77, mais eficientes no controle do bolor azul em frutos de Laranja Pêra tratados preventivamente e inoculados com *Penicillium italicum*.....94

Figura 12. Diagrama de Ven demonstrando os melhores tratamentos utilizados preventiva (A) e curativamente (B) na incidência do bolor azul em frutos de laranja Pêra. Intersecção demonstra os tratamentos que foram eficientes utilizados das duas maneiras, curativa e preventivamente.....95

Capítulo 6

Figura 1. Aspecto das colônias (acima) em meio BDA e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas à *G. candidum* (aumento de 400 X, para as fotos das células). ACBL-23 (A); ACBL-42 (B); *Rhodotorula mucilaginosa* ACBL-44 (C); *Saccharomyces* sp ACBL-50 (D); ACBL-52 (E); ACBL-68

(F); *Sporobolomyces koalae* ACBL-77 (G) e *S. cerevisiae* ACB-K1 (H).....105

Figura 2. Aspecto das colônias (acima) em meio BDA e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas à *P. digitatum* (aumento de 400 X, para as fotos das células). *Saccharomyces cerevisiae* ACBL-76 (A); ACBL-78 (B); *S. cerevisiae* ACBL-80 (C); *S. cerevisiae* ACBL-81 (D); *S. cerevisiae* ACBL-82 (E); *Candida stellimalicola* ACBL-84 (F); *Meyerozyma caribbica* ACBL-86 (G) e ACBL-87 (H).....106

Figura 3. Aspecto das colônias (acima) em meio BDA e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas à *P. italicum* (aumento de 400 X, para as fotos das células). *Candida stellimalicola* ACBL-04 (A); ACBL-05 (B); *C. stellimalicola* ACBL-06 (C); *C. stellimalicola* ACBL-07 (D); *C. stellimalicola* ACBL-08 (E); *C. stellimalicola* ACBL-10 (F); ACBL-11 (G) e *Cryptococcus* sp ACBL-14 (H).....107

Figura 4. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR das linhagens de leveduras selecionadas. 1Kb – marcador molecular, os números correspondem número do código de identificação dos Agentes de Controle Biológico Levedura – ACBL.....108

POTENCIAL DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO E DO FILOPLANO DE PLANTAS CÍTRICAS NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA DE CITROS

RESUMO - Dentre as principais doenças que ocorrem na pós-colheita em citros destacam-se o bolor verde, bolor azul e a podridão azeda, ocasionadas pelos fungos *Penicillium digitatum*, *P. italicum* e *Geotrichum candidum*, respectivamente. Uma alternativa para o controle destas doenças se dá por meio da utilização de leveduras. Sendo assim, objetivou-se no presente estudo isolar, selecionar e identificar leveduras de solos, folhas, flores e frutos de citros de diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo, com potencial de aplicação como agentes de biocontrole aos fitopatógenos de pós-colheita. Foram obtidos 95 isolados de leveduras de 14 municípios do estado de São Paulo, sendo o filoplano a fonte de 90,5% dos isolados. Nos ensaios *in vitro* realizados com *G. candidum*, o ACBL-77 proporcionou o maior valor de inibição do crescimento micelial do fungo (35%) e os isolados ACBL-68 e ACB-K1 (*Saccharomyces cerevisiae*), os que proporcionaram maiores valores de inibições na germinação de conídios, 83 e 82%, respectivamente. Quando se avaliou o controle da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra, três isolados (ACBL-23, ACBL-44 e ACBL-77) foram os mais eficientes no controle da doença de maneira preventiva e curativa. Em ensaios realizados *in vitro* com *P. digitatum*, cinco isolados de levedura (ACBL-76, ACBL-82, ACBL-84 e ACBL-87) proporcionaram valores de inibições do crescimento da colônia do fungo acima de 80%. Entretanto, *in vivo* somente dois isolados (ACBL-82 e ACBL-86) foram capazes de controlar o progresso e também a incidência da doença, quando utilizados preventivamente. Na avaliação da inibição do crescimento micelial *in vitro* do *P. italicum*, oito isolados proporcionam valores de inibições acima de 80%, sendo que o ACBL-04 proporcionou 100% de controle. Nos ensaios *in vivo*, quatro isolados (ACBL-04, ACBL-05, ACBL-08 e ACBL-11) foram eficientes na diminuição do progresso do bolor azul assim como na inibição da incidência da doença, quando aplicados preventivamente.

Palavras-chave: *Citrus* spp., Controle biológico, *Geotrichum* spp., *Penicillium* spp..

POTENTIAL OF YEASTS ISOLATED FROM SOIL AND PHYLLOPLANE OF CITRUS PLANTS IN BIOCONTROL OF POSTHARVEST DISEASES OF CITRUS

ABSTRACT - Among the major diseases that occur in citrus post-harvest stand out green mold, blue mold and sour rot, caused by *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* and *Geotrichum candidum*, respectively. An alternative for the control of these diseases is through the use of yeasts. Thus, the aim of the present study was to isolate, select and identify yeasts from soil, leaves, flowers and fruits of different citrus producing regions of the São Paulo State, with potential application as biocontrol agents for postharvest pathogens. Ninety-five yeast isolates were obtained from 14 counties in the São Paulo State. The phylloplane was the source of 90.5% of the isolates. Tests conducted *in vitro*, with *G. candidum* showed that ACBL-77 presented the highest inhibition of mycelial growth (35%) and both strains ACBL-68 and ACB-K1 (*Saccharomyces cerevisiae*), provided the highest values of inhibitions of conidia germination, 83 and 82%, respectively. When the control of sour rot in fruits of 'Pera' sweet Orange was evaluated, three isolates (ACBL-23, ACBL-44 and ACBL-77) were the most effective in controlling the disease in a preventive and curative way. In *in vitro* assays with *P. digitatum*, five yeast strains (ACBL-76, ACBL-82, ACBL-84 and ACBL-87) inhibited the mycelial growth with values above 80%. However, when the ability of yeast to control green mold was evaluated on orange fruits, only two isolates (ACBL-82 and ACBL-86) were able to decrease the progress and also the incidence of the disease when used preventively. Eight isolates inhibited the mycelial growth of *P. italicum* above 80%, and the isolate ACBL-04 provided 100% of inhibition. In *in vivo* assays, four isolates (ACBL-04, ACBL-05, ACBL-08 and ACBL-11) were effective in reducing the progress of blue mold as well as in inhibiting the incidence of disease when applied preventively.

Keywords: Biological Control, *Citrus* spp., *Geotrichum* spp., *Penicillium* spp..

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO.....	x
1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	2
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. REVISÃO DA LITERATURA	3
4.1. Doenças de pós-colheita em frutos cítricos.....	3
4.1.1. Bolor verde dos frutos cítricos (<i>Penicillium digitatum</i>)	4
4.1.2. Bolor azul dos frutos cítricos (<i>Penicillium italicum</i>).....	5
4.1.3. Podridão azeda dos frutos cítricos (<i>Geotrichum candidum</i>).....	6
4.2. Controle.....	6
4.2.1. Controle Biológico	7
4.2.1.1. Controle Biológico por meio das leveduras.....	9
4.2.1.1.2. Mecanismos de interação	10
5. REFERÊNCIAS.....	13
2. CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS AOS FITOPATÓGENOS DE PÓS-COLHEITA EM CITROS.....	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Isolamento de leveduras	23
2.2. Identificação das leveduras.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1. Isolamento das leveduras	24
4. CONCLUSÃO	28
5. REFERÊNCIAS.....	29
3. CAPÍTULO 3 – POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM FRUTOS DE LARANJA PÊRA	32
RESUMO.....	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1. Fungo fitopatogênico (<i>Geotrichum candidum</i>)	36
2.2. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> à <i>Geotrichum candidum</i>	36
2.2.3. Crescimento micelial	36
2.2.4. Germinação de conídios	37
2.3. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> à <i>Geotrichum candidum</i>	38
2.3.1. Inoculação com o patógeno	38
2.3.2. Tratamentos	38

2.3.3. Análises estatísticas.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> à <i>Geotrichum candidum</i>	39
3.1.2. Crescimento micelial	45
3.1.3. Germinação de conídios	47
3.2. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> à <i>Geotrichum candidum</i>	47
3.2.1. Efeito dos tratamentos no progresso da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra.....	47
3.2.2. Efeito dos tratamentos na incidência da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra.....	50
4. CONCLUSÃO	52
5. REFERÊNCIAS.....	53
4. CAPÍTULO 4 – POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE DO BOLOR VERDE EM FRUTOS DE LARANJA LIMA	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1. Fungo fitopatogênico (<i>Penicillium digitatum</i>).....	60
2.2. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> à <i>Penicillium digitatum</i>	60
2.2.3. Crescimento micelial	60
2.3. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> à <i>Penicillium digitatum</i>	61
2.3.1. Inoculação com o patógeno	61
2.3.2. Tratamentos	62
2.3.3. Análises estatísticas.....	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> à <i>Penicillium digitatum</i>	63
3.1.2. Crescimento micelial	63
3.2. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> à <i>Penicillium digitatum</i>	70
3.2.1. Efeito dos tratamentos no progresso do bolor verde em frutos de Laranja Lima	70
3.2.2. Efeito dos tratamentos na incidência do bolor verde em frutos de Laranja Lima	72
4. CONCLUSÃO	75
5. REFERÊNCIAS.....	75
5. CAPÍTULO 5 – POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS DE LARANJA PÊRA.....	79
RESUMO	79
ABSTRACT	80
1. INTRODUÇÃO	81
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1. Fungo fitopatogênico (<i>Penicillium italicum</i>)	82
2.2. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> à <i>Penicillium italicum</i>	82
2.2.3. Crescimento micelial	82
2.3. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> à <i>Penicillium italicum</i>	83
2.3.1. Inoculação com o patógeno	83
2.3.2. Tratamentos	83
2.3.3. Análises estatísticas.....	84

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> à <i>Penicillium italicum</i>	85
3.1.2. Crescimento micelial	85
3.2. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> à <i>Penicillium italicum</i>	89
3.2.1. Efeito dos tratamentos no progresso do bolor azul em frutos de Laranja Pêra.....	89
3.2.2. Efeito dos tratamentos na incidência do bolor azul em frutos de Laranja Pêra.....	92
4. CONCLUSÃO	95
5. REFERÊNCIAS.....	95
6. CAPÍTULO 6 - CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS ANTANGONISTAS AOS FITOPATÓGENOS DE PÓS-COLHEITA EM CITROS.....	99
RESUMO	99
ABSTRACT	100
1. INTRODUÇÃO	101
2. MATERIAL E MÉTODOS	102
2.1. Identificação das leveduras.....	102
2.1.1. Extração de DNA	102
2.1.2. Amplificação da região ITS do rDNA.....	103
2.1.3. Sequenciamento da região ITS do rDNA	104
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
3.1. Identificação das leveduras.....	104
4. CONCLUSÃO	110
5. REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICE.....	113

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira ocupa lugar de destaque no cenário mundial, sendo o Brasil o maior produtor de laranja, respondendo por cerca de 30% da produção de frutos, 50% da produção de suco, com participação de 85% do suco comercializado internacionalmente (NEVES, 2010). A produção brasileira em 2011 foi de aproximadamente 19 mil toneladas, sendo que cultura está assentada em uma área aproximada de 795 mil hectares, dos quais 74% encontram-se localizados na região sudeste do país, principalmente no estado de São Paulo (AGRIANUAL, 2012).

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).

Dentre as doenças de pós-colheita, destacam-se os bolores dos frutos cítricos, causados por *Penicillium digitatum* e *Penicillium 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. 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 e 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.

Devido à crescente restrição ao uso de fungicidas em pós-colheita, a demanda por produtos orgânicos e ao desenvolvimento de linhagens resistentes dos patógenos aos fungicidas utilizados (ECKERT et al., 1993), têm-se tornado imprescindível a busca de novas alternativas de controle. Neste contexto, o controle biológico de fitopatógenos se apresenta como uma alternativa promissora, na substituição parcial e/ou total ao uso de fungicidas.

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 *Penicillium 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).

2. OBJETIVO GERAL

Isolar, selecionar e identificar leveduras de solo, flor, folha e frutos de citros, com potencial de aplicação como agentes de biocontrole aos principais patógenos que ocorrem na pós-colheita em citros.

3. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- i. Isolar leveduras de solo, folhas, flores e frutos de citros de diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo, com potencial de aplicação como agentes de biocontrole;
- ii. Avaliar *in vitro* a ação antagônica dos isolados de leveduras no controle dos fungos *Penicillium digitatum*, *P. italicum* e *Geotrichum candidum*;
- iii. Avaliar *in vivo* o controle dos fitopatógenos, utilizando os isolados de leveduras que obtiveram os melhores resultados nos testes *in vitro*;
- iv. Identificar os isolados de levedura mais eficientes no controle dos fitopatógenos de pós-colheita em citros.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Doenças de Pós-colheita em frutos cítricos

O Brasil é considerado um dos principais países produtores de citros e o maior exportador de laranja (AGRIANUAL, 2012). Doenças de pós-colheita representam grande perda econômica, sendo que para a exportação há cada vez mais a exigência de frutos isentos ou com baixos valores de resíduos químicos.

Em relação a alguns patógenos de importância em pós-colheita em citros pode-se destacar, *Phyllosticta citricarpa* (mancha preta dos citros), *Geotrichum candidum* (podridão azeda), *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnose), *Penicillium digitatum* (bolor verde) e *P. italicum* (bolor azul), sendo os bolores verde e azul, as doenças de pós-colheita que representam maior impacto econômico em todo o mundo (ECKERT & EAKS, 1989).

Problemas fitossanitários de pós-colheita são amplamente utilizados como barreiras não tarifárias, no intuito de restringir as importações por países, principalmente, da União Européia (UE), com objetivos protecionistas, sendo que a

UE considera como doenças quarentenárias (doenças que não estão presentes em nenhuma área dos países membros) para frutos cítricos com sintomas da mancha preta dos citros. Uma seleção adequada de frutos no *packing-house*, eliminando frutos com sintomas da doença, pode diminuir os problemas na exportação, entretanto, os frutos podem expressar sintomas de pós-colheita durante o transporte e armazenamento (TOFFANO, 2005).

As infecções em pós-colheita ocorrem principalmente através de ferimentos ocasionados durante o processo de colheita e transporte dos frutos, podendo também se originar no campo pela ação de agentes bióticos (insetos, pássaros, etc.) ou abióticos (vento, chuva, granizo, etc) (ECKERT & EAKS, 1989). Para reduzir a possibilidade de problemas fitossanitários, algumas medidas, como cuidados com os frutos durante a colheita, o manuseio e o transporte, devem ser tomadas, além da utilização de produtos para o controle desses fitopatógenos.

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

O bolor verde é a principal doença que ocorre na pós-colheita em citros e está disseminada em todos os países produtores, afetando todas as espécies e cultivares. A ocorrência desta doença depende das condições climáticas e da forma de manipulação dos frutos, desde a colheita até a o consumo, podendo a doença ocorrer durante transporte e armazenamento dos frutos cítricos (LIU et al., 2013).

O fungo e agente causal do bolor verde, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. 1881 é um Ascomiceto, pertencente à ordem dos Eurotiales, sobrevivendo saprofiticamente, em pomares e outros ambientes, sobre diferentes substratos orgânicos, na forma de conídios, podendo afetar os frutos ainda no campo, em fase final de maturação. Porém, maiores prejuízos são ocasionados quando a infecção ocorre após a colheita, durante os processos de armazenamento e transporte. O tamanho dos conídios pode variar de 4 a 7 µm x 6 a 8 µm, com formato ligeiramente cilíndrico a ovalado, os quais são produzidos em cadeia, motivo pelo qual são denominados esporos catenulados, variando ligeiramente na forma e no tamanho, e são disseminados, principalmente pelo vento, atingindo a superfície dos frutos, onde penetram pelos ferimentos. 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 (LARANJEIRA et al., 2002).

A doença é caracterizada por ocasionar podridão mole nos frutos cítricos, e quando as lesões atingem entre 2-3 cm são cobertas pelo micélio do fungo e os conídios de cor verde-oliva, são produzidos no centro das mesmas, sendo que em condições favoráveis (24°C), o diâmetro da lesão pode alcançar de 4 a 5 cm de diâmetro em menos de dois dias. Após a ocorrência dos sintomas, baixos valores de umidade fazem com que os frutos murchem e mumifiquem, já em condições onde a umidade relativa é alta, outros microrganismos como fungos e bactérias, podem se desenvolver nas lesões, fazendo com que o fruto apodreça mais rapidamente. Os frutos, depois de infectados, têm o período de armazenamento reduzido, principalmente, pela formação de etileno, que acelera o processo de maturação, diminuindo a vida de prateleira (LARANJEIRA et al., 2002).

4.1.2. Bolor azul dos frutos cítricos (*Penicillium italicum*)

O bolor azul, ocasionado pelo fungo *Penicillium italicum*, é menos prevalente do que o bolor verde. A doença ocorre principalmente em frutos armazenados em câmara fria. O fungo pode crescer lentamente em baixas temperaturas, e causa o apodrecimento após longos períodos de armazenamento. 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 o mesmo pode predominar sobre o *P. digitatum* (TIMER et al., 2000).

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

A podridão azeda ou podridão ácida dos frutos cítricos é uma das principais doenças que ocorre em pós-colheita, e 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, 1979).

O agente causal da podridão azeda é o fungo filamentosso leveduriforme *Geotrichum candidum*. Contudo, 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 (FENG et al., 2011; MCKAY et al., 2012).

Os frutos são infectados 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 inicialmente 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).

4.2. Controle

As medidas de controle de doenças que ocorrem na pós-colheita, acontecem ainda no campo, com cuidados durante a colheita e o manuseio dos frutos, a fim de

evitar a ocorrência de ferimentos de qualquer natureza. Práticas sanitárias visando eliminar frutos infectados e outras fontes de inóculo em pomares, veículos, equipamentos, materiais de colheita e transporte, e também a higienização dos locais onde os frutos serão processados e armazenados também são medidas importantes a serem adotadas.

Os esporos dos patógenos são facilmente levados pelo ar, água dentre outros veículos de transporte, e são abundantes nos *packing-houses*. Práticas como a lavagem com desinfetantes, como hipoclorito de sódio, são úteis para diminuir a quantidade de inóculo. Os benzimidazóis podem ser aplicados nos pomares até três semanas antes da colheita e também na fase de pós-colheita, assim como o aplicação de fungicidas como imazalil, tibendazol, tratamentos térmicos e radiações ultra violeta (FISCHER et al., 2004).

A utilização de fungicidas tem levado ao surgimento de linhagens de patógenos resistentes, que normalmente apresentam crescimento mais lento e menor capacidade competitiva, quando comparado aos sensíveis. Porém, alguns isolados mostram persistência por longos períodos, indicando uma possível seleção da capacidade adaptativa, competitiva e persistência da resistência (KINAY et al., 2007). A integração de produtos biológicos e químicos pode reduzir a ampla aplicação de fungicidas (LUCON et al., 2010), além da combinação de antagonistas e fungicidas sintéticos proporcionar uma proteção integrada e com menores riscos de desenvolvimento de linhagens do resistentes patógeno (ARRAS et al., 2002). O emprego de agentes de biocontrole no manejo de doenças em pós-colheita é um dos métodos mais apropriado para substituir os produtos químicos (SHARMA, 2009).

4.2.1. Controle Biológico

No contexto do controle biológico, doença é mais do que uma íntima interação entre o patógeno e o hospedeiro, a qual é influenciada pelo ambiente. A doença é o resultado de uma interação entre o hospedeiro, patógeno, e diversos não patógenos, que habitam o local da infecção e apresentam potencial para limitar a atividade de determinado patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro (COOK & BAKER, 1983; COOK, 1985). Sendo assim, os componentes do controle biológico são o

patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, influenciados por fatores ambientais interagindo em um sistema biológico (KIMATI et al, 1997).

Para o controle de doenças de plantas, faz-se o uso principalmente de agrotóxicos, os quais, muitas vezes, são a única ferramenta capaz de exterminar o problema. Porém, a crescente utilização destes produtos causa a contaminação do ambiente, podendo contaminar o solo, rios, lagos, lençóis freáticos, além de serem muitas vezes carcinogênicos (LIMA et al., 2000). Sendo assim, atualmente existe uma crescente preocupação de produtores, consumidores e pesquisadores, visando à substituição parcial e/ou total destes produtos por métodos de controle alternativos, com substâncias livres de resíduos tóxicos ou através do controle biológico.

Segundo Cook & 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 de maneira simultânea 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 bioprodutos, contendo como ingredientes ativos, microrganismos antagonistas. Atualmente, há um aumento no interesse de empresas em desenvolver produtos biológicos para o controle de doenças, principalmente 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).

A utilização de fungicidas químicos tem levado ao surgimento de linhagens resistentes de patógenos aos produtos utilizados (DUFFY et al. 2003). No controle

biológico existe também a possibilidade de haver mudanças no microrganismo patogênico que levam ao surgimento de linhagens resistentes, devido às constantes pressões exercidas pelos agentes de biocontrole. Porém, os microrganismos antagonísticos podem apresentar diferentes mecanismos de ação em relação aos produtos químicos e podem, conseqüentemente, ser aplicados de maneira alternada, a fim de reduzir o possível desenvolvimento de resistência (FRAVEL, 2005).

As leveduras constituem um grupo microbiano com diferentes propriedades, que as caracterizam como potenciais candidatas ao controle de fitopatógenos. Leveduras estão presentes naturalmente na superfície de plantas, se reproduzem rapidamente, e competem no local da infecção do patógeno por espaço e nutrientes, além de algumas espécies antagonísticas serem capazes de produzir enzimas hidrolíticas, compostos antibióticos e toxinas *killer* (McCORMACK et al., 1994; WALKER et al., 1995; JIJAKLI & LEPOIVRE, 1998; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006).

4.2.1.1. Controle Biológico por meio de Leveduras

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) (LIU et al., 2013).

A importância das leveduras remonta ao começo da história da humanidade através da produção do pão, alimento de grande importância para a maioria das culturas, além da elaboração de outros produtos tais como, álcool etílico, vinho e cerveja. A espécie de levedura mais conhecida é a *Saccharomyces cerevisiae*, que é importante na biotecnologia, sendo amplamente utilizada em diferentes aplicações

industriais, principalmente na indústria alimentícia e sucroalcooleira (EL-DASH et al., 1980).

A vantagem no uso de leveduras no biocontrole 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). As leveduras possuem grande capacidade como agentes de biocontrole também por outros fatores, como o fato de não produzirem micotoxinas, antibióticos ou outras moléculas cuja presença não é aceitável em alimentos, como os frutos destinados ao consumo *in natura* (DROBY et al., 1992). Outra vantagem da sua utilização no controle 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.

Apesar de todo o conhecimento sobre algumas funções das leveduras no ambiente, muito ainda há para ser descoberto, principalmente sobre o seu modo de ação em diferentes ambientes e no antagonismo a outros organismos (ROSA-MAGRI et al. 2011).

4.2.1.1.2. Mecanismos de interação

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)

A atuação das leveduras no controle biológico se dá por meio da inibição de algum estágio do desenvolvimento da doença ou do ciclo de vida do fitopatógeno através de diferentes mecanismos. 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).

O mecanismo pelo qual um agente de biocontrole pode inibir um fitopatógeno geralmente não é facilmente compreendido, devido à dificuldade em separar os mecanismos de ação possíveis no ambiente, sendo que, de maneira geral, diferentes modalidades de ação estão envolvidas no antagonismo de determinado agente (JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002). Salvo exceções, um agente de controle biológico bem sucedido possui diversas características, que agem frequentemente em conjunto, e que podem ser importantes para o controle efetivo da doença. A possibilidade de um antagonista interferir nos processos vitais dos fitopatógenos através de mais de um mecanismo de ação se constitui em uma característica importante, devido ao aumento da probabilidade de sucesso no controle (GOUVEA, 2007). Os mecanismos das interações entre microrganismos patogênicos e antagônicos podem ser divididos em competição por nutrientes, antibiose, indução de defesa do hospedeiro e parasitismo (BERGAMIM FILHO et al., 1995).

O mecanismo ação mais observado em leveduras é a competição por espaço e nutrientes (JANISIEWICZ et al., 2000). A competição entre os microrganismos por nutrientes e espaço, apresenta-se como um dos mecanismos de controle biológico, fundamental nos estudos das interações levedura-fungo filamentoso (BLEVE et al., 2006). Fungos fitopatogênicos necessitam de portas de entrada (ferimentos, estômatos, etc) no 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 e UTKHEDE, 2003).

A parede celular do fungo é composta de 80 a 90% de carboidratos, dentre eles quitina e β -1,3-glucana, além de proteínas e lipídios. Portanto, a capacidade de determinado organismo antagonista produzir enzimas como quitinase e β -1,3-glucanase, o tornar capaz de atuar no controle do desenvolvimento fúngico. Na literatura são encontrados muitos trabalhos com a utilização de leveduras capazes de produzir enzimas hidrolíticas, utilizando esse mecanismo no controle de fungos fitopatogênicos (CASTORIA et al. 2001; MASIH e PAUL, 2002; URQUHART e PUNJA, 2002; CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2007).

Algumas leveduras são capazes de secretar uma toxina proteica, a qual mata outras células de leveduras sensíveis a ela, sendo esta denominada toxina *killer* (MAKOWER & BEVAN, 1963). Além de controlar o crescimento de outras leveduras, as linhagens *killer* podem apresentar comportamento antagônico a outros grupos microbianos, como bactérias e fungos filamentosos. Na literatura existem trabalhos empregando leveduras *killer* no controle de fitopatógenos, inibindo principalmente o crescimento micelial (WALKER et al.1995; COELHO 2005; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006; CABRAL et al. 2009).

A resistência induzida é um fenômeno biológico complexo que envolve a ativação de vários mecanismos, entre eles a hipersensibilidade, barreiras estruturais, aumento de síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), como a hidrolase β -1,3-glucanase (HAMMERSCHMIDT, 1999). 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 (PASCHOLATTI & LEITE, 1995). A ativação desses mecanismos de resistência apresenta-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) plantas, 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 e LEITE, 1995; LEITE et al., 1997).

A enzima peroxidase, conhecida por participar de vários processos fisiológicos, está relacionada à oxidação de compostos fenólicos e síntese do hormônio vegetal etileno, sendo que a alteração na sua atividade no processo de infecção tem sido relacionada à resistência das plantas contra o ataque de fungos fitopatogênicos. Roncatto e Pascholatti (1998) avaliaram a ação da levedura *S. cerevisiae* no perfil eletroforético de peroxidase em plantas de milho e sorgo, e observaram que a suspensão de células ou mesmo o filtrado da levedura foi capaz de alterar o padrão de atividade da enzima nas plantas. Esse resultado caracteriza a ação da levedura como estimuladora do processo de resistência da planta à

fitopatógenos que potencialmente podem vir a causar danos na cultura (ROSA-MAGRI et al. 2011).

Outro mecanismo utilizado por leveduras é a produção de compostos antimicrobianos. Urquhart e Punja (2002) purificaram um ácido graxo com atividade antifúngica de *Tilletiopsis pallescens* capaz de inibir o desenvolvimento do tubo germinativo e causar o colapso da hifa e do conídio do fitopatógeno *Podosphaera xanthii*. A levedura *Pseudozyma flocculosa* também apresenta a habilidade de produzir um composto contendo ácidos graxos, o qual tem a capacidade de afetar a permeabilidade da membrana do microrganismo alvo e inibir seu desenvolvimento (AVIS e BÉLANGE, 2001).

As células de leveduras podem apresentar micoparasitismo, aderindo-se nas hifas e esporos fúngicos, onde ocorre uma grande interação entre o patógeno e a levedura antagonista (ELTARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006). Trabalhos de Arras et al. (2002) demonstraram uma rápida colonização do micélio de *Penicillium digitatum* por *Candida famata*, com ação lítica e fagocítica da levedura contra a hifa fúngica. A forte ligação de células de *Pichia guilliermondii* ao micélio de *Penicillium italicum* causou a degradação da parede celular da hifa próxima do local onde as células de leveduras se aderiram.

5. REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL: Anuário da Agricultura Brasileira, 2012. São Paulo: FNP, 255-268.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology, 5 ed, 2005.
- 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.
- AVIS, T.J.; BÉLANGER, R.R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.956-960, 2001.
- BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3. Ed., Piracicaba: Ceres, 919 p., 1995.

- 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**, v.108, p.204-209, 2006.
- BROWN, G.E. Sour rot. Causal organism and disease cycle. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Science Extension Service Fact Sheet PP 137, 2003.
- BROWN, G.E., Biology and control of *Geotrichum candidum*, the cause of citrus sour rot, Proc. Fla. **State Hort. Soc.** 92:186-189, 1979.
- CABRAL, A.S., CARVALHO, P.M.B., PINOTTI, T., HAGLER, A.N., MENDONÇA-HAGLER, L.C.S., MACRAE, A., 2009. Yeast inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of 'witches' broom disease. *Braz. J. Microbiol.*, 40, 108-110.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACÍFICO, S.; DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Biotechnology**, v.22, p.7-17, 2001.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A., RUENWONGSA, P., PANIJPAN, B., 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*), *Biol. Control*, 42, 326–335.
- COELHO, A.R. **Controle de *Penicillium expansum* / Biodegradação de Patulina: Perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita.** 2005. 130p. Tese de doutorado - 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, 539p.
- COOK, R.J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, 75:25-29, 1985.
- DROBY, S., CHALUTZ, E., WILSON, C. L., WISNIEWSKI, M. E., 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides, **Phytoparasitica**, 20, 149-153.

- DROBY, S., VINOKUR, V., WEISS, B., COHEN, L., DAUS, A., GOLDSCHMIDT, E.E., PORAT, R., 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Biol. Control**. 92, 4, 393-399.
- DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p.501-38, 2003.
- ECKERT, J.W. Post-harvest diseases of citrus fruits. **Agriculture Outlook**, Washington, v.54, p. 225-232, 1993.
- 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. CA: University of California Press, 1989. v.5. p. 179-260.
- EL-DASH, A.A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N.M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: FTPT, 1980. 349p.
- EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Biomedical and Life Sciences**, v.47, n.1, p.25-35, 2006.
- FENG, L., WU, F., LI, J., JIANG, Y., DUAN, X., 2011. 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**, 61, 160–164.
- FILONOW, A.B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p.243-256, 1998.
- FISCHER, I.H.; SPÓSITO, M.B.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. 2004. Eficiência dos fungicidas thiabendazole + imazalil, aplicados previamente ou em mistura à cera, no controle do bolor verde em citros. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.16, p.22,204. Suplemento.
- FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.337-359, 2005.
- GOUVEA, A. Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*. (Tese de doutorado) Curitiba : [s.n.], 2007. xviii, 85f. : il, 30 cm

- HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v.55, n.2, p.77-84, 1999.
- 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**, v.90, p-1196-1200, 2000.
- JIJAKLI, M.H.; LEPOIVRE, P. Characterization of exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, v.88, p.335-343, 1998.
- KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de Fitopatologia, Volume 2: Doenças das plantas cultivadas, 3 ed., São Paulo: Agrônômica Ceres, 1997.
- KINAY, P.; MANSOUR, M. F.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 647-656, 2007.
- LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and Yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a Taxonomy Study**, 4th Edition. Amsterdam: Elsevier, 1998, p. 21-30.
- 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, v.2, p. 141-214, 2002.
- 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, v.5, p.235-280, 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**. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p.263-304, 2000.
- LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Internat. Journ. of Food Microbiol.* 167, 153–160.
- LIU, X., WANG, L.P., LI, Y.C., LI, H.Y., YU, T., ZHENG, X.D., 2009. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1450–1456.
- LUCON, C. M. M.; GUZZO, S. D.; DE JESUS, C. O.; PASCHOLATI, S. F.; DE GOES, A. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 766-772, 2010.
- MAKOWER, M.; BEVAN, E.A. The physiological basis of the killer character in yeast. In: **Genetics Today, XI International Congress of Genetic**, v.1, p.202-203, 1963.
- MASIH, E.I.; PAUL, B. Secretion of beta-1,3-glucanase by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing mold disease of the grapevine. **Current Microbiology**, New York, v.44, p.391-395, 2002.
- 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.
- MCCORMACK, P.J.; WILDMAN, H.G.; JEFFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.3, p.927-931, 1994.
- MCKAY, A. H., FÖSTER, H., ADASKAVEG, J.E., 2012. Distinguishing *Galactomyces citri-aurantii* from *G. geotrichum* and characterizing population structure of the two postharvest sour rot pathogens of fruit crops in California. **Phytopathology**, 102, 5, 528-538.

- MERCIER, I. E SMILANICK, J.L., 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. **Biol. Control**, 32, 401-407.
- MILLER, M.W. Yeasts in food spoilage: an update. **Food Technology**, v.33, p.76-80, 1979.
- NEVES, M.F., 2010. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: FEA/USP, 137.
- PALOU, L., SMILANICK, J.L., CRISOSTO, C.H., 2009. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. **J. Food Prot.** 72, 1037-1046.
- 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, cap. 22, p.417-422, 1995.
- PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soils. **The Yeasts**, London:Academic Press, 1987, 508p., p.123-180.
- 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**, 2003, 94: 594-554.
- 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.
- 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, 1998.
- ROSA-MAGRI, M.M.; TAUK-TORNISIELO, S.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds, Braz. **Arch. Biol. Technol.** v.54 n. 1: pp. 1-5, 2011.
- SHARMA, R.R., SINGH, D., SINGH, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biol. Control**, 50, 205–221.

- SUPRAPTA, D.N., ARAI, K., IWAI, H., 1995. Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. **Mycoscience** 36, 277-282.
- TIMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. Compendium of postharvest diseases, 2 ed, **The American Phytopathological Society.**, St Paul, Minnesota, USA, 2000.
- TOFFANO, L. **Doenças pós-colheita em citros: potencial de *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência.** Dissertação de mestrado, Piracicaba, 2005, p.85.
- TOURNAS, V.H., 2005. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Critical Reviews in Microbiology**, 31, 33–44.
- URQUHART, E.J.; PUNJA, Z.K. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.219-229, 2002.
- WALKER, G.M.; MCLEOD, A.H.; HODGSON, V.J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v.127, p.213-222, 1995.
- WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., DROBY, S.; CHALUTZ, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae** 53, 183-189.

CAPÍTULO 2- ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DO SOLO E DO FILOPLANO DE PLANTAS CÍTRICAS

RESUMO - A obtenção de um agente de biocontrole é um processo longo, que envolve várias etapas, iniciando pelo método de isolamento e seleção dos microrganismos com potenciais para o biocontrole, até à obtenção de isolados com características que sejam desejáveis para a formulação de um produto comercial. As leveduras são microrganismos com potencial para o biocontrole de fitopatógenos de pós-colheita, pois apresentarem características que as tornam eficientes como antagonistas de fungos patogênicos, sem produzirem micotoxinas e substâncias antibióticas, o que poderia deixar resíduos em frutos para o consumo *in natura*. Sendo assim, objetivou-se no presente estudo isolar leveduras de solos, flores, frutos e folhas de citros de diferentes regiões do estado de São Paulo, Brasil, com potencial de aplicação como agentes de biocontrole aos principais fitopatógenos de pós-colheita em citros. Para o isolamento das leveduras, foi utilizada a técnica de diluição decimal com plaqueamento em meio YEPD, YM e WLN. Após o plaqueamento, as culturas foram incubadas a 25°C durante 7 dias na câmara para BOD e as colônias com morfologias distintas foram purificadas em meio YEPD e armazenadas para testes posteriores. Foram obtidos 95 isolados de leveduras de 14 municípios do estado de São Paulo, apresentando colônias com morfologias distintas e diferentes tipos de células vegetativas, sendo o filoplano a fonte de 90,5% dos isolados.

Palavras-chave: Agentes de biocontrole, *Citrus* spp., *Geotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*.

CHAPTER 2 - ISOLATION OF YEASTS FROM SOIL AND PHYLLOPLANE OF CITRUS PLANTS

ABSTRACT - Obtaining a biocontrol agent is a long process which involves several steps, starting with the method of isolation and selection of microorganisms with potential for disease control and with characteristics that are desirable for the formulation of a commercial product. Yeasts have characteristics that make them effective antagonists of fungi pathogens, without producing mycotoxins and antibiotic substances, which could leave residues on fruits for fresh consumption. This work aimed to isolate yeasts obtained from soils, leaves, fruits and flowers of citrus from different places in the State of São Paulo, Brazil for the antagonism to the pathogens of citrus postharvest. For the isolation of yeasts it was used the decimal dilution technique with plating in YEPD, YM and WLN medium. The cultures were incubated at 25°C for 7 days in BOD chamber and the colonies with distinct morphology were purified in YEPD medium. Altogether 95 yeast isolates were obtained from 14 counties in the State of São Paulo, with colonies with different morphologies and different types of vegetative cells, and the phylloplane was the source of 90.5% of the isolates.

Keywords: Biocontrol agents, *Citrus* spp., *Geotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUÇÃO

Leveduras, em geral, 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). Este grupo de microrganismos é importante e conhecido, principalmente, por participar ativamente em diversos processos biotecnológicos (EL-DASH et al., 1980). A espécie mais conhecida e estudada deste grupo de microrganismos é a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo amplamente utilizada na indústria alimentícia, para a produção de pães e bebidas alcoólicas como vinho, cachaça e cerveja; na indústria sucroalcooleira para a produção de álcool etílico (KURTZMAN & FELL, 1998; ROSA-MAGRI et al., 2011).

Outras espécies de leveduras também são estudadas para diferentes finalidades, sendo o controle biológico uma das áreas mais promissoras. Alguns exemplos de leveduras antagônicas são *Candida oleophila* e *Cryptococcus albidus*, que estão disponíveis comercialmente sob os nomes comerciais de Aspire[®] (Ecogen Inc., Langhorn, PA) e YieldPlus[®] (Anchor Yeast, Cidade do Cabo, África do Sul), respectivamente, as quais proporcionam o controle de fitopatógenos causadores de podridões ocorrentes na pós-colheita de frutas e vegetais. Sob o ponto de vista de segurança alimentar, um aspecto a ser considerado trata-se do fato das leveduras apresentarem características que as tornam eficientes como agentes no controle biológico de fungos fitopatogênicos, por não produzir esporos que, os quais podem causar processos alérgicos, ou micotoxinas, potencialmente causadoras de doenças, como ocorrem com alguns fungos filamentosos e, também pelo fato de não produzirem substâncias antibióticas, como algumas espécies bacterianas antagônicas, o que poderia deixar resíduos em frutos para o consumo *in natura*; além de conter quantidades elevadas de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais, os quais são relatados em trabalhos que indicam os benefícios das leveduras como complemento alimentar (DROBY & CHALUTZ, 1994; HUSSEIN et al., 1996; DROBY et al., 2002; GAMAGAE et al., 2004; KUPPER et al., 2013).

Leveduras possuem ampla distribuição no ambiente, podendo ser encontradas em ambientes aquáticos como lagos, rios e mares e, em ambientes terrestres, sendo a superfície das plantas, o ambiente mais propício para o desenvolvimento destes microrganismos, devido principalmente, à maior concentração de açúcares, permitindo que as mesmas se desenvolvam de forma rápida, utilizando-se de todos os nutrientes e espaço (FIALHO, 2004; SHARMA et al., 2009). Outra característica importante deste grupo de microrganismos para o controle biológico se dá ao fato das leveduras apresentarem capacidade de sobreviver em superfícies com baixa umidade por um longo período, além de serem capazes de sobreviver em superfícies com pesticidas (WILSON et al., 1993; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006).

A obtenção de um agente de biocontrole é um processo longo, que envolve várias etapas, iniciando pelo método de isolamento e seleção dos microrganismos com potenciais para o biocontrole, até à obtenção de isolados com características que sejam desejáveis para a formulação de um produto comercial (DROBY et al. 2002). Uma vez que uma levedura é isolada, o próximo passo é avaliar a capacidade antagônica da mesma em relação a um determinado patógeno. Em geral, apenas 2-5% de todos os isolados obtidos apresentam capacidade antagônica (NUNES et al. 2012).

Neste trabalho, objetivou-se isolar leveduras de solos e do filoplano de plantas cítricas com potencial de aplicação como agente de biocontrole aos principais fitopatógenos de pós-colheita em citros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento das leveduras

Os Agentes de Controle Biológico-Levedura (ACBL) foram isolados de amostras de solo, folhas, flores e frutos de citros, obtidas em pomares de 14 regiões produtoras de citros do estado de São Paulo, Brasil. As amostras, foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia

e Controle Biológico do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”/IAC - Cordeirópolis/SP, para a realização do isolamento.

O isolamento das leveduras foi realizado de acordo com Azeredo et al. (1998), por meio da técnica de diluição decimal, utilizando solução salina 0,85% para solo e solução de água estéril de lavagem para folhas, flores e frutos, com agitação a 250 rpm por 30 minutos; o plaqueamento foi feito em triplicata, utilizando os meios de cultura: YEPD (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose, 2% agar, 0,01% ampicilina e 0,01% ácido nalidíxico, dissolvidos em água destilada), YM (0,3 % de extrato de malte, 0,3 % de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1 % de glicose, 2 % de ágar, dissolvidos em água destilada) e WLN (80 g do meio WL Nutrient (Acumedia®) dissolvidos em 1 litro de meio, 0,01% ampicilina e 0,01% ácido nalidíxico) (ROSA-MAGRI et al., 2011).

As culturas foram incubadas a 25°C em fotoperíodo de 12h/12h por um período de 3-7 dias. As colônias de leveduras com morfologias distintas foram isoladas, e analisadas em microscópio óptico comum. Em seguida, os isolados que foram confirmados como levedura, pela morfologia da colônia e da célula vegetativa, foram purificados e, mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura YEPD inclinado, para identificação em nível molecular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento das leveduras

Para a obtenção de um potencial agente de biocontrole, é importante o isolamento e seleção de microrganismos com características que sejam desejáveis para a formulação futura de um produto comercial (DROBY et al., 2002). No presente estudo foram obtidos 95 Agentes de Controle Biológico – Levedura (ACBL) de 14 regiões produtoras de citros do estado de São Paulo, Brasil (Tabela 1), dos quais, 55,8% provieram de folhas cítricas, 21% de frutos, 13,7% de flores e 9,5% de solo. Com relação às possíveis fontes para o isolamento de microrganismos antagonistas, superfícies de folhas e frutos são as mais adequadas, quando se pretende obter isolados de leveduras, considerando a rápida colonização das

mesmas neste ambiente, além do maior teor de açúcar existente (SHARMA et al., 2009).

Neste estudo, o filoplano, foi a principal fonte de obtenção dos isolados de leveduras (90,5%), sendo a rizosfera a menor fonte de obtenção dos isolados. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, onde um baixo número de antagonistas foi obtido a partir do solo (CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2007; CABRAL et al., 2009; WANG et al., 2009; ROSA-MAGRI et al., 2011). Segundo El-Tarabily & Sivasithamparam (2006) a população de levedura no solo é menor, quando comparado ao número de bactérias e fungos. Leveduras epífitas, que ocorrem naturalmente em frutas e vegetais, têm sido relatadas em muitos trabalhos como potenciais agentes de biocontrole para doenças na pós-colheita, devido, principalmente, à rápida colonização das mesmas sobre as superfícies e fermentos (DROBY et al., 2002; MEKBIB et al., 2011).

O uso de diferentes meios de cultura e antibióticos, durante o processo de isolamento e seleção de leveduras, podem interferir no número de indivíduos e espécies isoladas, além das características químicas e físicas das amostras analisadas (KURTZMAN & FELL, 1998), o que pode explicar o isolamento de organismos morfológicamente distintos neste estudo. O meio de cultura YEPD foi o que selecionou a maior percentagem de isolados com 49,5% do total, seguido dos meios WLN (28,4%) e YM (22,1%). Observações das culturas em placas de Petri com os diferentes meios utilizados para o isolamento permitiram constatar a existência de colônias com morfologias distintas, tais como: coloração, tamanho da cultura e superfície

A morfologia das células vegetativas dos isolados de levedura também foi observada, em microscópio ótico comum, onde foram encontradas células com diferentes formatos como: globosas, baciliformes, cilíndricas e ovoides (Figura 2). Considerando as diferenças entre as células vegetativas dos isolados de levedura, Kurtzman & Fell (1998) citam que a forma da célula da levedura pode refletir o modo de reprodução e, em alguns casos, é uma característica de gêneros ou até mesmo de espécies específicas.

Considerando as diferentes variedades de citros utilizadas para o isolamento de leveduras, verificou-se que o maior número de isolados foi obtido da variedade

Tangor Murcott (*Citrus sinensis* X *C. reticulata*) apresentando 24,2%, seguida da Laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (23,1%) e Laranja 'Pêra' (*C. sinensis*) com 18,9%.

Tabela 1. Isolados de levedura obtidos de solo, folha, flor e fruto de citros de diferentes localidades do estado de São Paulo.

Código do isolado	Procedência	Hospedeiro	Município
ACBL-01	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-02	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-03	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-04	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-05	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-06	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-07	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-08	Folha	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-09	Flor	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-10	Flor	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-11	Flor	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-12	Flor	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-13	Flor	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-14	Flor	Laranja 'Pêra'	Leme
ACBL-15	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-16	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-17	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-18	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-19	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-20	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-21	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-22	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-23	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-24	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-25	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-26	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-27	Folha	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-28	Fruto	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-29	Fruto	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-30	Fruto	Laranja Lima	Cordeirópolis
ACBL-31	Fruto	Laranja Lima	Cordeirópolis

Continuação Tab. 1

ACBL-32	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-33	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-34	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-35	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-36	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-37	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-38	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-39	Folha	Limão 'Tahiti'	Estiva Gerbi
ACBL-40	Folha	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-41	Folha	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-42	Folha	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-43	Flor	Laranja 'Valência'	Ipeúna
ACBL-44	Flor	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-48	Fruto	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-49	Fruto	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-50	Fruto	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-51	Fruto	Limão 'Tahiti'	Estiva Gerbi
ACBL-52	Flor	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-53	Flor	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-54	Flor	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-55	Flor	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-58	Fruto	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-59	Flor	Laranja 'Valência'	Mogi Guaçu
ACBL-61	Folha	Laranja 'Valência'	Jaboticabal
ACBL-63	Folha	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-65	Fruto	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-66	Fruto	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-67	Fruto	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-68	Fruto	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-69	Fruto	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-70	Fruto	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-71	Solo	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-72	Solo	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-73	Solo	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-74	Solo	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-75	Solo	Limão 'Tahiti'	Campinas
ACBL-76	Fruto	Tangor Murcott	Colina

Continuação Tab. 1

ACBL-77	Folha	Tangor Murcott	Colina
ACBL-78	Folha	Tangor Murcott	Colina
ACBL-80	Folha	Laranja 'Pêra'	Jales
ACBL-81	Folha	Laranja 'Pêra'	Jales
ACBL-82	Folha	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-83	Folha	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-84	Fruto	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-85	Folha	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-86	Fruto	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-87	Fruto	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-89	Folha	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-91	Folha	Tangor Murcott	Catanduva
ACBL-92	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-93	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-94	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-95	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-96	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-97	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-98	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-99	Folha	Tangor Murcott	Socorro
ACBL-100	Folha	Limão Cravo	Itápolis
ACBL-101	Folha	Tangor Murcott	Itapetininga
ACBL-102	Fruto	Laranja 'Pêra'	Ibitinga
ACBL-103	Solo	Tangor Murcott	Itapetininga
ACBL-104	Solo	Tangor Murcott	Itapetininga
ACBL-105	Solo	Tangor Murcott	Itapetininga
ACBL-106	Solo	Laranja 'Pêra'	Ibitinga

4. CONCLUSÃO

Foram obtidos 95 isolados de leveduras de diferentes regiões produtoras de citros do estado de São Paulo, os quais foram testados quanto à capacidade antotagônica à *Penicillium digitatum*, *P. italicum* e *Geotrichum candidum*, nos capítulos seguintes.

5. REFERÊNCIAS

- AZEREDO, L.A.I., GOMES, E.A.T., MENDONÇA-HAGLER, L.C., HAGLER, A.N., 1998. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, **Brazil. International. Microbiology**, 1, 205-208.
- 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, p.108-110, 2009.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, San Diego, v. 42, p. 326–335, 2007.
- DROBY, S., VINOKUR, V., WEISS, B., COHEN, L., DAUS, A., GOLDSCHMIDT, E.E., PORAT, R., 2002. Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. **Biol. Control**. 92, 4, 393-399.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. (Eds.) **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables –theory and practice**. CRC Press, 1994, p.63-75.
- DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHAND-GOYAL, T.; ECKERT, J. W.; MANULIS, S. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. **Biol. Control**, v.16, p.27-34, 1999.
- EL-DASH, A.A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N.M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: FTPT, 1980. 349p.
- EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Biomedical and Life Sciences**, v.47, n.1, p.25-35, 2006.

- FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60p. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- 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**, v.23, p.575-579, 2004.
- HUSSEIN, H.S.; MACKIE, R.I.; MERCHEN, N.R.; BAKER, D.H.; PARSONS, C.M. Effects of oleaginous yeast in growth performance, fatty acid composition of muscles, and energy utilization by poultry. **Bioresource Technology**, v.55, p.125-130, 1996.
- KUPPER, K.C., CERVANTES, A.L.L., KLEIN, M.N., SILVA, A.C., 2013. Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Rev. Bras. Frutic.**, 35, 2, 020-031.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W., **The Yeasts: Taxonomic Study**, 4^a ed. Elsevier Science, Amsterdam, 1998.
- LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and Yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a Taxonomy Study**, 4th Edition. Amsterdam: Elsevier, 1998, p. 21-30.
- MEKBIB, S.B.; REGNIER, J.C.; KORSTEN, L. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. **Tropical Plant Pathology**, vol. 36, 4, 233-240, 2011.
- MILLER, M.W. Yeasts in food spoilage: an update. **Food Technology**, v.33, p.76-80, 1979.
- NUNES, C.A., 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit, **Eur J Plant Pathol**, 133, 181-196.
- ROSA-MAGRI, M.M.; TAU-K-TORNISIELO, S.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds, Braz. **Arch. Biol. Technol.** v.54 n. 1: pp. 1-5, 2011.

- SHARMA, R.R., SINGH, D., SINGH, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biol. Control**, 50, 205–221.
- WANG, W.L.; CHI, Z.M.; LI, J.; WANG, X.H. Siderophore production by the marinederived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. **Bioresource Technology**, v.100, p.2639-2641, 2009.
- WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., DROBY, S.; CHALUTZ, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae** 53, 183-189.

CAPITULO 3 – POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM FRUTOS DE LARANJA PÊRA

RESUMO - Dentre as principais doenças que ocorrem na pós-colheita em citros destaca-se a podridão azeda, ocasionada pelo fungo *Geotrichum candidum*. Uma alternativa para o controle da doença se dá por meio da utilização de leveduras. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo isolar e selecionar leveduras de solo, folhas, flores e frutos de citros, com potencial de aplicação como agente de biocontrole à *G. candidum*. A ação antagonônica dos isolados foi avaliada pela técnica de cultivo pareado em placa de Petri. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e a avaliação foi realizada por meio da determinação do diâmetro médio da colônia do fitopatógeno. O efeito de isolados de levedura na germinação de conídios de *G. candidum* foi avaliado em lâminas de vidro contendo ágar-água, utilizando 15 isolados que proporcionaram maiores valores de inibições do crescimento da colônia do fitopatógeno *in vitro*. Para os ensaios *in vivo*, frutos de Laranja Pêra foram lavados, esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2%, feridos em dois pontos equidistantes na região mediana dos frutos a uma profundidade de 3mm e, inoculados com suspensões de conídios de *G. candidum* (1×10^4 conídios/ml) 24 horas antes e 24 horas depois dos tratamentos com suspensões dos antagonistas (1×10^7 células/ml). Nos ensaios *in vitro* somente o isolado ACBL-77 obteve valor de inibição da colônia do fitopatógeno acima de 35%. Para o ensaio de germinação de conídios, com exceção do ACBL-21, todos os demais isolados avaliados afetaram a germinação do fungo, sendo os melhores isolados ACB-K1 e ACBL-68, os quais apresentaram 82 e 83% de inibição, respectivamente. Nos ensaios *in vivo* quatro isolados de levedura mostraram potencial para o controle da podridão azeda em frutos cítricos, sendo que dois isolados, ACBL-23 e ACBL-77, mostraram eficiência de controle tanto de forma preventiva como de forma curativa.

Palavras-chave: *Citrus* spp., Controle Biológico, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

CHAPTER 3 - POTENTIAL OF YEASTS IN CONTROL OF SOUR ROT ON 'PÊRA' SWEET ORANGES

ABSTRACT - The main diseases that occur in post-harvest citrus is sour rot, caused by the fungus *Geotrichum candidum*. An alternative to controlling the disease is through the use of yeasts. Therefore, this study aimed to isolate and select yeasts from soil, leaves, flowers and fruits of citrus, with potential application as a biocontrol agent for *G. candidum*. These isolates were evaluated for the antagonism using dual culture in Petri dish. The experiment was arranged in completely randomized design, with 4 repetitions and the evaluation was performed by determination of the average diameter of the phytopathogen colony. Later, the effect of yeast isolates on the spore germination of *G. Candidum* was assessed by the technique of water-agar on glass slides using the 15 isolates that more inhibited the colony of pathogen *in vitro*. After, oranges fruits (*Citrus sinensis* cv. Pêra) were washed, the surface was sterilized with sodium hypochlorite at a 2%, injured in 2 equidistant points with 3mm depth in the middle of the fruits and inoculated with conidia suspension of *G. candidum* (1×10^4 spores/ml) 24 hours before and after the treatments with the antagonists suspension (1×10^7 cells/ml). In *in vitro* assays only the strain ACBL-77 inhibited the colony of the pathogenic fungus with value above 35%. To test the germination of conidia, except ACBL-21, all other isolates affected the germination of the fungus, and the best isolated were ACBL-68 and ACB-K1, with 82 and 83% inhibition, respectively. In *in vivo* assays, four yeast isolates showed potential for control of sour rot in citrus fruits, and two isolates, ACBL-23 and ACBL-77, showed efficient control of both preventive and curative way.

Keywords: Biological Control, *Citrus* spp., *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, respondendo por cerca de 30% da produção, 50% da produção de suco, com participação de 85% do suco comercializado internacionalmente (NEVES, 2010). A produção brasileira em 2011 foi de aproximadamente 19 mil toneladas, sendo que cultura está assentada em uma área aproximada de 795 mil hectares, dos quais 74% encontram-se localizados na região sudeste do país (AGRIANUAL, 2012).

Não obstante a importância que a atividade citrícola tem para a economia nacional, os pomares são acometidos por uma série de pragas e doenças que são responsáveis por reduções consideráveis na produtividade e na qualidade dos frutos. Dentre as principais doenças que ocorrem na pós-colheita em citros, pode-se destacar a podridão azeda, causada pelo fungo *Geotrichum candidum*. Este fitopatógeno pode ser denominado de *G. candidum* var. *citri-aurantii* (Ferraris) Cif. & F. Cif.; *Galactomyces citri-aurantii* (Ferr.) Butler ou *G. candidum* citrus race (BUTLER et al., 1988; FENG et al., 2011; MCKAY et al., 2012).

Os frutos são infectados através de ferimentos e em condições favoráveis (25-30°C e umidade elevada) e apodrecem completamente em quatro ou cinco dias e a doença pode se propagar por contato (SUPRAPTA et al., 1995; PALOU et al., 2009). Embora a ocorrência da podridão azeda seja menos comum do que os bolores verde e azul, ocasionados respectivamente por *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, a doença pode ocasionar perdas significativas em épocas de chuvas intensas (LIU et al., 2009).

Atualmente, não existem fungicidas registrados no Brasil, que sejam eficientes para o controle da podridão azeda. Sódio o-fenilfenol (Sopp), embora seja indicado para o controle da doença, possui utilização limitada devido ao risco de danos em frutos, como o escurecimento da casca e a oleocelose (LADANIYA, 2008). A guazatina (BROWN, 1988), outra substância química utilizada para o controle, não é autorizada em vários países, inclusive no Brasil (ECKERT, 1978; MERCIER e SMILANICK, 2005; LIU, et al., 2009).

A utilização de fungicidas tem levado ao surgimento de linhagens resistentes do patógeno aos princípios ativos, como tiabendazol e imazalil (LIU et al., 2009).

Aliado a isto, o alto custo no desenvolvimento de produtos químicos, e o crescimento da preocupação da sociedade com a segurança alimentar e com o meio ambiente, têm levado produtores a buscar métodos alternativos de controle, e dentre estes, o controle biológico. Dentre os antagonistas mais utilizados para o controle de doenças que ocorrem na pós-colheita, destacam-se várias espécies de leveduras, devido, principalmente, à capacidade das mesmas em colonizar e sobreviver sobre a superfície dos frutos por um longo período de tempo (LAHLALI et al., 2011).

Sob o ponto de vista de segurança alimentar, um aspecto a ser considerado trata-se da possibilidade de microrganismos antagônicos apresentarem antibiose como um de seus mecanismos de ação, o que poderia deixar algum resíduo em frutos para o consumo *in natura*. Diante desta situação, abre-se uma perspectiva positiva à utilização de leveduras, devido, principalmente, à baixa possibilidade micotoxigênica deste grupo de microrganismo, muito utilizado em processos fermentativos (KUPPER et al., 2013).

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 e vegetais. Atualmente, duas leveduras antagônicas (*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).

Neste trabalho, objetivou-se selecionar leveduras isoladas de solo, folhas, flores e frutos de citros, com potencial de aplicação como agente de biocontrole à *G. candidum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fungo fitopatogênico (*Geotrichum candidum*)

Para realização deste estudo, foi utilizado um isolado de *Geotrichum candidum* pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis, SP, Brasil.

2.2. Atividade antifúngica *in vitro* a *Geotrichum candidum*

2.2.3. Crescimento micelial

Para os testes de antagonismo, além dos isolados de levedura obtidos (Capítulo 2, item 2.1.) foram utilizados, também, seis isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (ACB-BG1, ACB-CAT1, ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1 e ACB-PE2) que foram isolados a partir do processo de fermentação para a produção de etanol, caracterizados por electroforese de cariotipagem (FIALHO et al., 2010), e pertencentes à coleção microrganismos do Laboratório de Bioquímica e Fermentação de Álcool do Departamento de Ciências Biológicas da Esalq/USP, Piracicaba-SP.

Para esse estudo, foram realizados 5 ensaios, onde avaliou-se em média 20 isolados de levedura em cada ensaio utilizando a técnica de cultivo pareado em placa de Petri (DENNIS & WEBSTER, 1971). Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados de colônias ativas de *G. candidum* cultivadas em meio BDA por 7-10 dias e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA a 3 cm de distância de discos de mesmo tamanho, contendo um isolado de cada uma das leveduras cultivadas por 48 horas em meio YEPD. O controle correspondeu ao crescimento do fungo sem o pareamento com a levedura. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, durante sete dias, a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h. Para a avaliação do antagonismo mediu-se o diâmetro da colônia do fungo em dois sentidos perpendiculares após o período de incubação. Foi utilizado um delineamento

inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para uma melhor caracterização, foi determinada uma escala de antagonismo de acordo com Sharma et al., (2009), para avaliar a ação antagônica dos isolados de levedura contra à *G. candidum*, com quatro diferentes níveis: (0) – o fungo filamentoso cresce independentemente da presença da levedura; (+) - o fungo filamentoso cresce até o limite da colônia da levedura e não se desenvolve por cima desta; (+/+) - há formação de halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação; (+/-) – há retardo no desenvolvimento micelial, mas no fim do período de incubação, o fungo filamentoso se desenvolve por cima da levedura.

2.2.4. Germinação de conídios

Foram utilizados quinze isolados de leveduras (ACBL-21; ACBL-22; ACBL-23; ACBL-34; ACBL-35; ACBL-37; ACBL-39; ACBL-42; ACBL-43; ACBL-44; ACBL-50; ACBL-52; ACBL-68; ACBL-77 e ACB-K1) que proporcionaram maiores valores de inibições no teste de antagonismo em placas de Petri. Alíquotas de 20µL de cada isolado de levedura (1×10^8 células/mL) e da suspensão de conídios de *G. candidum* (1×10^4 conídios/mL) foram depositadas, simultaneamente, em áreas demarcadas de lâminas previamente preparadas contendo meio ágar-água. Para o controle, alíquotas de água destilada e esterilizada foram depositadas no lugar dos antagonistas (KUPPER et al. 2013).

As lâminas foram depositadas no interior de placas de Petri esterilizadas, contendo algodão embebido em água destilada e esterilizada, a fim de manter a umidade. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, em fotoperíodo de 12h/12h a 25°C por 14 horas. Ao término deste período, em cada lâmina foram adicionados 10 µl de uma solução contendo azul láctico. 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. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo 6 repetições por tratamento. Os

resultados analisados pela análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3. Atividade antifúngica *in vivo* a *Geotrichum candidum*

2.3.1. Inoculação com o patógeno

Frutos de Laranja Pêra foram lavados, desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,2% e, feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas demarcadas (3mm) esterilizadas a uma profundidade de 3 mm. Em seguida, os frutos foram inoculados na região do ferimento com 20 µl de uma suspensão de *G. candidum* contendo uma concentração de 1×10^4 conídios/mL, 24 h antes (tratamento preventivo) e 24 h após (tratamento curativo) a realização dos tratamentos.

2.3.2. Tratamentos

Oito isolados de leveduras (ACBL-23; ACBL-42; *Candida stellimalicola* ACBL-44; *Saccharomyces* sp ACBL-50; ACBL-52; ACBL-68; *Sporobolomyces koalae* ACBL-77 e *S. cerevisiae* ACB-K1) foram selecionados com base nos testes *in vitro* para a realização dos tratamentos nos ensaios *in vivo*. Uma alçada de cada isolado foi retirada de colônias cultivadas por 48 h em meio YEPD, transferida em Erlenmeyer contendo 25 mL de meio YEPD líquido e incubada sob agitação de 250 rpm por 48 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de células com auxílio de um hemocitômetro, e as suspensões foram ajustadas para a concentração de 10^7 células/mL. Para o tratamento químico foi utilizado o fungicida Imazalil, na concentração de 2 mL/Litro. O controle positivo correspondeu aos frutos tratados com água destilada esterilizada no lugar dos tratamentos.

Alíquotas de 20 µl de cada um dos tratamentos foram aplicadas, com auxílio de uma pipeta automática nos ferimentos, de maneira preventiva e curativa. Após a inoculação com *G. candidum* e a realização dos tratamentos, os frutos foram armazenados por 15 dias em condição ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$ e 90% UR). A severidade

da doença foi avaliada no 9º, 11º, 13º e 15º dia após a inoculação com o fitopatógeno, medindo-se o diâmetro médio das lesões de podridão azeda com o auxílio de um paquímetro. A incidência foi avaliada pela porcentagem de frutos doentes observados no 15º dia. O ensaio foi realizado em duplicata.

2.3.3. Análises Estatísticas

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições, com 20 frutos por repetição. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre o tamanho médio das lesões ocasionadas por *G. candidum*, efetuou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que é expressa pela plotagem da proporção de doença em porcentagem, versus o tempo (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). Segundo Shaner & Finney (1977), a AACPD pode ser calculada pela fórmula:

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

n – é o número de observações/avaliações.

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

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

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antifúngica *in vitro* a *Geotrichum candidum*

3.1.2. Crescimento micelial

No primeiro ensaio, verificou-se que dentre os 29 isolados estudados, nenhum inibiu a colônia do fitopatógeno (Tabela 1). Para o segundo ensaio, dos 19 isolados de levedura testados, a maioria dos isolados (ACBL-39, ACBL-43, ACBL-

37, ACBL-35, ACBL-21, ACBL-34, ACBL-44, ACBL-42, ACBL-50, ACBL-52 e ACBL-23) inibiu *G. candidum*, com valores de inibições que variaram de 19 a 29% (Tabela 2).

No ensaio 3 (Tabela 3) dos 17 isolados de leveduras testados, somente o isolado ACBL-68 diferiu do controle, com 27% de inibição da colônia do fitopatógeno, proporcionando halo de inibição. O mesmo ocorreu no quarto ensaio, onde 21 isolados foram avaliados e somente o ACBL-77 (Figura 1), diferiu do controle, proporcionando 35% de inibição da colônia do *G. candidum* (Tabela 4).

No 5º ensaio (Tabela 5) de antagonismo *in vitro*, 15 isolados de leveduras foram estudados e, dentre esses nove isolados (ACBL-102, ACB-BG1, ACBL-101, ACB-KD1, ACBL-100, ACBL-36, ACB-CAT1, ACB-PE2 e ACB-K1) inibiram a colônia do fungo, com valores de inibições que variaram de 13 a 24%.

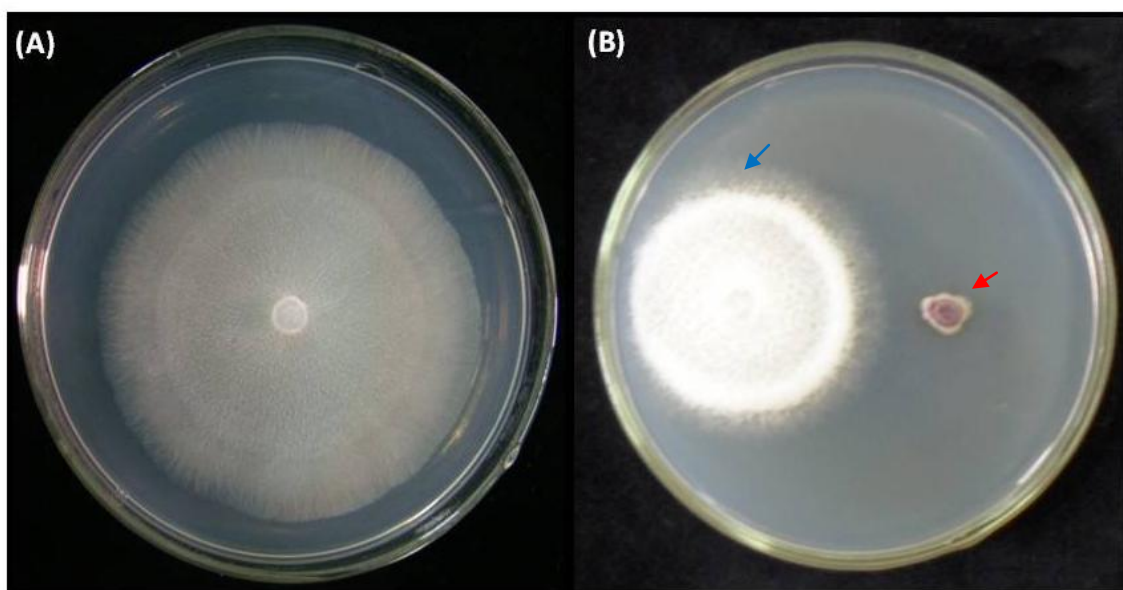


Figura 1. Efeito do isolado de levedura ACBL-77 no crescimento micelial de *Geotrichum candidum* *in vitro*. A – Controle; B- Inibição do patógeno (→) pelo isolado ACBL-77(→).

Tabela 1. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 1.

Isolado de Levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-02	4,55 c	23,91	+
ACBL-17	4,78 bc	20,07	+
ACBL-20	5,15 bc	13,88	+
ACBL-06	5,33 bc	10,87	+
ACBL-19	5,33 bc	10,87	+/+
ACBL-25	5,36 bc	10,37	+/-
ACBL-14	5,43 bc	9,20	+/+
ACBL-18	5,48 bc	8,36	+/+
ACBL-26	5,5 bc	8,03	+
ACBL-03	5,58 bc	6,69	+
ACBL-04	5,58 bc	6,69	+/+
ACBL-01	5,63 bc	5,85	+
ACBL-11	5,63 bc	5,85	+/+
ACBL-13	5,65 bc	5,52	+
ACBL-12	5,68 bc	5,02	+/+
ACBL-24	5,75 bc	3,85	+/+
ACBL-28	5,76 bc	3,68	+/-
ACBL-07	5,78 bc	3,34	+/+
ACBL-15	5,78 bc	3,34	+
ACBL-16	5,78 bc	3,34	+/+
ACBL-32	5,81 bc	2,84	0
ACBL-31	5,95 bc	0,50	+
Controle	5,98 bc	0,00	-
ACBL-09	6,00 bc	-0,33	+
ACBL-10	6,03 bc	-0,84	+/-
ACBL-33	6,13 bc	-2,51	0
ACBL-30	6,16 b	-3,01	0
ACBL-29	6,31 b	-5,52	0
ACBL-27	6,36 b	-6,35	+
ACBL-08	8,45 a	-41,30	+/-

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Tabela 2. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 2.

Isolado de Levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-23	4,88 c	28,86	+/+
ACBL-52	4,91 c	28,43	+/+
ACBL-50	5,13 bc	25,22	+/+
ACBL-42	5,25 bc	23,47	+
ACBL-44	5,26 bc	23,32	+/+
ACBL-34	5,32 bc	22,45	+/+
ACBL-21	5,37 bc	21,72	+/+
ACBL-35	5,40 bc	21,28	+
ACBL-37	5,48 bc	20,12	+
ACBL-43	5,50 bc	19,83	+
ACBL-39	5,57 bc	18,80	+/+
ACBL-54	5,63 abc	17,93	+/+
ACBL-38	5,68 abc	17,20	+
ACBL-49	5,70 abc	16,91	+
ACBL-53	5,82 abc	15,16	+
ACBL-05	5,88 abc	14,29	+
ACBL-41	5,93 abc	13,56	+
ACBL-51	6,21 ab	9,48	+
ACBL-40	6,28 ab	8,45	+
Controle	6,86 a	0,00	-

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Nos ensaios *in vitro*, verificou-se que, 23% dos isolados de leveduras obtidos inibiram, estatisticamente, a colônia do fitopatógeno, com valores de inibições entre 13% e 35%, dentre os melhores isolados encontram-se ACBL-23, ACBL-68, ACBL-77 (*S. koalae*) e o ACB-K1 (*S. cerevisiae*). Abd-Alla et al. (2007), trabalhando com isolados de *Candida* sp. e *Saccharomyces* sp. também encontraram antagonismo a *G. candidum*, com porcentagens de inibição da colônia do patógeno em até 51,1%, no entanto, os autores observaram uma inibição moderada por isolados de *Cryptococcus* sp. e *Candida* sp. com até 31,5% de inibição da colônia do fungo, similar à inibição observada com o isolado ACBL-77, obtido no presente estudo.

Maldonado et al. (2010), utilizando um isolado de *Streptomyces*, observaram que o antagonista inibiu em 29% a colônia *G. candidum* em meio sólido.

Tabela 3. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 3.

Isolado de Levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-68	5,58 b	26,70	+/+
ACBL-22	6,25 ab	17,94	+/+
ACBL-74	6,75 ab	11,38	+
ACBL-70	6,80 ab	10,72	+
ACBL-59	6,92 ab	9,19	+
ACBL-71	6,92 ab	9,19	+
ACBL-72	6,92 ab	9,19	+
ACBL-65	7,00 a	8,10	+
ACBL-55	7,07 a	7,22	+
ACBL-75	7,08 a	7,00	+
ACBL-66	7,12 a	6,56	+
ACBL-73	7,17 a	5,91	+
ACBL-61	7,25 a	4,81	+
ACBL-58	7,42 a	2,63	+
ACBL-67	7,42 a	2,63	+
ACBL-69	7,50 a	1,53	+
ACBL-63	7,58 a	0,44	+
Controle	7,62 a	0,00	-

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Tabela 4. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 4.

Isolado de Levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-77	5,44 c	35,07	+/+
ACBL-91	7,29 b	12,99	0
ACBL-81	7,31 ab	12,69	0
ACBL-97	7,44 ab	11,19	+/-
ACBL-78	7,50 ab	10,45	0
ACBL-89	7,53 ab	10,15	+
ACBL-93	7,56 ab	9,70	+
ACBL-92	7,63 ab	8,96	+
ACBL-85	7,69 ab	8,21	0
ACBL-83	7,75 ab	7,46	0
ACBL-80	7,81 ab	6,72	0
ACBL-82	8,00 ab	4,48	+
ACBL-94	8,06 ab	3,73	+
ACBL-86	8,13 ab	2,99	+/-
ACBL-98	8,15 ab	2,69	+/-
ACBL-76	8,28 ab	1,19	0
ACBL-87	8,31 ab	0,75	+/-
ACBL-99	8,31 ab	0,75	0
Controle	8,38 ab	0,00	-
ACBL-95	8,49 ab	-1,34	+
ACBL-96	8,49 ab	-1,34	0
ACBL-84	8,56 a	-2,24	0

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Tabela 5. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Geotrichum candidum*. Ensaio 5.

Isolado de Levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACB-K1	5,55 c	24,10	+/+
ACB-PE2	6,09 bc	16,75	+
ACB-CAT1	6,11 bc	16,41	+
ACBL-36	6,20 bc	15,21	+
ACBL-100	6,24 bc	14,70	+
ACB-KD1	6,26 bc	14,36	+/+
ACBL-101	6,31 bc	13,68	+
ACB-BG1	6,33 bc	13,50	+
ACBL-102	6,34 bc	13,33	+/-
ACBL-104	6,54 ab	10,60	+
ACB-CR1	6,59 ab	9,91	+
ACBL-105	6,63 ab	9,40	+
ACBL-106	6,63 ab	9,40	+
ACBL-48	6,63 ab	9,40	+
ACBL-103	6,84 ab	6,50	+
Controle	7,31 a	0,00	-

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

3.1.3. Germinação de conídios

No ensaio de inibição da germinação de conídios de *G. candidum*, por meio da utilização de isolados de leveduras, com exceção do ACBL-21, todos os demais isolados avaliados inibiram a germinação de conídios do fungo (Figura 2), sendo que maiores valores de inibições foram encontrados nos isolados ACB-K1 (82%) e ACBL-68 (83%) (Figura 3).

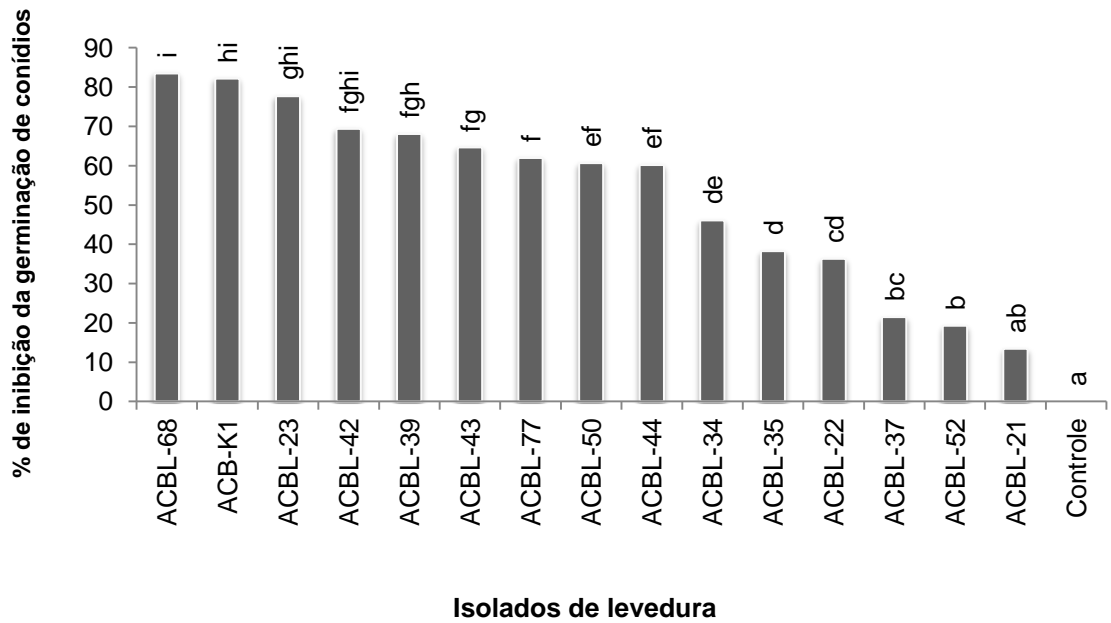


Figura 2. Efeito de diferentes isolados de levedura na inibição da germinação de conídios de *G. candidum*. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.

Resultados semelhantes podem ser encontrados nos estudos realizados por Abda-Alla et al. (2007), que avaliando o potencial antagônico de nove isolados de leveduras na germinação de *G. candidum*, observaram que todos afetaram a germinação de conídios do fitopatógeno, sendo o isolado de *S. cerevisiae*, o que apresentou o maior valor de inibição (82%), sendo que resultados semelhantes foram encontrados pelo isolado de *S. cerevisiae* (ACB-K1) no respectivo trabalho.

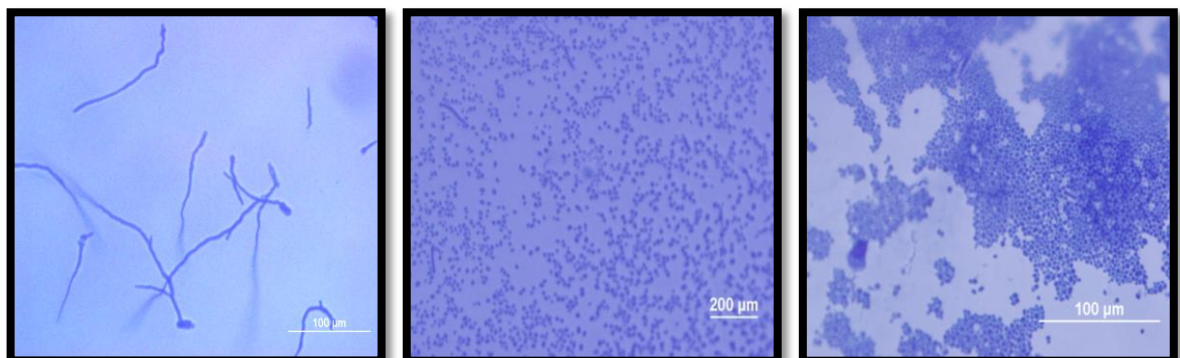


Figura 3. Efeito dos isolados de levedura ACB-K1(B) e ACBL-68 (C) na inibição da germinação de conídios de *Geotrichum candidum* observados em microscópio óptico comum (aumento de 400 X). Controle (A).

3.2. Atividade antifúngica *in vivo* a *Geotrichum candidum*

3.2.1. Efeito dos tratamentos no progresso da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra

Quando frutos de Laranja Pêra foram tratados 24 horas antes da inoculação com o fitopatógeno (tratamento preventivo), somente os frutos tratados com o fungicida imazalil não diferiram do controle quanto ao tamanho médio das lesões ocasionados por *G. candidum*. Menores valores do desenvolvimento do tamanho das lesões de podridão azeda foram proporcionados quando os frutos foram tratados com os isolados ACBL-44, ACBL-77, ACBL-23, ACBL-52, ACBL-42, ACBL-68 e ACB-K1 com valores de tamanho médio das lesões que variaram de 5,8 a 54,9 mm (Figura 4-A e Figura 5-A). Para o tratamento curativo, os melhores tratamentos foram ACBL-23, apresentando 5,6 mm de tamanho médio das lesões, seguido dos tratamentos ACBL-68 (12,1 mm), ACBL-77 (14,2 mm), ACBL-44 (26,9 mm), Imazalil (26,9 mm), ACBL-42 (47 mm) e ACBL-52 (62,9 mm) (Figura 4-B e Figura 5-B).

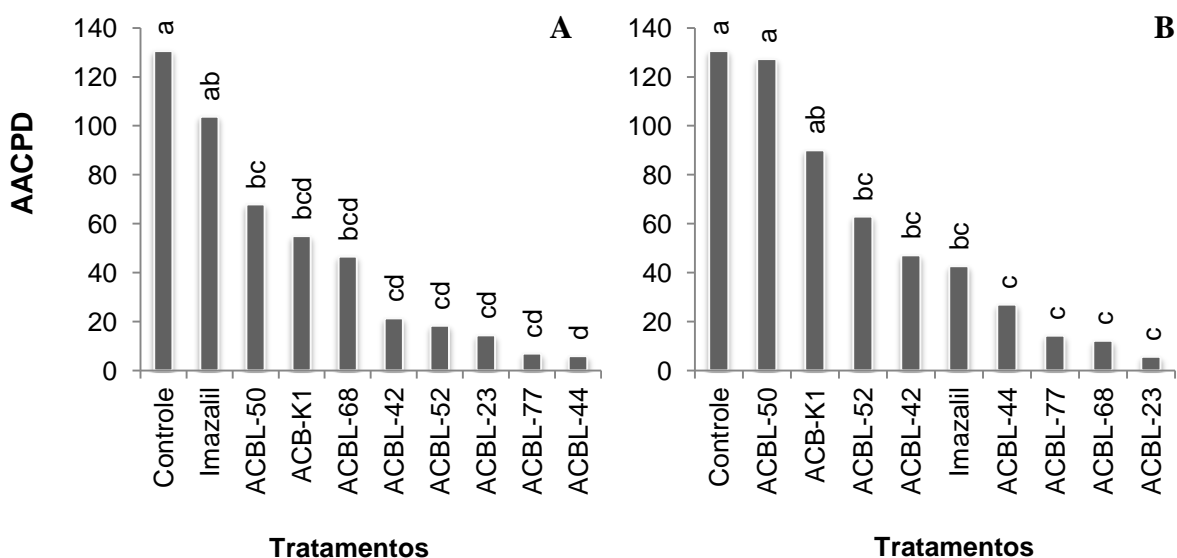


Figura 4. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *G. candidum*, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a 25 ± 5°C e 90% de UR. Significância estatística determinada em P < 0,05 de acordo com o teste Tukey de separação de médias.

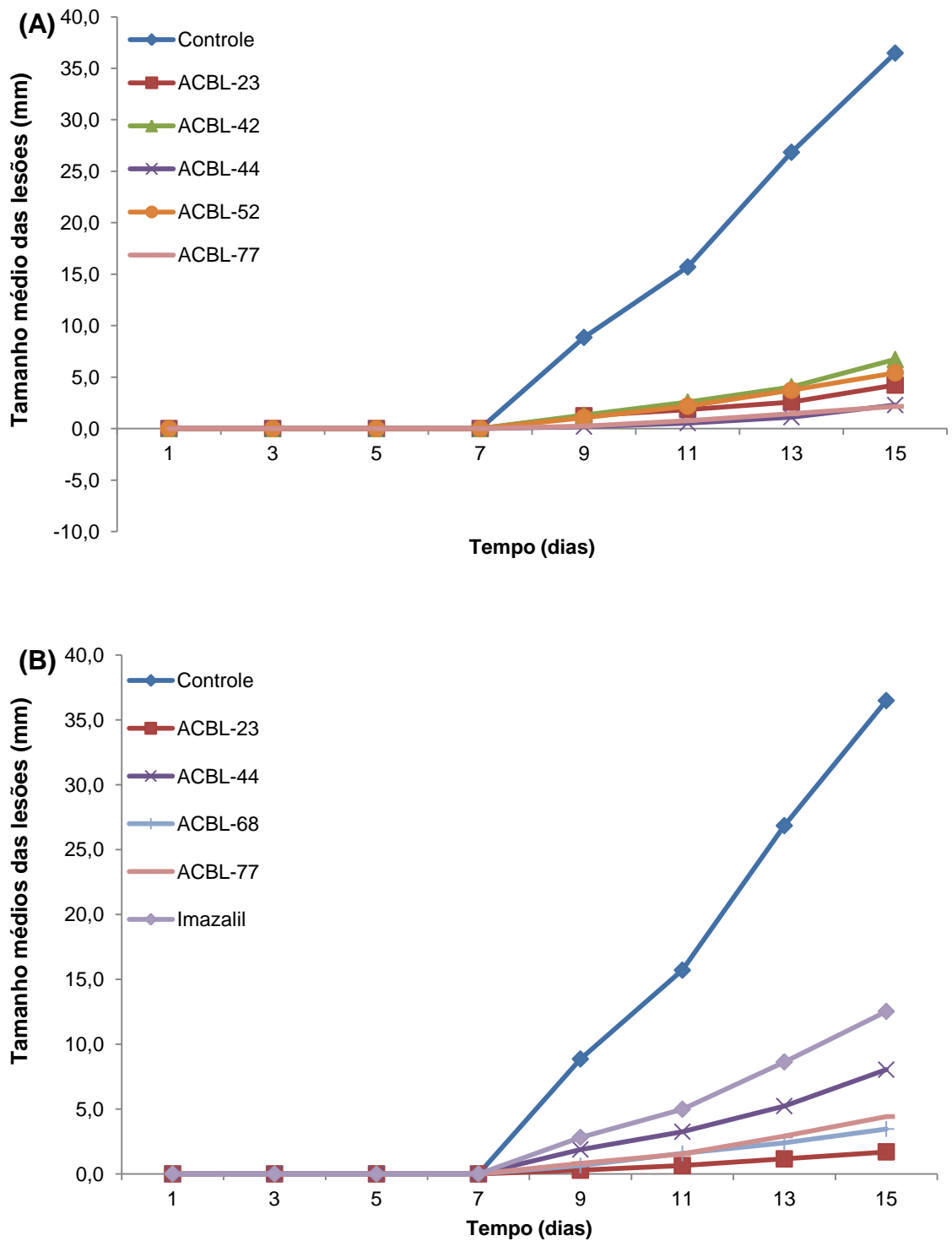


Figura 5. Efeito *in vivo* dos tratamentos ACBL-23, ACBL-42, ACBL-44, ACBL-52, ACBL-68, ACBL-77 e Imazalil no desenvolvimento do tamanho médio de lesões ocasionadas por *G. candidum* em frutos de Laranja Pêra tratados de maneira preventiva (A) e curativa (B), armazenados por 15 dias à 25°C e 90% de UR.

Em ensaios *in vivo*, Ren et al. (2012) demonstraram que a incidência e o tamanho médio de lesões ocasionadas por *G. citri aurantii* em frutos cítricos foi reduzida com a utilização de um isolado recombinante de *Pichia pastoris*. O presente estudo demonstrou o uso em potencial de isolados de levedura na inibição da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra, com valores de inibições de até 91% (*S. koalae* ACBL-77) para a incidência da doença, e inibindo o desenvolvimento das lesões acima de 95% (*C. stellimalicola* ACBL-44 e ACBL-23).

No trabalho de Hernández-Montiel et al. (2011), a incidência e o tamanho das lesões ocasionadas por *G. citri aurantii* em frutos de limão mexicano (*Citrus aurantifolia*), foi reduzido significativamente, quando os frutos foram tratados com dois isolados da levedura epífita *Debaryomyces hansenii*, sendo o que as leveduras deste gênero tem se mostrado como um potencial agente de biocontrole (DROBY et al., 1989; HERNÁNDEZ-MONTIEL et al., 2011).

No presente estudo, alguns isolados foram eficientes na redução do progresso da podridão azeda, de maneira preventiva e curativa (Figura 6).

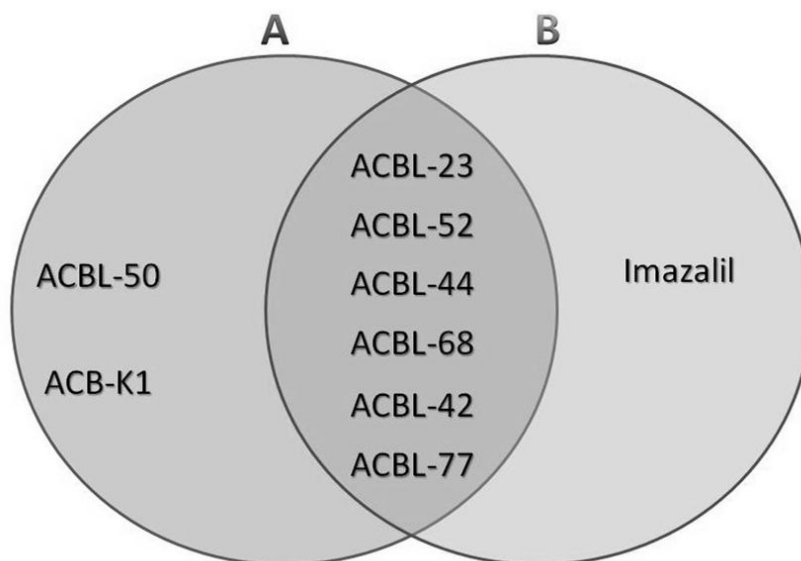


Figura 6. Diagrama de Ven demonstrando os melhores tratamentos utilizados preventivamente (A) e curativamente (B) no progresso da podridão azeda em frutos de laranja Pêra. Interseção demonstra os tratamentos que foram eficientes utilizados das duas maneiras, curativa e preventivamente.

3.2.2. Efeito dos tratamentos na incidência da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra

Para o tratamento preventivo os melhores isolados foram os ACBL-52, ACBL-23, ACBL-44 e ACBL-77, apresentando 38, 37, 25 e 8% de frutos com sintomas da podridão azeda, respectivamente (Figura 7-A). Quando os tratamentos foram realizados após 24 horas de inoculação com o patógeno, menores valores de frutos doentes foram proporcionados pelos tratamentos ACBL-44 (32%), ACBL-77(30%), ACBL-68 (28%) e ACBL-23, apresentando somente 10% de frutos doentes (Figura 7-B).

Outros autores demonstraram que quando frutos cítricos foram tratados com isolados de levedura, a incidência da podridão azeda foi reduzida, significativamente (DROBY et al., 1989; HERNÁNDEZ-MONTIEL et al., 2011; REN et al., 2012), assim como no presente estudo, onde pode-se observar uma redução de frutos sintomáticos acima de 90% (ACBL-23 e ACBL-77), tratados de maneira preventiva e curativa.

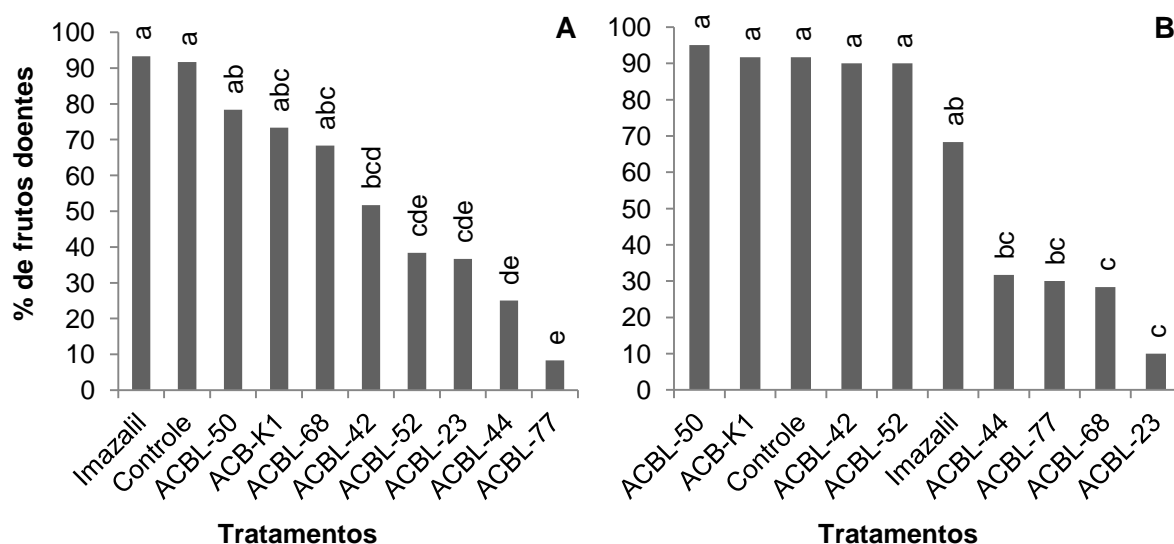


Figura 7. Porcentagem de frutos de Laranja Pêra com sintomas de podridão azeda, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e 90% de UR, por 15 dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.

Os parâmetros avaliados, severidade e incidência, mostraram que, os isolados de levedura ACBL-23, ACBL-44 (*C. stellimalicola*) e ACBL-77 (*S. koalae*) (Figura 8) foram os mais eficientes no controle da doença quando aplicado de maneira preventiva e curativa, enquanto que o tratamento químico empregado neste experimento mostrou controle, embora menor, quando os frutos foram tratados de forma curativa.

O controle efetivo da podridão azeda requer tratamentos que ajam simultaneamente de maneira preventiva e curativa, considerando possíveis infecções já existentes que tenham vindo do campo e infecções subsequentes que podem ocorrer durante no *packing-house*, durante o beneficiamento e armazenamento.

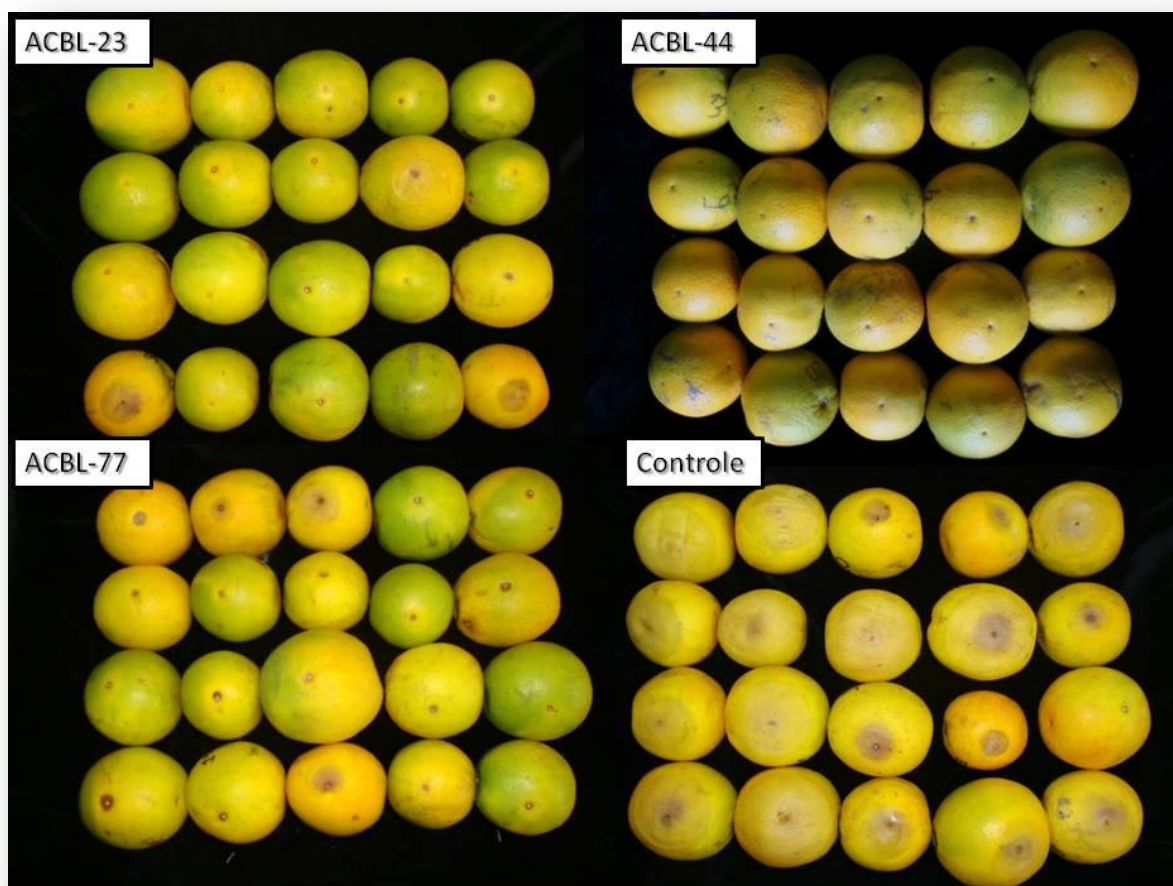


Figura 8. Isolados de levedura, ACBL-23, ACBL-44 e ACBL-77, mais eficientes no controle da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra tratados preventivamente e inoculados com *Geotrichum candidum*, armazenados a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e 90% de UR, por 15 dias.

Os ensaios *in vitro* mostraram valores de inibições muito inferiores aos observados *in vivo* neste estudo, o que, segundo Plaza et al. (2004) pode ocorrer, considerando que sob condições *in vivo*, além do ambiente outros fatores podem estar envolvidos, como por exemplo, a natureza dos componentes e a própria interação entre os microrganismos no local da infecção.

Isolados de *P. anômala* e *C. oleophila* foram capazes de diminuir a incidência da doença e o tamanho de lesões ocasionadas por *G. candidum*, *P. digitatum* e *P. italicum* em frutos cítricos (LAHLALI et al., 2004). Droby et al. (2002) forneceram evidências de que as células da levedura antagonista *C. oleophila* aplicada em ferimentos superficiais em frutos de grapefruit (*Citrus grandis*) foram capazes de induzir resistência ao *P. digitatum*.

No presente estudo, três isolados, reduziram a incidência da podridão azeda em frutos de laranja Pêra, de maneira curativa e preventiva (Figura 9).

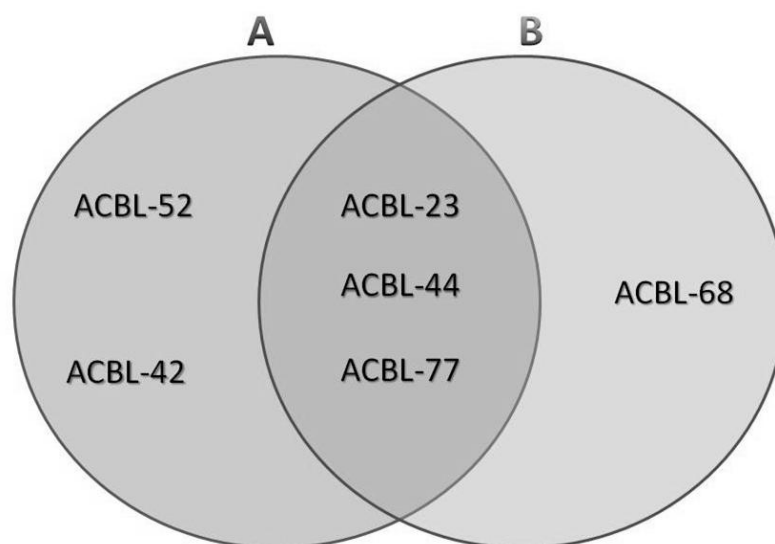


Figura 9. Diagrama de Ven demonstrando os melhores tratamentos utilizados preventiva (A) e curativamente (B) Na incidência da podridão azeda em frutos de laranja Pêra. Intersecção demonstra os tratamentos que foram eficientes utilizados das duas maneiras, curativa e preventivamente.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que os isolados ACBL-23, ACBL-44 e ACBL-77 foram os mais eficientes, de maneira preventiva e curativa, para o biocontrole da podridão azeda em frutos de Laranja Pêra.

5. REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M.A., EL-MOHAMEDY, R.S.R., EL-MOUGY, N.S., 2007. Control of sour rot disease of lime fruits using saprophytic isolates of yeast, **Egypt. J. Phytopathol.**, 35, 2, 39-51.
- AGRIFANUAL: Anuário da Agricultura Brasileira, 2012. São Paulo: FNP, 255-268.
- BERGAMIM FILHO, A; AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Editora Ceres, 1996. 299 p.
- BROWN, G.E. Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest decays of oranges, 1988. **Plant Dis.** 72, 906-908.
- BUTLER, E.E., Fogle, D., Miranda, M., 1988. *Galactomyces citri-aurantii*, a newly found teleomorph of *Geotrichum citri-aurantii* the cause of sour rot of citrus fruit. **Mycotaxon.** 33, 197-212.
- DENNIS, C. E WEBSTER, J., 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, 57, 359-363.
- DROBY, S., CHALUTZ, E., WILSON, C. L., WISNIEWSKI, M. E., 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. **Can. J. Microbiol.** 35, 794-800.
- DROBY, S., VINOKUR, V., WEISS, B., COHEN, L., DAUS, A., GOLDSCHMIDT, E.E., PORAT, R., 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Biol. Control.** 92, 4, 393-399.
- ECKERT, J.W., 1978. Postharvest disease of citrus fruit. **Outlook Agric.** 9, 225–259.

- FENG, L., WU, F., LI, J., JIANG, Y., DUAN, X., 2011. 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**, 61, 160–164.
- 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 J Microbiol Biotechnol**, 26, 925-932, 2010.
- HERNÁNDEZ-MONTIEL, L.G., HOLGUÍN-PEÑA, J., LÓPEZ-ABURTO, M.G., TROYO-DIÉGUEZ, E., 2011. **Control poscosecha de *Geotrichum citri-aurantii* en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) mediante levaduras marinas y epífitas**. *Universidad y Ciencia*, 27, 2, 191-198.
- KUPPER, K.C., CERVANTES, A.L.L., KLEIN, M.N., SILVA, A.C., 2013. Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Rev. Bras. Frutic.**, 35, 2, 020-031.
- LADANIYA, M.S., 2008. Postharvest diseases and their management. In: Ladaniya, M.S. (Ed.), **Citrus Fruit – Biology, Technology and Evaluation**. Academic Press, San Diego, 424–425.
- LAHLALI, R., HAMADI, Y. EL., GUILLI, M., JIJAKLI, M. H., 2011. 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. **Biol. Control**, 56, 217–224.

- LAHLALI, R., SERRHINI, M.N., JIJAKLI, M.H., 2004. Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain 0) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in morocco . **Appl. Biol. Sci**, Ghent University, 69/4, 601-610.
- LIU, X., WANG, L.P., LI, Y.C., LI, H.Y., YU, T., ZHENG, X.D., 2009. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **J. Appl. Microbiol.** 107, 1450–1456.
- MALDONADO, M.C., OROSCO,C.E., GORDILLO, M.A., NAVARRO, A.R., 2010. *In vivo* and *in vitro* antagonism of *Streptomyces* sp. RO3 against *Penicillium digitatum* and *Geotrichum candidum*, **African Journal of Microbiology Research**, 4 (22), 2451-2456.
- MCKAY, A. H., FÖSTER, H., ADASKAVEG, J.E., 2012. Distinguishing *Galactomyces citri-aurantii* from *G. geotrichum* and characterizing population structure of the two postharvest sour rot pathogens of fruit crops in California. **Phytopathology**, 102, 5, 528-538.
- MERCIER, I. & SMILANICK, J.L., 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. **Biol. Control**, 32, 401-407.
- NEVES, M.F., 2010. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: FEA/USP, 137.
- PALOU, L., SMILANICK, J.L., CRISOSTO, C.H., 2009. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. **J. Food Prot.** 72, 1037-1046.

- PLAZA, P., USALL, J., TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I., 2004. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. *Int. J. Food Microbiol.*, 90, 75-82.
- REN, X., KONG, Q., WANG, H., YU, T., ZHOU, W. ZHENG, X., 2012. Biocontrol of fungal decay of citrus fruit by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. *Food Chemistry*, 131, 796–801.
- SHANER, G; FINNEY, RE. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. *Phytopathology*, v. 67, p. 1051-1055, 1977.
- SHARMA, R.R., SINGH, D., SINGH, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control*, 50, 205–221.
- SUPRAPTA, D.N., ARAI, K., IWAI, H., 1995. Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. *Mycoscience* 36, 277-282.

CAPÍTULO 4 – POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE DO BOLOR VERDE EM FRUTOS DE LARANJA LIMA

RESUMO – O bolor verde, ocasionado pelo fungo *Penicillium digitatum*, é a principal doença que ocorre na pós-colheita em citros. Uma alternativa para o controle da doença se dá por meio da utilização de leveduras. Este trabalho teve por objetivo testar diferentes isolados de leveduras obtidos de solos, folhas, frutos e flores de citros, de diferentes locais do estado de São Paulo, Brasil, quanto ao antagonismo *in vitro* e *in vivo* à *P. digitatum*. A avaliação *in vitro* se deu por meio da técnica de cultivo pareado em placas de Petri. O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições e avaliação foi realizada pela determinação do diâmetro médio da colônia do fitopatógeno. Posteriormente, frutos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Lima) foram lavados, esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2%, feridos em dois pontos eqüidistantes na região mediana dos frutos a uma profundidade de 3 mm e, inoculados com suspensões de conídios de *P. digitatum* (1×10^4 conídios/ml) 24 horas antes e 24 horas depois dos tratamentos. Para os tratamentos, foram aplicadas suspensões dos antagonistas (1×10^7 células/ml) ou do fungicida Imazalil (0,2%). O controle correspondeu aos frutos inoculados e tratados com água destilada. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com três repetições (20 frutos/repetição). Foram avaliadas a severidade e a incidência da doença. Nos ensaios *in vitro*, cinco isolados de levedura (ACBL-76, ACBL-82, ACBL-84 e ACBL-87) proporcionaram valores de inibições do crescimento da colônia do fungo acima de 80%. Entretanto quando avaliou-se a capacidade das leveduras no controle do bolor verde em frutos de Laranja Lima, somente dois isolados (ACBL-82 e ACBL-86) foram capazes de controlar o progresso e também a incidência da doença, quando utilizados preventivamente.

Palavras-chave: *Citrus* spp., Controle Biológico, *Penicillium digitatum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

CHAPTER 4 - POTENTIAL OF YEASTS IN CONTROL OF GREEN MOLD ON 'LIMA' SWEET ORANGES

ABSTRACT – The green mold, caused by *Penicillium digitatum*, is the most important disease that occurs in citrus postharvest. An alternative to controlling the disease is through the use of yeasts. The target of this work was to test different yeast isolates obtained from soils, leaves, fruits and citrus flowers from different places in the State of São Paulo, Brazil relating its antagonism *in vitro* and *in vivo* to *P. digitatum*. The *in vitro* evaluation was done with paired culture in Petri dish. The essay was performed in randomized design with 5 repetitions and evaluation considered the average diameter of the phytopathogen colony. After, orange fruits (*Citrus sinensis* cv. Lima) were washed, the surfaces were sterilized with sodium hypochlorite at a 2%, injured in 2 equidistant points with 3mm depth in the middle of the fruits and inoculated with conidia suspension of *P. digitatum* (1×10^4 spores/ml) 24 hours before and after the treatments. The treatments consisted in the application of the antagonist suspensions (1×10^7 cells/mL) or the Imazalil fungicide (0.2%) application. The fruits were inoculated and treated with distilled water in the treatment control. It was used randomized design with 3 repetitions (20 fruits per repetition). The best results of *in vitro* antagonist were obtained with five isolates (ACBL-76, ACBL-82, ACBL-84 and ACBL-87) that presented values of mycelial growth inhibitions above 80%. However, when it was evaluated the ability of yeast to control the green mold in orange fruits, only two isolates (ACBL-82 and ACBL-86) were able to decrease the progress and the incidence of disease when used preventively.

Keywords: Biological Control, *Citrus* spp., *Penicillium digitatum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUÇÃO

Ferimentos ocasionados em frutos durante processos de colheita e transporte são portas de entrada para o fungo *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde, que é a principal doença que ocorre na fase de pós-colheita em citros, diminuindo a qualidade e a quantidade dos frutos cítricos, bem como, prejudicando os valores nutricionais e de mercado (PLAZA et al., 2004).

Atualmente, o controle do bolor verde no *packing-house*, baseia-se no tratamento de frutos com diferentes fungicidas, como imazalil (IMZ) e tiabendazol (TBZ). Estes fungicidas são utilizados sozinhos, em misturas, ou aplicados separadamente, em sequencia, sendo os mesmos utilizados há mais de 25 anos, o que contribui para a proliferação de linhagens do patógeno resistentes aos princípios ativos utilizados (ISMAIL & ZHANG, 2004). O desenvolvimento de linhagens resistentes, a crescente demanda por produtos orgânicos e a preocupação com a contaminação do ambiente pelos produtos químicos, tem levado à busca por métodos alternativos de controle (SANTOS et al., 2004; ZHU et al., 2006; KINAY et al., 2007; COELHO et al., 2011).

Visando a ampliação da exportação de frutas cítricas e a crescente preocupação do mercado à aquisição de frutos isentos de resíduos de agrotóxicos, a utilização de microrganismos como agentes de biocontrole para doenças de pós-colheita constitui-se numa alternativa viável em todo o mundo (SHARMA et al., 2009). Pesquisas recentes têm demonstrado a eficácia do controle biológico, através da ação de isolados de leveduras no controle de doenças fúngicas em pós-colheita (CHANCHAOVIVAT et al., 2007).

Leveduras epífitas, encontradas em folhas e frutos, parecem competir efetivamente com patógenos de pós-colheita, como o *Penicillium* spp. (LEIBINGER et al., 1997; MCGUIRE, 1995). Algumas espécies de leveduras são capazes de produzir substâncias como as toxinas *Killer*, enzimas hidrolíticas e, em determinadas condições, formam biosurfactantes e bioemulsificadores que facilitam a adesão (AHRENDTS & CARRILLO, 2004).

Considerando o exposto, este trabalho teve por objetivos selecionar isolados de levedura provenientes de solos, flores, folhas e frutos de citros, com potencial de aplicação como agente de biocontrole à *P. digitatum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fungo fitopatogênico (*Penicillium digitatum*)

Para realização deste estudo, foi utilizado um isolado de *Penicillium digitatum*, pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis, SP, Brasil.

2.2. Atividade antifúngica *in vitro* a *Penicillium digitatum*

2.2.3. Crescimento micelial

Para os testes de antagonismo, além dos isolados de levedura obtidos (Capítulo 2, item 2.1.) foram utilizados, também, seis isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (ACB-BG1, ACB-CAT1, ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1 e ACB-PE2) que foram isolados a partir do processo de fermentação para a produção de etanol, caracterizados por electroforese de cariotipagem (FIALHO et al., 2010), e pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Bioquímica e Fermentação de Álcool do Departamento de Ciências Biológicas da Esalq/USP, Piracicaba-SP.

Foram realizados 5 ensaios, onde foram avaliados em média 20 isolados de levedura em cada ensaio, utilizando a técnica de cultivo pareado em placa de Petri (DENNIS & WEBSTER, 1971). Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados de colônias ativas de *P. digitatum* cultivadas em meio BDA por 7 a 10 dias e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA à 3 cm de distância de discos de mesmo tamanho, contendo um isolado de cada uma das leveduras cultivadas por 48 horas em meio YEPD. O controle correspondeu ao crescimento do fungo sem o pareamento com a levedura. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, durante sete dias, a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h. Para a avaliação, mediu-se o diâmetro da colônia do fungo em dois sentidos perpendiculares após o período de incubação. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de

variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para uma melhor caracterização, foi determinada uma escala de antagonismo de acordo com Sharma et al., (2009), para avaliar a ação antagônica dos isolados de levedura contra à *P. digitatum* com quatro diferentes níveis: (0) - o fungo filamentososo cresce independentemente da presença da levedura; (+) - o fungo filamentososo cresce até o limite da colônia da levedura e não se desenvolve por cima desta; (+/+) - há formação de halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação; (+/-) – há retardo no desenvolvimento micelial, mas no fim do período de incubação, o fungo filamentososo se desenvolve por cima da levedura.

2.3. Atividade antifúngica *in vivo* a *Penicillium digitatum*

2.3.1. Inoculação com o patógeno

Frutos de Laranja Lima (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram obtidos em um *packing-house* da cidade de Limeira, SP, Brasil. Os frutos estavam no estágio de maturação comercial, selecionados por uniformidade de cor, forma e tamanho. No laboratório, os frutos foram lavados, desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% e, feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas esterilizadas a uma profundidade de 3 mm. Em seguida, os frutos foram inoculados na região do ferimento com 20 µL de uma suspensão de *P. digitatum* contendo uma concentração de 1×10^4 conídios/mL, 24 h antes (tratamento preventivo) e 24 h após (tratamento curativo) a realização dos tratamentos.

2.3.2. Tratamentos

Oito isolados de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* ACBL-76; ACBL-78; *S. cerevisiae* ACBL-80; *S. cerevisiae* ACBL-81; *S. cerevisiae* ACBL-82; *Candida stellimalicola* ACBL-84; *Meyerozyma caribbica* ACBL-86 e ACBL-87) que proporcionaram os maiores valores de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno nos ensaios *in vitro* (item 2.2), foram selecionados para os tratamentos nos ensaios *in vivo*. Uma alçada de cada isolado foi retirada de colônias cultivadas por 48 h em meio YEPD, transferida em Erlenmeyer contendo 25 mL de meio YEPD líquido e incubada sob agitação de 250 rpm por 48 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de células com auxílio de um hemocítômetro, e as suspensões foram ajustadas para a concentração de 10^7 células/mL. Para o tratamento químico foi utilizado o fungicida Imazalil, na dose recomendada pelo comerciante (2mL/L) para o controle do bolor verde em frutos cítricos. O controle positivo correspondeu aos frutos tratados com água destilada e esterilizada no lugar dos tratamentos.

Alíquotas de 20 μ L de cada um dos tratamentos foram aplicadas nos ferimentos, de maneira preventiva e curativa. Após a inoculação com *P. digitatum* e a realização dos tratamentos, os frutos foram armazenados por 7 dias em condição ambiente ($22^\circ\text{C} \pm 2$ e com 90% de UR). A severidade da doença foi avaliada no 5º, 6º e 7º dia após a inoculação com o fitopatógeno. A incidência foi avaliada pela porcentagem de frutos doentes observados no 7º dia.

2.3.3. Análises Estatísticas

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições, com 20 frutos por repetição. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre o tamanho médio das lesões ocasionadas por *P. digitatum*, efetuou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que é expressa pela plotagem da proporção de doença em porcentagem, versus o tempo (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). Segundo Shaner & Finney (1977), a AACPD pode ser calculada pela fórmula:

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

n – é o número de observações/avaliações.

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

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

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e, a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antifúngica *in vitro* a *Penicillium digitatum*

3.1.2. Crescimento micelial

No primeiro ensaio (Tabela 1) realizado com 20 isolados de leveduras, seis isolados (ACBL-03, ACBL-01, ACBL-06, ACBL-13, ACBL-05 e ACBL-10) diferiram estatisticamente do controle, com valores de inibições da colônia do fitopatógeno que variaram de 32% a 42,6%, e destes, 66,6% apresentaram halo de inibição.

O potencial antagônico de leveduras foi relatado por autores como He et al. (2003), que, estudando a capacidade antagônica de isolados de *Cryptococcus* sp. e *Candida* sp., obtiveram eficiência no controle *in vitro* à *Penicillium expansum*, agente causal da podridão em maçã, sendo o isolado de *Cryptococcus* sp. mais eficiente no biocontrole do fitopatógeno.

No segundo ensaio (Tabela 2), onde foram avaliados 18 isolados de leveduras, verificou-se que, seis isolados (ACBL-36, ACBL-09, ACBL-34, ACBL-51, ACBL-07 e ACBL-14) obtiveram os melhores resultados, com taxas de inibições da colônia que variaram de 30,7% a 57,1% e, dentre esses, todos apresentaram halo de inibição.

Tabela 1. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. Ensaio 1.

Isolados de levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-10	4,17 d	42,66	+/+
ACBL-05	4,72 cd	35,09	+
ACBL-13	4,88 cd	32,80	+/+
ACBL-06	4,90 cd	32,57	+/+
ACBL-01	4,93 cd	32,11	+
ACBL-03	4,93 cd	32,11	+/+
ACBL-04	5,38 bcd	25,92	+
ACBL-26	5,52 bcd	24,08	+
ACBL-29	5,62 bcd	22,71	+/-
ACBL-28	5,67 bcd	22,02	+
ACBL-16	6,00 bcd	17,43	+
ACBL-19	6,17 abcd	15,14	0
ACBL-20	6,17 abcd	15,14	+
ACBL-18	6,42 abc	11,70	+
ACBL-27	6,42 abc	11,70	+
ACBL-31	6,53 abc	10,09	+
ACBL-02	6,73 abc	7,34	0
ACBL-24	7,22 ab	0,69	0
Controle	7,27 ab	0,00	0
ACBL-25	7,28 ab	-0,23	0
ACBL-33	8,25 a	-13,53	0

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Dos 16 isolados de leveduras estudados no terceiro ensaio (Tabela 3), somente dois isolados, ACBL-58 e ACBL-67, foram capazes de inibir, estatisticamente, a colônia do fitopatógeno, proporcionando valores de inibições de 35,4 e 36,5%, respectivamente.

Tabela 2. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 2.

Isolados de levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-14	2,47 f	57,10	+/+
ACBL-07	2,83 ef	50,72	+/+
ACBL-51	2,90 ef	49,57	+/+
ACBL-34	3,37 def	41,45	+/+
ACBL-09	3,57 def	37,97	+/+
ACBL-36	3,98 cdef	30,72	+/+
ACBL-50	4,28 bcde	25,51	+/+
ACBL-49	4,67 abcd	18,84	+/+
ACBL-21	4,70 abcd	18,26	+/+
ACBL-48	4,75 abcd	17,39	+/+
ACBL-11	5,13 abc	10,72	+
ACBL-37	5,42 abc	5,80	+
ACBL-22	5,45 abc	5,22	+/+
ACBL-08	5,50 abc	4,35	+/+
ACBL-38	5,58 ab	2,90	+/-
ACBL-39	5,75 ab	0,00	+/-
Controle	5,75 ab	0,00	-
ACBL-12	5,83 a	-1,45	+
ACBL-23	6,07 a	-5,51	+/-

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (++) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Na Tabela 4, encontram-se relacionados os valores obtidos no quarto ensaio, onde foram utilizados 24 isolados de leveduras para avaliação *in vitro* do antagonismo a *P. digitatum*. Neste ensaio, 11 isolados (ACBL-83, ACBL-85, ACBL-77, ACBL-81, ACBL-78, ACBL-80, ACBL-82, ACBL-86, ACBL-84, ACBL-76 e ACBL-87) diferiram do controle, com valores de inibições que variaram de 46 a 88%, sendo que, os isolados ACBL-82, ACBL-86, ACBL-84, ACBL-76 e ACBL-87 inibiram a colônia de *P. digitatum* acima de 80%, apresentando, inclusive, halo de inibição. Estudando a ação antagônica de quatro isolados de levedura (R13, R6, ER1, L2),

Chanchaichaovivat et al. (2007) observaram que os isolados testados foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum capsici*, agente causal da antracnose, com valores de até 93,3%.

Tabela 3. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. Ensaio 3.

Isolados de levedura	*Tamanho médio da colônia	% de inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-67	3,68 b	36,50	+/+
ACBL-58	3,74 b	35,42	+/+
ACBL-70	4,21 ab	27,21	+
ACBL-63	4,25 ab	26,57	+
ACBL-59	4,38 ab	24,41	+/+
ACBL-66	4,38 ab	24,41	+
ACBL-73	4,38 ab	24,41	+/+
ACBL-61	4,40 ab	23,97	+/+
ACBL-55	4,44 ab	23,33	+
ACBL-72	4,44 ab	23,33	+/+
ACBL-71	4,58 ab	20,95	+/+
ACBL-69	4,64 ab	19,87	+/+
ACBL-68	4,79 ab	17,28	+/+
ACBL-74	5,09 ab	12,10	+
ACBL-65	5,19 ab	10,37	+
ACBL-75	5,53 a	4,54	+
Controle	5,79 a	0,00	-

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Tabela 4. Efeito de diferentes isolados de levedura no crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 4.

Isolado de levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatógeno	Escala de Antagonismo
ACBL-87	1,00 f	88,35	+/+
ACBL-76	1,20 f	86,02	+/+
ACBL-84	1,42 f	83,50	+/+
ACBL-86	1,47 f	82,91	+/+
ACBL-82	1,53 f	82,14	+/+
ACBL-80	1,78 ef	79,22	+/+
ACBL-78	2,18 def	74,56	+/+
ACBL-81	3,02 def	64,85	+/+
ACBL-77	4,25 cde	50,49	+/+
ACBL-85	4,43 cde	48,39	+/+
ACBL-83	4,67 bcd	45,63	+/+
ACBL-89	6,83 abc	20,39	0
ACBL-92	6,92 abc	19,42	+
ACBL-102	7,25 ab	15,53	0
ACBL-93	7,50 a	12,62	+/-
ACBL-100	7,67 a	10,68	0
ACBL-96	7,75 a	9,71	0
ACBL-101	7,75 a	9,71	0
ACBL-95	7,83 a	8,74	+
ACBL-103	8,12 a	5,44	0
ACBL-94	8,17 a	4,85	0
ACBL-99	8,17 a	4,85	0
Controle	8,58 a	0,00	-
ACBL-97	8,75 a	-1,94	0
ACBL-98	9,00 a	-4,85	0

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

Posteriormente, foi realizado o último ensaio de antagonismo *in vitro* (Tabela 5) de modo que, dos 23 isolados de leveduras testados no cultivo pareado em placa Petri, oito isolados (ACBL-106, ACBL-53, ACBL-35, ACBL-54, ACB-KD1, ACBL-17, ACBL-32 e ACBL-15) inibiram a colônia de *Penicillium* spp. com valores de inibições que variaram de 16 a 39%.

Em geral, apenas 2-5% de todos os isolados obtidos apresentam capacidade antagonica (NUNES et al. 2012). Embora, no presente estudo, 35% dos isolados de leveduras foram capazes de inibir a colônia de *P. digitatum*, com valores de inibições que variaram de 16% (ACBL-106) a 88% (ACBL-87), somente cinco isolados (ACBL-82, ACBL-86, ACBL-84, ACBL-76 e ACBL-87) promoveram porcentagens de inibições acima de 80%, sendo os melhores isolados o ACBL-76 e ACBL-87, que proporcionaram 86 e 88% de inibição da colônia do fungo, respectivamente (Figura 1).

Em estudos *in vitro*, Mekbib et al., (2011), demonstraram que três isolados de levedura (dois isolados de *Cryptococcus laurentii* e um de *Candida sake*) colonizaram rapidamente a superfície da colônia de *P. digitatum*, sendo a capacidade de isolados de levedura em competir com o patógeno por espaço e nutrientes previamente demonstrada em estudos anteriores (JANISIEWICZ et al., 2000).

Tabela 5. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*. Ensaio 5.

Isolado de levedura	*Tamanho médio da colônia	% de Inibição da colônia do fitopatígeno	Escala de Antagonismo
ACBL-15	5,39 e	39,30	+/+
ACBL-32	5,44 e	38,73	+/+
ACBL-17	5,81 e	34,51	+/+
ACB-KD1	6,00 e	32,39	+/+
ACBL-54	6,31 de	28,87	+/+
ACBL-35	6,40 de	27,89	+/+
ACBL-53	6,66 cde	24,93	+/+
ACBL-106	7,44 bcd	16,20	+/-
ACBL-30	7,94 abc	10,56	0
ACBL-43	8,06 ab	9,15	0
ACBL-44	8,06 ab	9,15	0
ACB-CAT1	8,13 ab	8,45	+
ACBL-105	8,19 ab	7,75	0
ACBL-91	8,19 ab	7,75	0
ACBL-104	8,31 ab	6,34	0
ACB-PE2	8,35 ab	5,92	+/-
ACB-CR1	8,44 ab	4,93	0
ACBL-52	8,56 ab	3,52	0
ACB-BG1	8,69 ab	2,11	+
ACBL-41	8,74 ab	1,55	0
ACB-K1	8,81 a	0,70	+
ACBL-40	8,88 a	0,00	0
Controle	8,88 a	0,00	-
ACBL-42	9,00 a	-1,41	+

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* (0) – sem controle; (+) - o fungo cresce até o limite da colônia da levedura; (+/+) - formação de halo de inibição; (+/-) – há inibição da colônia, mas após período de incubação, o fungo se desenvolve por cima da levedura.

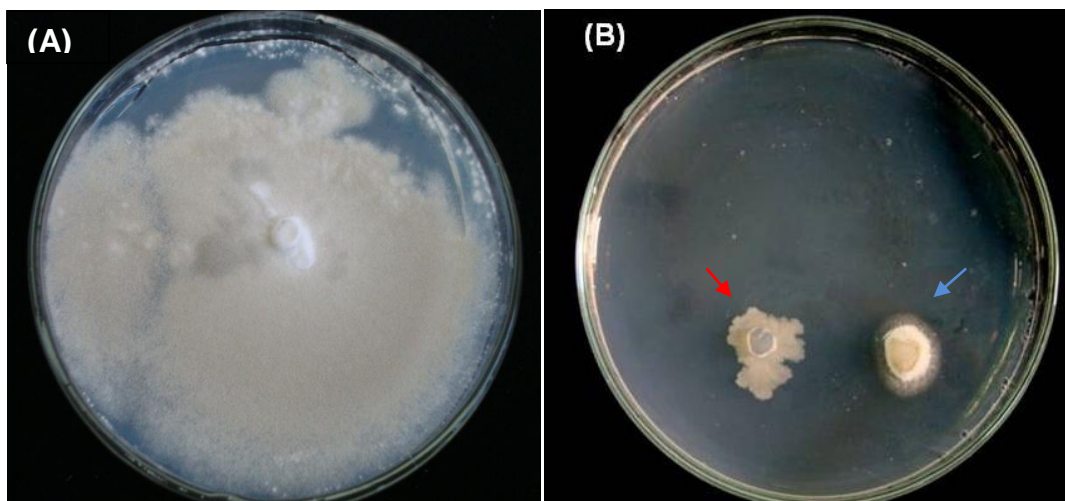


Figura 1. Efeito do isolado de levedura ACBL-87 no crescimento micelial de *Penicillium digitatum* *in vitro*. A – Controle; B- Inibição do patógeno (→) pelo isolado ACBL-87(→).

3.2. Atividade antifúngica *in vivo* a *Penicillium digitatum*

3.2.1. Efeito dos tratamentos no progresso do bolor verde em frutos de Laranja Lima

Quando frutos de Laranja Lima foram tratados 24 horas antes da inoculação com o fitopatógeno (tratamento preventivo), o desenvolvimento do tamanho médio das lesões foi afetado quando os frutos foram tratados com o fungicida Imazalil, o qual proporcionou 100% de controle, seguido dos isolados de levedura ACBL-86 (11,9mm), ACBL-82 (19,2mm) e ACBL-80 (22,8mm) (Figura 2-A e Figura 3). Para o tratamento curativo, somente o fungicida Imazalil foi capaz de diminuir o desenvolvimento das lesões ao longo do período de avaliação, proporcionando frutos com 2,2 mm de diâmetro médio (Figura 2-B).

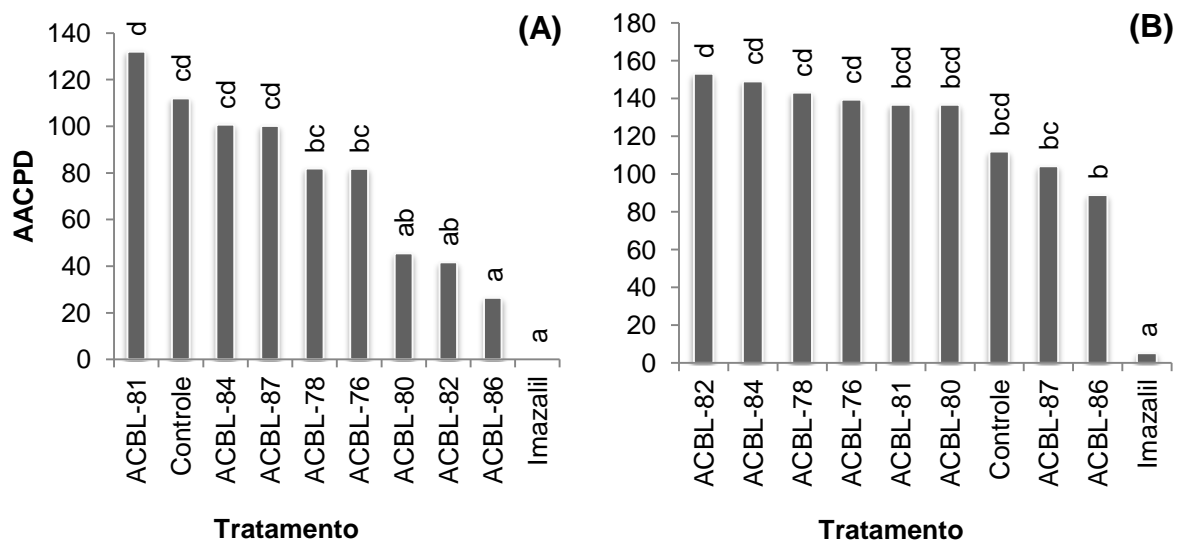


Figura 2. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *P. digitatum*, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e 90% de UR. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.

Na literatura, há muitos trabalhos relatando a capacidade da utilização de leveduras como agentes antagonistas ao bolor verde em diferentes países. Entretanto, se faz necessário o estudo do potencial antagonístico de leveduras de diferentes localidades, o que é desejável, pois antagonistas isolados em áreas geográficas específicas podem ser mais eficientes contra linhagens de patógenos presentes em determinada localidade (DROBY et al., 2002). No presente estudo dos 105 isolados de levedura avaliados, somente os isolados ACBL-86, ACBL-82 e ACBL-80 demonstraram potencial, embora moderado, para a diminuição do progresso do bolor verde, quando utilizados de maneira preventiva.

Estudos realizados por Lahlali et al. (2004), avaliaram a atividade antagonística de *Candida oleophila* e *Pichia anomala* à *P. digitatum* e *P. italicum* e constataram que o nível de proteção aumentou com o tempo entre a aplicação do antagonista e inoculação dos esporos dos fungos. Nos dois isolados avaliados, o nível de proteção foi superior a 70%, quando laranjas feridas foram tratadas 12 horas antes da inoculação com os patógenos e, de até 100% de proteção, quando os frutos feridos foram tratados 24 horas antes da inoculação com *Penicillium*, o mesmo foi observado no presente estudo, onde os isolados de levedura promoveram maior controle da doença, embora moderado, quando aplicados preventivamente.

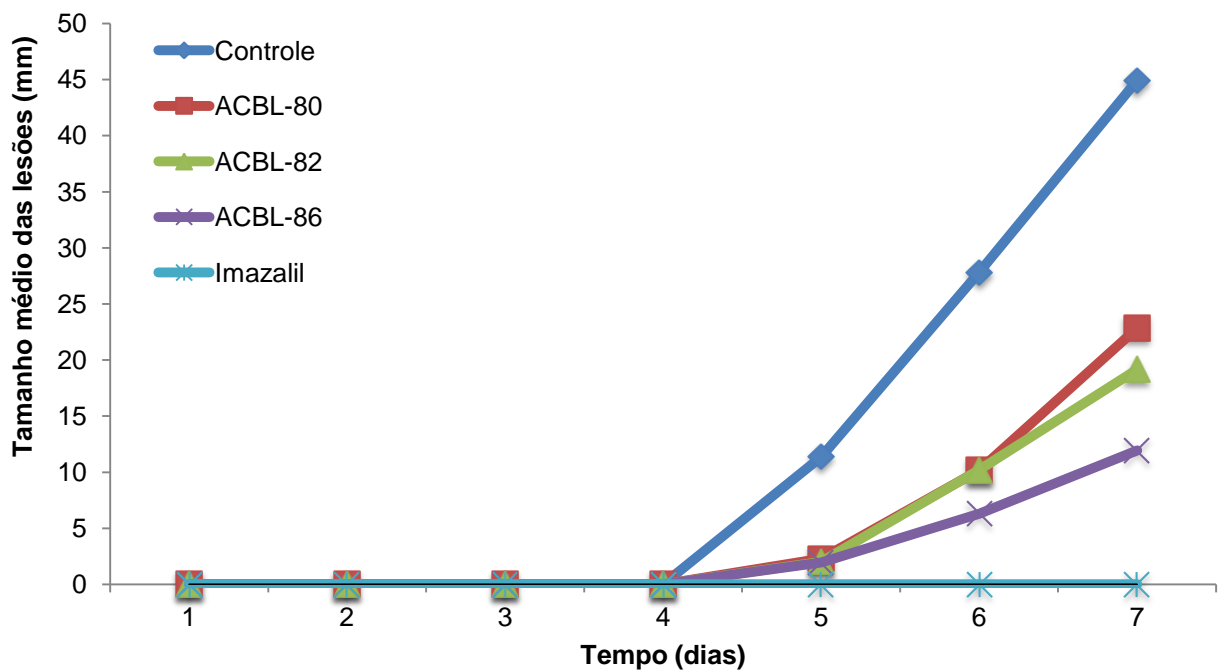


Figura 3. Efeito *in vivo* dos melhores tratamentos para o desenvolvimento do tamanho médio de lesões ocasionadas por *P. digitatum* em frutos de Laranja Lima tratados de maneira preventiva, armazenados por sete dias à $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 90% de UR.

3.2.2. Efeito dos tratamentos na incidência do bolor verde em frutos de Laranja Lima

Quando os frutos foram tratados de maneira preventiva, o melhor tratamento foi o fungicida imazalil, com 100% frutos sadios. Controle moderado foi proporcionado pelos isolados de levedura ACBL-86 e ACBL-82, proporcionando 42 e 28% de inibição da incidência de frutos sintomáticos, respectivamente (Figura 4-A). Quando os tratamentos foram realizados após 24 horas de inoculação com o patógeno, somente o fungicida Imazalil foi capaz de diminuir a incidência de frutos com o bolor verde, proporcionando 93% de controle (Figura 4-B).

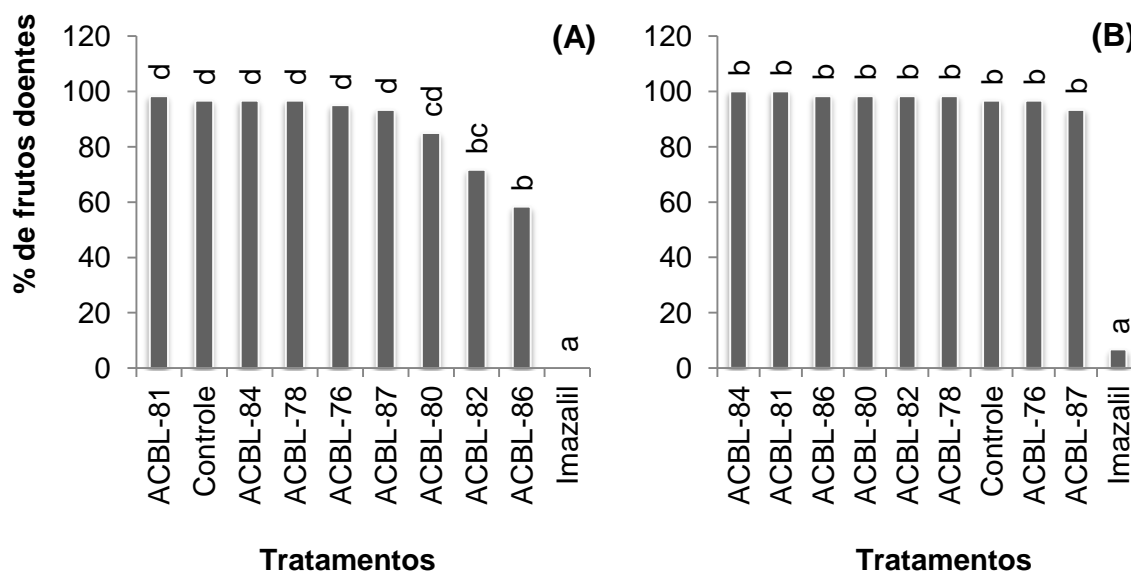


Figura 4. Porcentagem de frutos de Laranja Lima com sintomas do bolor verde, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e 90% de UR, por sete dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.

No presente estudo, os isolados ACBL-86 (*M. caribbica*) e ACBL-82 (*S. cerevisiae*), foram capazes de diminuir, embora moderadamente, a incidência do bolor verde em frutos de Laranja Lima. Estudando a capacidade de 46 isolados de levedura em inibir a incidência do bolor verde em frutos cítricos, Bouzerda et al. (2003) observaram que alguns isolados foram capazes de diminuir a incidência da doença com valores superiores a 50%. Porém, neste mesmo estudo, três isolados (L22, L13 e L24) reduziram a ocorrência de frutos doentes com valores inferiores a 4%, e 16 isolados, diminuíram a incidência do bolor verde entre 12 a 33%. Estudos realizados por Mekbib et al. (2011) encontraram três isolados de leveduras antagonistas (dois isolados de *Cryptococcus laurentii* e um de *Candida sake*) obtidos de frutos de laranja, que foram capazes de reduzir a incidência do bolor verde entre 80 a 95% em ferimentos inoculados com *P. digitatum*, mostrando a potencialidade das leveduras para o controle da doença.

De maneira geral, quando avaliado a ação das leveduras no progresso da doença e na incidência, os isolados obtidos no presente estudo (*S. cerevisiae* isolado ACBL-80, *S. cerevisiae* isolado ACBL-82 e *M. caribbica* isolado ACBL-86), proporcionaram um controle moderado do bolor verde em frutos de Laranja Lima (Figura 5). Entretanto, os agentes de biocontrole não podem fornecer por si só a

consistência e o amplo espectro de ação quando comparado aos fungicidas sintéticos. Em geral, microrganismos antagonistas mostram grande variabilidade na sua eficácia, conferindo apenas efeito protetor que diminui com a maturação; normalmente, não podem erradicar infecções pré-existentes ou incipientes e/ou não previnem esporulação de patógenos fúngicos (EL GHAOUTH et al., 2000; KUPPER et al. 2013). Uma das principais abordagens para melhorar o biocontrole de doenças de pós-colheita seria a integração com outros métodos, biológicos, químicos ou físicos (USALL et al., 2008).

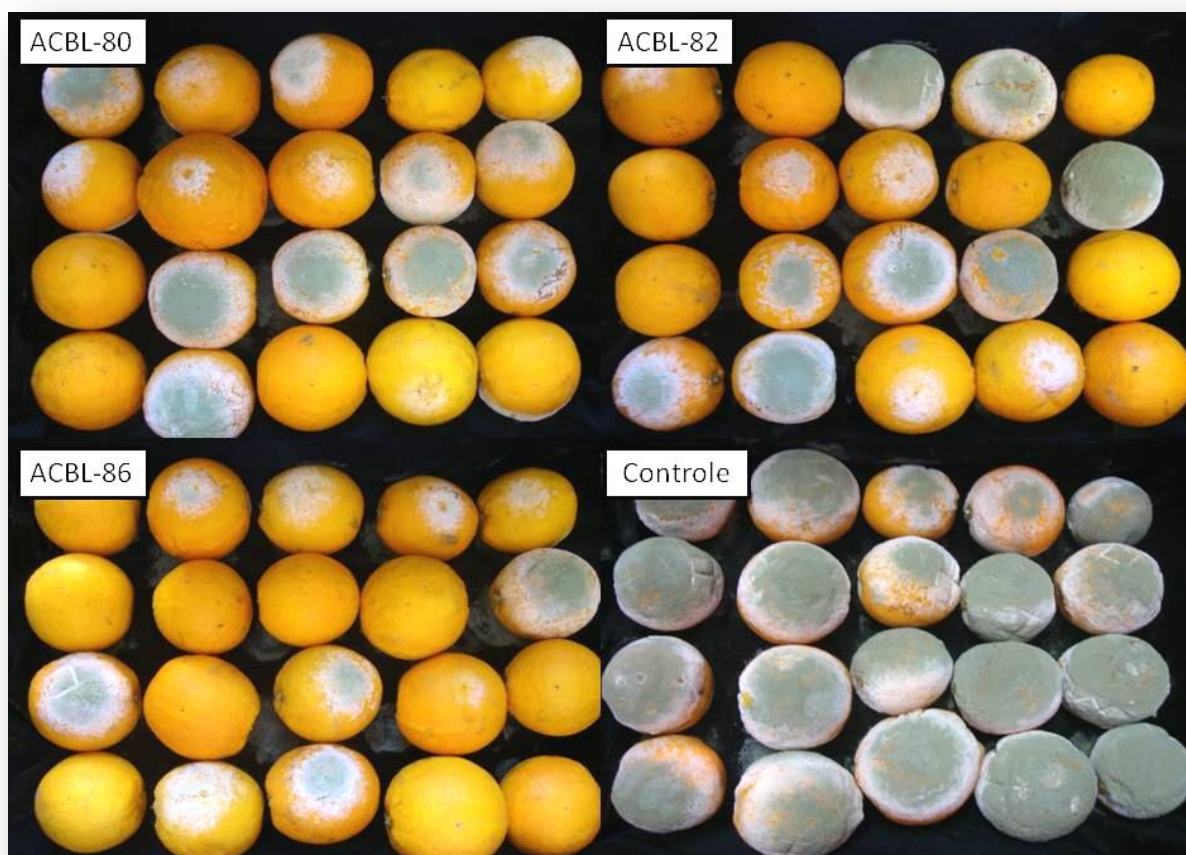


Figura 5. Isolados de levedura, ACBL-80, ACBL-82 e ACBL-86, mais eficientes no controle do bolor verde em frutos de Laranja Lima tratados preventivamente e inoculados com *Penicillium digitatum*, armazenados por sete dias à 22°C ± 2 e 90% de UR.

Em estudos realizados por Geng et al., (2011), a eficiência da levedura *Kluyveromyces marxianus* foi melhorada quando a levedura foi utilizada em combinação com 2% de bicarbonato de sódio, proporcionando valores de inibição do bolor verde de até 90%. Teixidó et al. (2001) avaliaram o potencial antagonista da

levedura *Pantoea agglomerans* (isolado CPA-2) sozinho e em combinação com bicarbonato de sódio, onde observaram que em combinação com o bicarbonato a levedura obteve mais controle no bolor verde e no bolor azul em frutos cítricos.

No presente estudo dois isolados ACBL-86 e ACBL-82 demonstraram potencial, embora moderado, para o controle do bolor verde. Futuramente estes isolados podem ser avaliados em combinação com outros métodos alternativos, como a utilização de sais, uma prática muito comum na conservação de alimentos visando à preservação da longevidade de diferentes produtos. Dentre estes, o bicarbonato de sódio tem sido descrito na literatura como um produto que apresenta atividade antimicrobiana (YAO et al., 2004) reduzindo, inclusive, a incidência de bolores em frutos cítricos em pós-colheita (OBAGWU & KORSTEN, 2003; CUNNINGHAM & TAVERNER, 2007).

4. CONCLUSÃO

No presente estudo foram selecionados dois isolados de levedura, ACBL-82 e ACBL-86, que foram capazes de controlar o bolor verde em frutos de Laranja Lima de maneira preventiva.

5. REFERÊNCIAS

- AHRENDTS, M.R.B. & CARRILLO, L. Levaduras inibidoras de *Penicillium*. Revista Argentina de Microbiologia, 36, p. 182-186, 2004.
- BERGAMIM FILHO, A; AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Editora Ceres, 1996. 299 p.
- BOUZERDA, L.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E.H.; AKHAYAT, O.; AIT BEN-AOUMAR, A. Selection of antagonistic yeasts to green mold disease of Citrus in Morocco. Food. Agriculture & Environment, v.1, p. 215-218, 2003.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, San Diego, v. 42, p. 326–335, 2007.

- COELHO, A.R.; NÓBREGA, G.M.A.; PAGNOCCA, F.C.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K.; HIROOKA, E.Y. **Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum***. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1879-1892, 2011.
- CUNNINGHAM, N.M.; TAVERNER, P.D. Efficacy of integrated postharvest treatments against mixed inoculations of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii* in 'Leng' navel oranges (*Citrus sinensis*). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Nova Zelandia, v. 35, p. 187-192, 2007.
- DENNIS, C. E WEBSTER, J., 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, 57, 359-363.
- DROBY, S., VINOKUR, V., WEISS, B., COHEN, L., DAUS, A., GOLDSCHMIDT, E.E., PORAT, R., 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Biol. Control**. 92, 4, 393-399.
- EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; WISNIEWSKI, M.; WILSON, C. L. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 249-253, 2000.
- 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 J Microbiol Biotechnol**, 26, 925-932, 2010.
- GENG, P., CHEN, S., HU, M., RIZWAN-UL-HAQ, M., LAI, K., QU, F., ZHANG, Y., 2011. Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. **International Journal of Food Microbiology** 151, 190–194.
- HE, D.; ZHENG, X.; YIN, Y.; SUN, P.; ZHANG, H. Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*, **Bot. Bull. Acad. Sin.**, vol. 44, p. 211-216, 2003.
- ISMAIL, M., ZHANG, J., 2004. Post-harvest citrus diseases and their control outlooks. **Pest Manage**. 15, 29–35.

- 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**, 90:1196-1200, 2000.
- KINAY, P.; MANSOUR, M.F.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 26, p. 647–656, 2007.
- KUPPER, K.C., CERVANTES, A.L.L., KLEIN, M.N., SILVA, A.C., 2013. Avaliação de microrganismos antagonistas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Rev. Bras. Frutic.**, 35, 2, 020-031.
- LAHLALI, R., SERRHINI, M.N., JIJAKLI, M.H., 2004. Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain 0) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in morocco . **Appl. Biol. Sci**, Ghent University, 69/4, 601-610.
- LEIBINGER, W.; BREUKER, B.; HAN, M.; MEDGEN, K. 1997. Control of post-harvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. **Phytopathology** 87: 1103-1110.
- MCGUIRE, R.; HAGENMAIER, R. 1995. Storage waxes that support growth of *Candida oleophila* for biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus. **Phytopathology**. 85: 1166.
- MEKBIB, S.B.; REGNIER, J.C.; KORSTEN, L. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. **Tropical Plant Pathology**, vol. 36, 4, 233-240, 2011.
- NUNES, C.A., 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit, **Eur J Plant Pathol**, 133, 181-196.
- OBAGAWU, J.; KORSTEN, L. Integrated control of citrus green and blue mold using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. **Postharvest Biology and Technology**, Pullman (WA), v. 28, p.187-194. 2003.
- PLAZA, P., USALL, J., TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I., 2004. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. **Int. J. Food Microbiol.**, 90, 75-82.

- SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, London, UK, v. 159, n. 4, p. 331-338, 2004.
- SHANER, G; FINNEY, RE. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1055, 1977.
- SHARMA, R.R., SINGH, D., SINGH, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biol. Control**, 50, 205–221.
- TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; PALOU, L.; ASENSIO, A.; NUNES, C.; VIÑAS, I. Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. **European Journal of Plant Pathology** 107: 685–694, 2001.
- USALL, J.; SMILANICK, J.; PALOU, L.; DENIS-ARRUE, N.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; VIÑAS, I. Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Pullman (WA), v. 50, p.1-7, 2008.
- YAO, H.; TIAN, S.; WANG, Y. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 93, p.297-304, 2004.
- ZHU, J.; XIE, Q.; LI, H. Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism. **Journal of Zhejiang University SCIENCE A**, Zhejiang, v.7(Suppl. II), p. 362-365, 2006.

CAPÍTULO 5 – POTENCIAL DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS DE LARANJA PÊRA

RESUMO – O fungo *Penicillium italicum*, é o agente causal do bolor azul, uma das principais doenças que ocorre na pós-colheita em citros. Uma alternativa para o controle da doença se dá por meio da utilização de leveduras. Este trabalho teve por objetivo testar diferentes isolados de leveduras obtidos de solos, folhas, frutos e flores de citros, de diferentes locais do estado de São Paulo, Brasil, quanto ao antagonismo *in vitro* e *in vivo* à *P. italicum*. A avaliação *in vitro* se deu por meio da técnica de semeadura por profundidade em placas de Petri. O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições e avaliação foi realizada pela determinação do diâmetro médio do halo de inibição dos antagonistas. Posteriormente, frutos de Laranja Pêra foram lavados, esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2%, feridos em dois pontos eqüidistantes na região mediana dos frutos a uma profundidade de 3 mm e, inoculados com suspensões de conídios de *P. italicum* (1×10^4 conídios/ml) 24 horas antes e 24 horas depois dos tratamentos. Para os tratamentos, foram aplicadas suspensões dos antagonistas (1×10^7 células/ml) ou do fungicida Imazalil (0,2%). O controle correspondeu aos frutos inoculados e tratados com água destilada. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com três repetições (20 frutos/repetição). Nos ensaios *in vitro*, oito isolados proporcionam valores de inibições acima de 80%, sendo que o ACBL-04 proporcionou 100% de controle. Nos ensaios *in vivo*, quatro isolados (ACBL-04, ACBL-05, ACBL-08 e ACBL-11) foram eficientes na diminuição do progresso do bolor azul assim como na inibição da incidência da doença, quando aplicados preventivamente.

Palavras-chave: *Citrus* spp., Controle Biológico, *Penicillium italicum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

CHAPTER 5 - POTENTIAL OF YEASTS IN CONTROL OF BLUE MOLD ON 'PÊRA' SWEET ORANGES

ABSTRACT – The fungus *Penicillium italicum* is the causal agent of blue mold, one of the major diseases that occur in postharvest citrus. An alternative to controlling the disease is through the use of yeasts. Therefore, this work aimed to test different yeast isolates obtained from soils, leaves, fruits and citrus flowers from different places in the State of São Paulo, Brazil relating its antagonism *in vitro* and *in vivo* to *P. italicum*. The *in vitro* evaluation was done with pour plate methodology in Petri dish. The essay was performed in randomized design with 5 repetitions and evaluation considered the average diameter of the inhibition halo. After, orange fruits were washed, the surfaces were sterilized with sodium hypochlorite at a 2%, injured in 2 equidistant points with 3mm depth in the middle of the fruits and inoculated with conidia suspension of *P. italicum* (1×10^4 spores/ml) 24 hours before and after the treatments. The treatments consisted in the application of the antagonist suspensions (1×10^7 cells/ml) or the Imazalil fungicide (0.2%) application. The fruits were inoculated and treated with distilled water in the treatment control. It was used randomized design with 3 repetitions (20 fruits per repetition). In *in vitro* assays, eight isolates presented values of mycelial growth inhibition above 80%, and the ACBL-04 provided 100% control. In *in vivo* assays, four isolates (ACBL-04, ACBL-05, ACBL-08 and ACBL-11) were effective in reducing the progress and the incidence of disease when the isolates were applied preventively.

Keywords: Biological Control, *Citrus* spp., *Penicillium italicum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

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 antagônicos. Pesquisas recentes têm demonstrado a utilização de leveduras no controle de doenças fúngicas em pós-colheita (CHANCHAOVIVAT et al., 2007).

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 antagônicas, o que poderia deixar algum resíduo nos frutos (DROBY & CHALUTZ, 1994; HUSSEIN et al., 1996; DROBY et al., 2002; GAMAGAE et al., 2004; ZHANG et al., 2005). Isolados da levedura *Cryptococcus laurentii* estão sendo utilizados em estudos para o controle de pós-colheita do bolor azul em frutos cítricos e em maçãs, assim como em outras frutas como morango, kiwi e uva (ROBERTS, 1990; LIMA et al. 1998 e 1999).

Considerando o exposto, este trabalho teve por objetivo selecionar isolados de leveduras a partir de solos, frutos, folhas e flores de citros de diferentes localidades do estado de São Paulo, visando o biocontrole do bolor azul.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2. Fungo fitopatogênico (*Penicillium italicum*)

Para realização deste estudo, foi utilizado um isolado de *Penicillium italicum*, obtido através do isolamento de frutos de Laranja Valência com sintomas do bolor azul de um pomar comercial da cidade de Mogi Guaçu, São Paulo. O fungo foi isolado, purificado, conservado e armazenado na coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis, SP, Brasil.

2.2. Atividade antifúngica *in vitro* a *Penicillium italicum*

2.2.3. Crescimento micelial

Para os testes de antagonismo, além dos isolados de leveduras obtidos (Capítulo 2, item 2.1.) foram utilizados, também, seis isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (ACB-BG1, ACB-CAT1, ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1 e ACB-PE2) que foram isolados a partir do processo de fermentação para a produção de etanol, caracterizados por electroforese de cariotipagem (FIALHO et al., 2010), e pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Bioquímica e Fermentação de Álcool do Departamento de Ciências Biológicas da Esalq/USP, Piracicaba-SP.

Foram realizados 5 ensaios, onde foram avaliados em média 20 isolados de leveduras em cada ensaio, utilizando a técnica de semeadura em profundidade, metodologia adaptada de Coelho et al. (2011). Uma suspensão de 100 mL contendo 1×10^5 conídios/mL de *P. italicum* foi adicionada em 900 mL de meio BDA fundente. Após a solidificação procedeu-se a uma perfuração no centro da placa (diâmetro, 5 mm) e alíquotas de 100 μ L de uma suspensão contendo cada isolado de levedura (10^7 células/mL) foram aplicadas nos locais perfurados. As suspensões das leveduras foram previamente preparadas pelo cultivo de cada isolado em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 100 mL, onde uma alçada de cada isolado (48 h de idade) foi adicionada em 25 mL de meio YEDP líquido, as culturas foram então

incubadas sob agitação de 250 rpm, durante 48h a 25°C e em fotoperíodo de 12h/12h. Após a instalação do experimento, as culturas foram incubadas em estufa para BDO a 22°C em fotoperíodo de 12h/12h, durante 7 dias. Para a avaliação mediu-se o diâmetro do halo de inibição, proporcionado pelos isolados de levedura, em dois sentidos perpendiculares após o período de incubação. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3. Atividade antifúngica *in vivo* a *Penicillium italicum*

2.3.1. Inoculação com o patógeno

Frutos de Laranja Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram obtidos em um *packing-house* na cidade de Limeira, SP, Brasil. Os frutos estavam no estágio de maturação comercial, selecionados por uniformidade de cor, forma e tamanho. Os frutos foram lavados, desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% e, feridos em dois pontos equidistantes, na região mediana dos frutos, com agulhas esterilizadas a uma profundidade de 3 mm. Em seguida, os frutos foram inoculados na região do ferimento com 20 µL de uma suspensão de *P. italicum* (1×10^4 conídios/mL), 24 h antes (tratamento preventivo) e 24 h após (tratamento curativo) a realização dos tratamentos.

2.3.2. Tratamentos

Oito isolados de leveduras (*Candida stellimalicola* ACBL-04; ACBL-05; *C. stellimalicola* ACBL-06; *C. stellimalicola* ACBL-07; *C. stellimalicola* ACBL-08; *C. stellimalicola* ACBL-10; ACBL-11 e *Cryptococcus* sp ACBL-14) que proporcionaram os maiores valores de inibições do crescimento micelial do fitopatógeno nos ensaios *in vitro* (item 2.2), foram selecionados para os tratamentos nos ensaios *in vivo*. Uma alçada de cada isolado foi retirada de colônias cultivadas por 48 h em meio YEPD, transferida em Erlenmeyer contendo 25 mL de meio YEPD líquido e incubada sob

agitação de 250 rpm por 48 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de células com auxílio de um hemocitômetro e as suspensões foram ajustadas para a concentração de 10^8 células/mL. Para o tratamento químico foi utilizado o fungicida Imazalil, na dose recomendada pelo comerciante (2 mL/L) para o controle do bolor verde em frutos cítricos. O controle positivo correspondeu aos frutos tratados com água destilada e esterilizada no lugar dos tratamentos.

Alíquotas de 20 μ L de cada um dos tratamentos foram aplicadas nos ferimentos, de maneira preventiva e curativa. Após a inoculação com *P. italicum* e a realização dos tratamentos, os frutos foram armazenados por 10 dias em câmara fria ($10^\circ \text{C} \pm 2$). A severidade da doença foi avaliada no 8º, 9º e 10º dia após a inoculação com o fitopatógeno. A incidência foi avaliada pela porcentagem de frutos doentes observados no 10º dia.

2.3.3. Análises Estatísticas

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições, com 20 frutos por repetição. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre o tamanho médio das lesões ocasionadas por *P. italicum*, efetuou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que é expressa pela plotagem da proporção de doença em porcentagem, versus o tempo (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). Segundo Shaner & Finney (1977), a AACPD pode ser calculada pela fórmula:

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

n – é o número de observações/avaliações.

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

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

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antifúngica *in vitro* a *Penicillium italicum*

1.1.1. Crescimento micelial

No primeiro ensaio realizado, para avaliar o antagonismo *in vitro* de 19 isolados de levedura à *P. italicum*, 15 isolados foram capazes de inibir entre 22 a 100 % o crescimento micelial do fungo (Figura 1). Dentre os isolados avaliados no Ensaio 1, pela técnica de semeadura por profundidade, 8 isolados (ACBL-04, ACBL-08, ACBL-07, ACBL-11, ACBL-05, ACBL-06, ACBL-14 e ACBL-10) obtiveram porcentagens de inibições acima que 80%, sendo que dentre estes, o isolado ACBL-04 promoveu 100% de inibição do crescimento micelial (Figura 2).

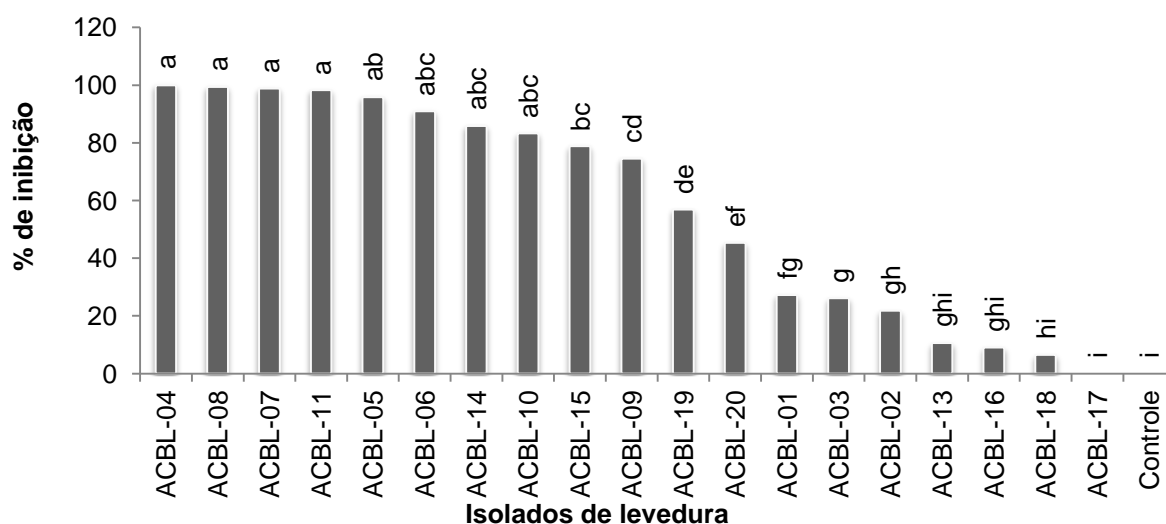


Figura 1. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 1.

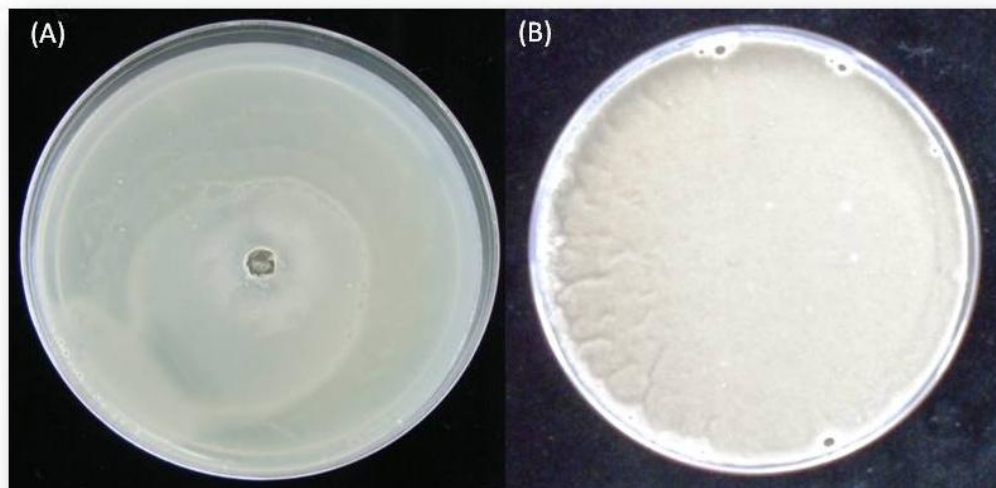


Figura 2. Antagonismo *in vitro* do isolado de levedura ACBL-04 (A), apresentando 100% de inibição do tamanho da colônia de *P. italicum* pela técnica de semeadura por profundidade após sete dias de armazenamento a 22°C. Controle (B).

Estudos realizados por Zhang et al. (2005), demonstraram que a levedura *Cryptococcus laurentii* foi capaz de inibir totalmente a germinação e o prolongamento do tubo germinativo de conídios de *P. italicum* em ensaios *in vitro*, quando utilizou-se a concentração de 1×10^8 células/mL do antagonista. No presente estudo, seis isolados (ACBL-04, ACBL-05, ACBL-06, ACBL-07, ACBL-08 e ACBL-11) foram capazes de inibir acima de 90% o crescimento micelial do fungo. Estudando o potencial antagônico de 44 isolados de leveduras, Coelho et al. (2011) observaram que 20 isolados proporcionaram antagonismo à *P. expansum*, em ensaios *in vivo*, utilizando a técnica de semeadura por profundidade em meio sólido, sendo que o isolado de *Debaryomyces hansenii* (isolado C1) responsável pela maior atividade antagônica ao fungo, proporcionando halo de inibição de 31 mm.

No segundo ensaio, 21 isolados de levedura foram testados e, dentre esses, nove isolados inibiram a colônia do fungo, com porcentagens de inibições de até 62,6% (ACBL-12) (Figura 3).

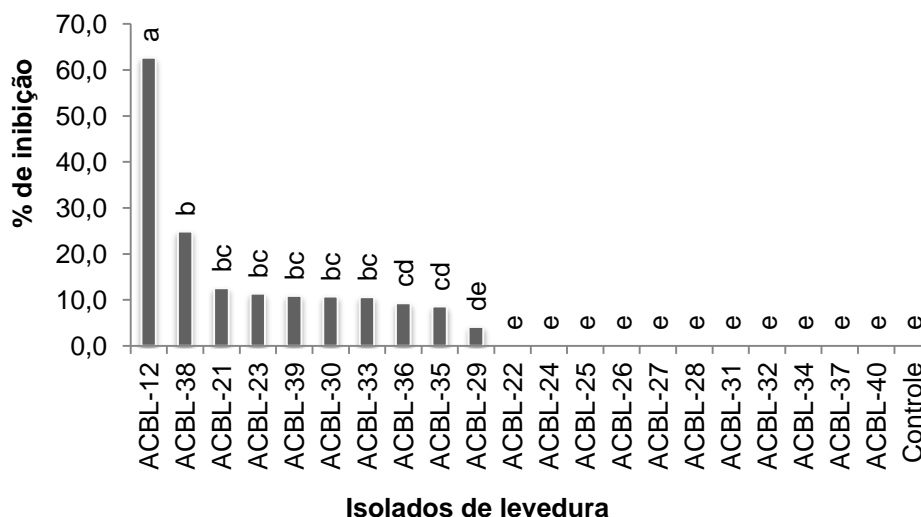


Figura 3. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 2.

No ensaio 3, dos 18 isolados de leveduras avaliados, cinco isolados foram capazes de diminuir o crescimento micelial, com porcentagens de inibições que variaram de 6,5 a 29% (Figura 4). Avaliando o potencial da atividade antagônica no crescimento micelial de *P. italicum* utilizando um isolado da levedura *C. laurentii*, Zhang et al. (2005) observaram que a levedura não inibiu o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno em meio BDA, porém, quando utilizadas suspensões do antagonista para avaliar o potencial de inibição na germinação de conídios do patógeno, foram obtidos porcentagens de inibições de até 100% na germinação.

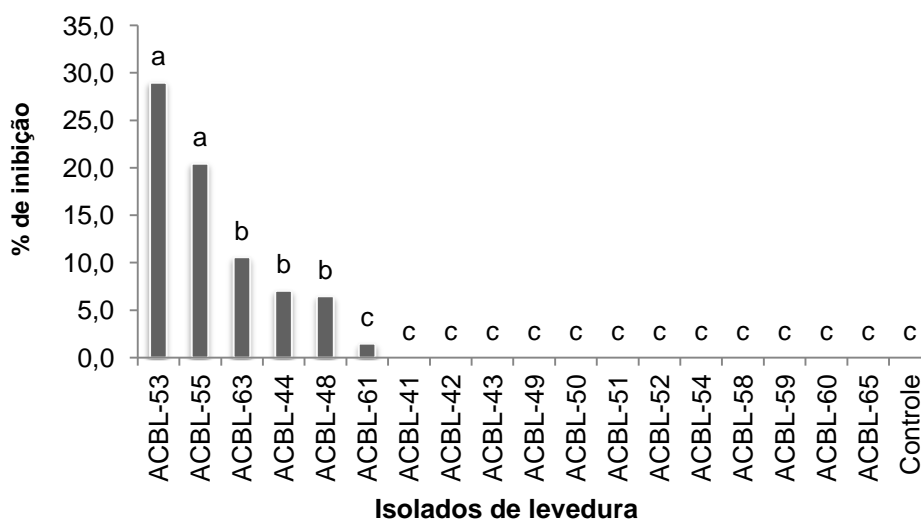


Figura 4. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 3.

No quarto ensaio, das 20 leveduras avaliadas, 14 inibiram o crescimento micelial de *Penicillium* spp. com porcentagens de inibições que variaram de 9 a 37% (Figura 5). Em estudos, Long et al. (2005) demonstraram que a levedura *Kloeckera apiculata* foi capaz de inibir o crescimento de *P. italicum in vitro* assim como em ensaios *in vivo*.

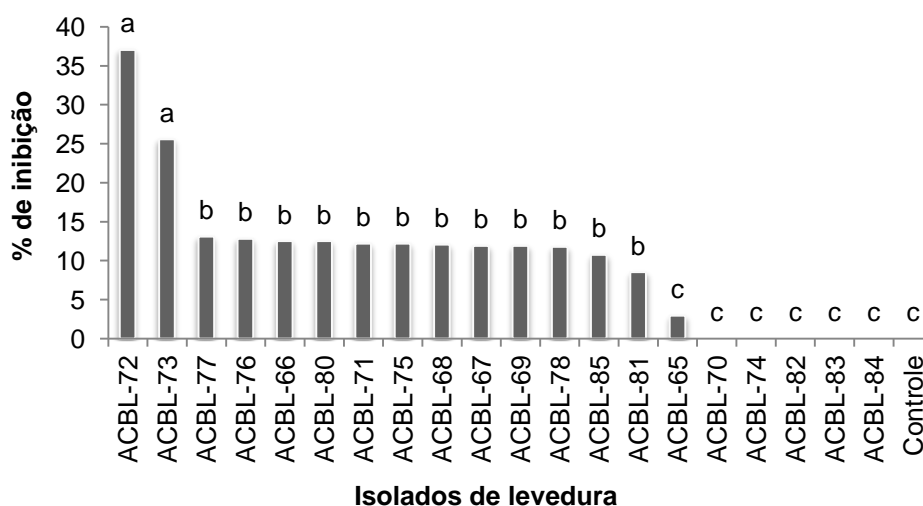


Figura 5. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 4.

No quinto e último ensaio realizado, a fim de se avaliar a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno, foram testados 25 isolados de leveduras, sendo que 18 isolados foram capazes de diminuir o desenvolvimento da colônia, com valores de inibições que variaram de 6 a 58%, sendo o isolado de *S. cerevisiae* - ACB-K1 o que proporcionou o maior valor de inibição (Figura 6). Estudando a capacidade antagônica de isolados de *Cryptococcus* sp., *Candida* sp. e *Saccharomyces* sp., Abd-Alla et al. (2007), observaram que os antagonistas foram capazes de inibir a colônia de *G. candidum*, com valores de inibições do crescimento micelial do fungo de até 51,1% quando utilizado o isolado de *Saccharomyces* spp.

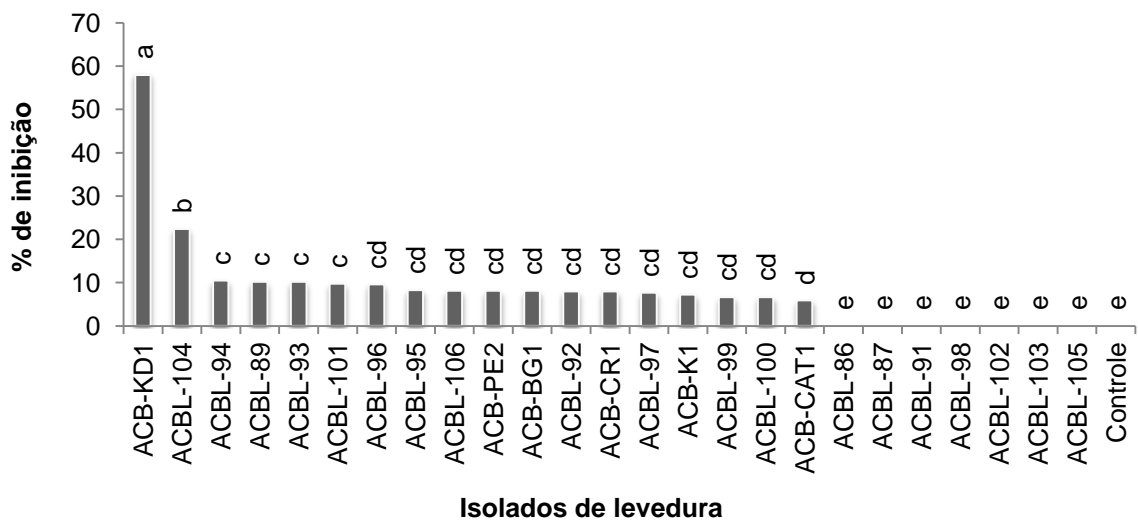


Figura 6. Efeito de diferentes isolados de levedura sob o crescimento micelial do fungo *Penicillium italicum*. Ensaio 5.

3.2. Atividade antifúngica *in vivo* a *Penicillium italicum*

3.2.1. Efeito dos tratamentos no progresso do bolor azul em frutos de Laranja Pêra

Quando frutos de Laranja Pêra foram tratados 24 horas antes da inoculação com o fitopatógeno (tratamento preventivo), todos os tratamentos foram capazes de diminuir o desenvolvimento do tamanho médio das lesões. Os melhores tratamentos preventivos foram: fungicida Imazalil, o qual não proporcionou nenhuma lesão de bolor azul, seguido dos isolados ACBL-05, que proporcionou 2,3 mm de diâmetro médio das lesões, ACBL-10 (2,9 mm), ACBL-08 (3,8 mm), ACBL-04 (4,4 mm) e ACBL-11 (9,8 mm) (Figura 7-A e 8-A).

Para o tratamento curativo, seis tratamentos (Imazalil, ACBL-08, ACBL-05, ACBL-04, ACBL-14 e ACBL-11) foram capazes de diminuir o desenvolvimento das lesões ao longo do período das avaliações, proporcionando lesões com diâmetros médios que variaram de 0,4 mm (Imazalil) a 36,4 mm (ACBL-11) (Figura 7-B e 8-B).

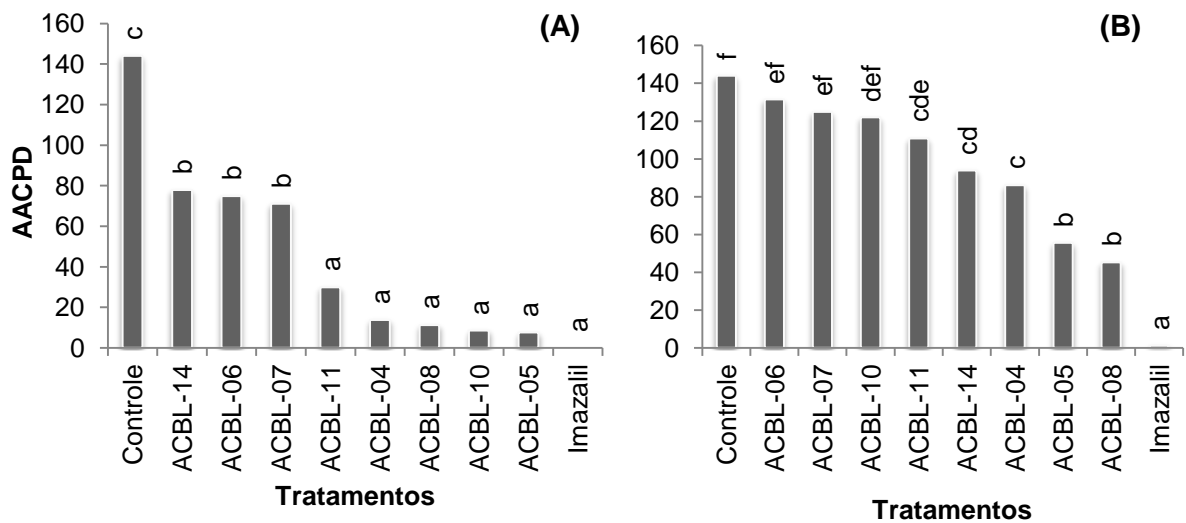


Figura 7. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *P. italicum*, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados em câmara fria ($10^{\circ}\text{C}\pm 2$) durante 10 dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.

Pelos resultados obtidos no presente estudo, pode-se observar que os isolados de leveduras diminuíram o progresso da doença em frutos de Laranja Pêra, quando aplicados antes da inoculação com o *P. italicum*, mostrando o efeito preventivo dos tratamentos. Resultados semelhantes foram demonstrados por outros autores, que utilizando isolados de leveduras para o controle do bolor azul, observaram que quando aplicadas de maneira preventiva, as leveduras eram mais eficientes no controle da doença do que quando utilizadas curativamente (SPOTTS & CHAND-GOYAL, 1997; FAN & TIAN, 2001; LAHLALI et al., 2004; ZHANG et al., 2005).

Estudando a capacidade da levedura *Klockera apiculata* em afetar o desenvolvimento de lesões ocasionados por *P. italicum*, Long et al. (2005), observaram que o isolado 34-9 foi capaz de impedir completamente o desenvolvimento das lesões em frutos armazenados a 25°C . No presente estudo, cinco isolados de levedura (ACBL-05, ACBL-10, ACBL-08, ACBL-04 e ACBL-11), foram capazes de reduzir significativamente o tamanho da lesão, não diferindo do tratamento químico utilizado.

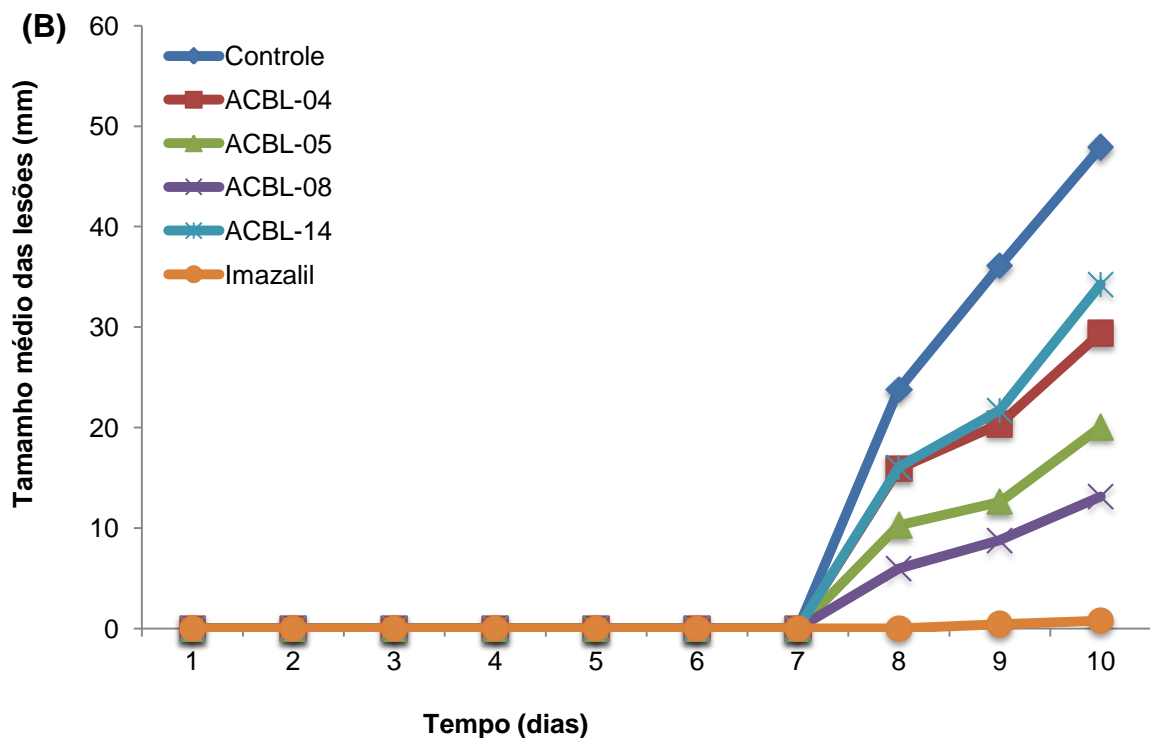
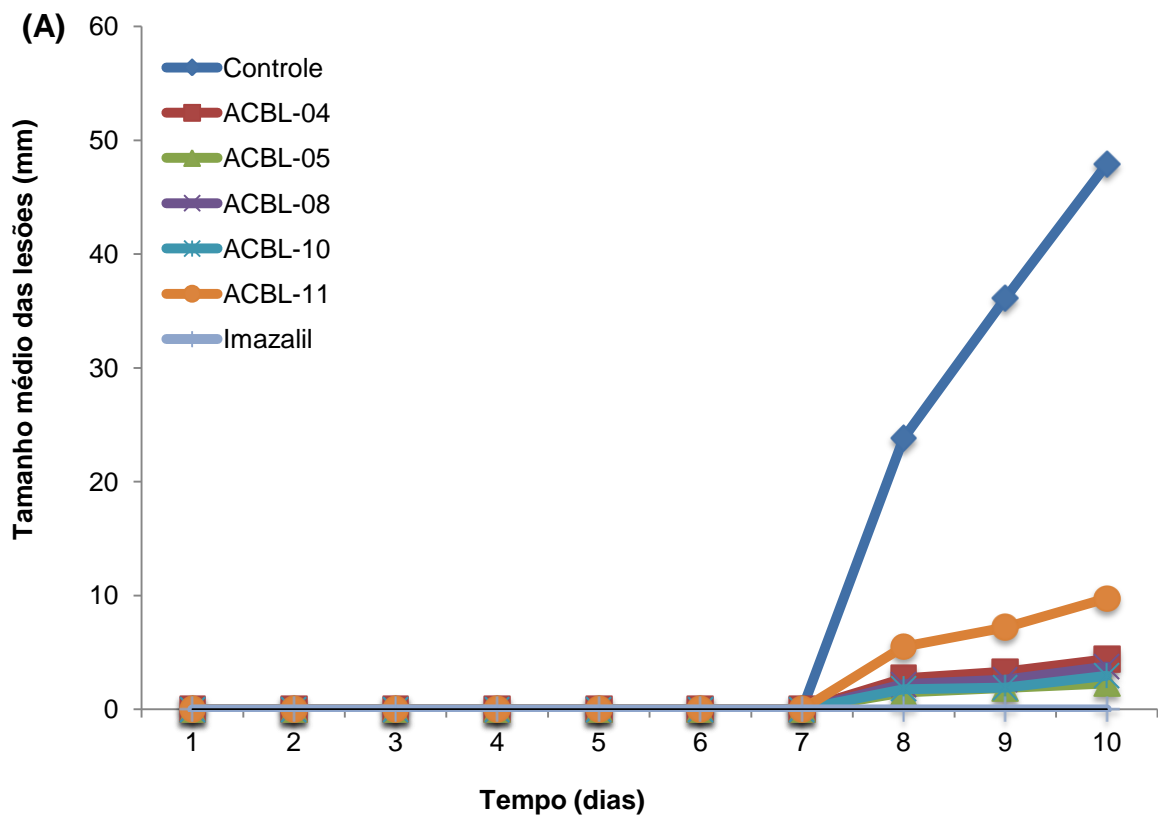


Figura 8. Efeito *in vivo* dos melhores isolados de levedura no desenvolvimento do tamanho médio de lesões ocasionadas por *P. italicum* em frutos de Laranja Pêra tratados de maneira preventiva (A) e curativa (B), armazenados por 10 dias em câmara fria ($10^{\circ}\text{C}\pm 2$) por 10 dias.

Considerando os tratamentos preventivos e curativos para o progresso do bolor azul em frutos de laranja Pêra, alguns tratamentos foram eficientes tanto de maneira curativa quanto preventiva como demonstrado na Figura 9.

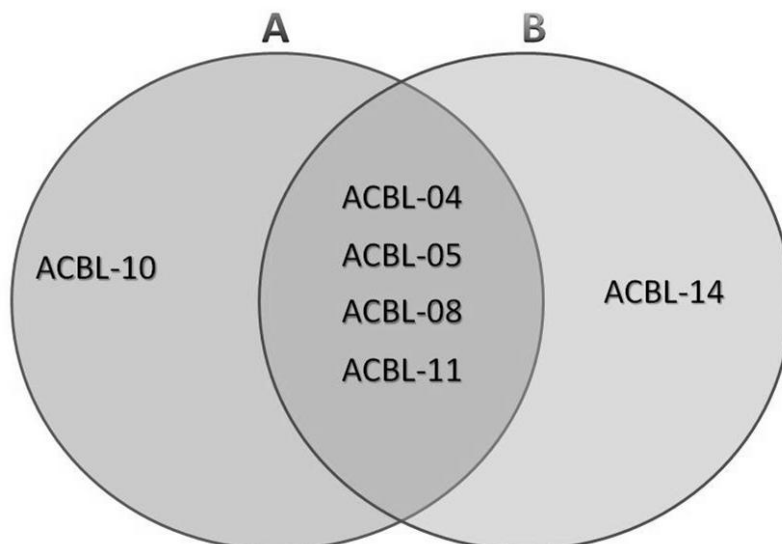


Figura 9. Diagrama de Ven demonstrando os melhores tratamentos utilizados preventivamente (A) e curativamente (B) no progresso do bolor azul em frutos de laranja Pêra. Interseção demonstra os tratamentos que foram eficientes utilizados das duas maneiras, curativa e preventivamente.

3.2.2. Efeito dos tratamentos na incidência do bolor azul em frutos de Laranja Pêra

Quando os frutos foram tratados de maneira preventiva, os melhores tratamentos foram: o fungicida Imazalil proporcionando 100% de frutos sadios, seguido dos isolados ACBL-05 (92%), ACBL-10 (83%), ACBL-08 (78%), e ACBL-04 (75%) (Figura 10-A). Quando os tratamentos foram realizados após 24 horas de inoculação com o patógeno, somente o fungicida Imazalil e o isolado ACBL-08 foram capazes de impedir a ocorrência de frutos com sintomas do bolor azul, apresentando 3 e 57% de frutos doentes, respectivamente (Figura 10-B).

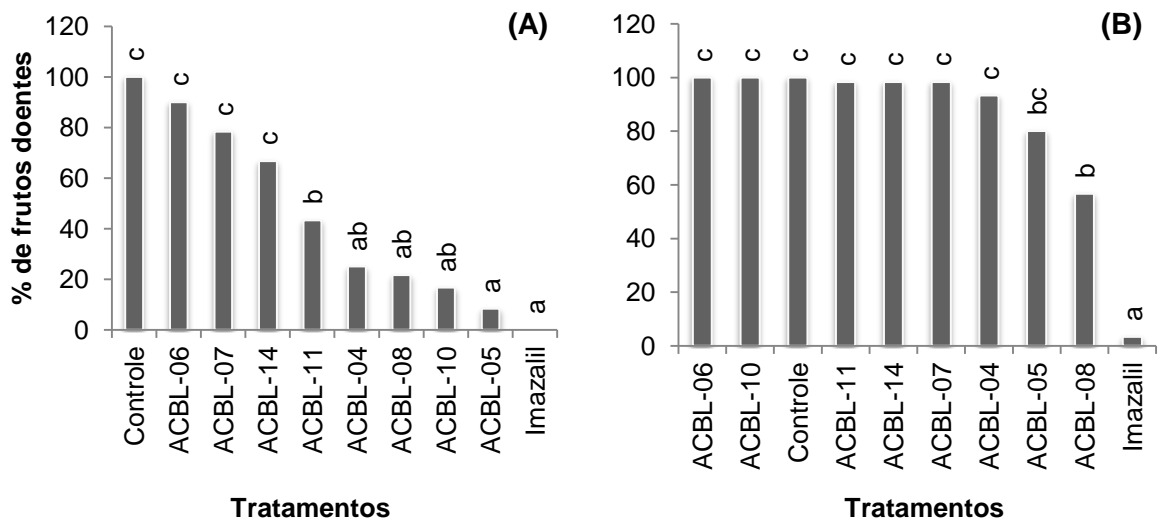


Figura 10. Porcentagem de frutos de Laranja Pêra com sintomas do bolor azul, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes isolados de levedura, armazenados a em câmara fria ($10^{\circ}\text{C}\pm 2$), por 10 dias. Significância estatística determinada em $P < 0,05$ de acordo com o teste Tukey de separação de médias.

Avaliando-se a incidência e severidade do bolor azul em frutos de Laranja Pêra (Figura 11), verifica-se que, os isolados de levedura ACBL-04 (*C. stellimalicola*), ACBL-05, ACBL-08 (*C. stellimalicola*), ACBL-10 (*C. stellimalicola*) e ACBL-11 foram mais eficientes quando aplicados de forma preventiva. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (LAHLALI et al., 2004). O uso de leveduras pode ser importante para uma aplicação destes microrganismos de forma prévia, em aplicações no campo, visando assim uma maior proteção dos frutos à patógenos que ocorrem na pós-colheita em *packing-house* (SPOTTIS et al., 1998). O controle preventivo dos bolores verde e azul é importante, pois a maioria das infecções ocorre através de ferimentos ocasionados durante ou, logo após a colheita (TEIXIDÓ et al., 2001).

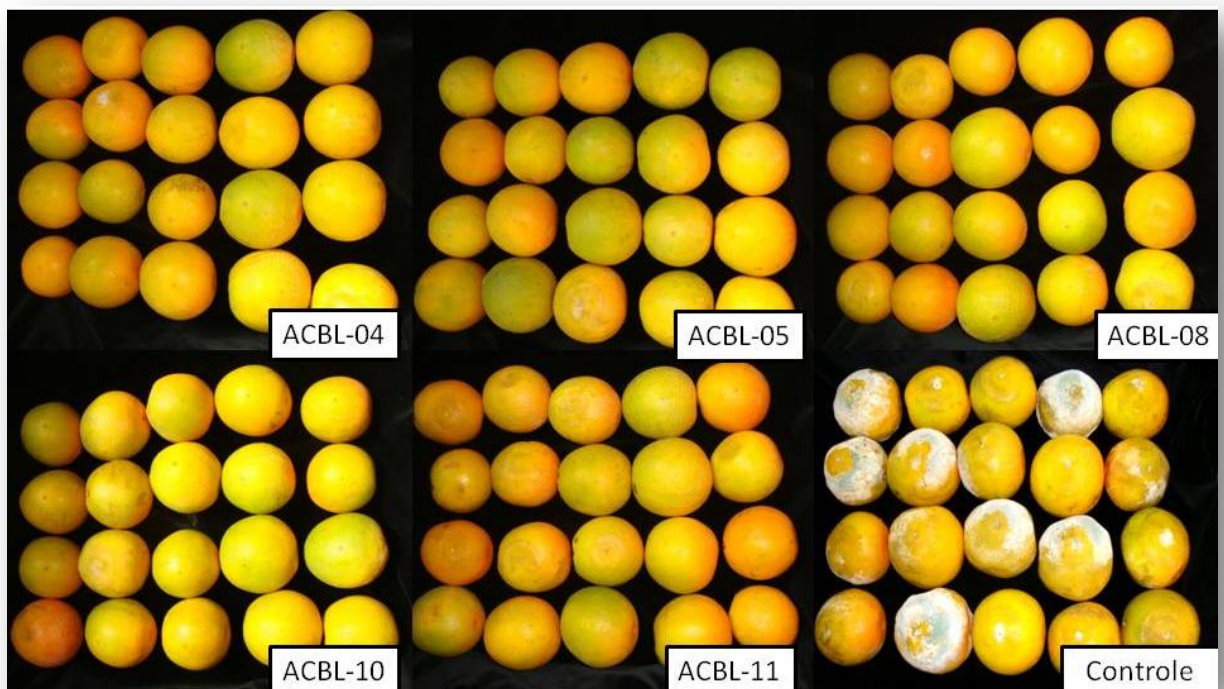


Figura 11. Isolados de levedura, ACBL-04, ACBL- e ACBL-77, mais eficientes no controle do bolor azul em frutos de Laranja Pêra tratados preventivamente e inoculados com *Penicillium italicum*, armazenados a em câmara fria ($10^{\circ}\text{C}\pm 2$), por 10 dias.

O ensaio *in vivo*, para avaliar o potencial antagônico das leveduras foi realizado em câmara fria, fato que demonstra que esses isolados, possivelmente, suportam valores baixos de temperatura, tornando-se assim, potenciais agentes para o biocontrole do bolor azul em frutos cítricos, uma vez que, esses frutos são comumente armazenados sob condições frigoríficas, sendo esta, uma estratégia de controle tradicional para frutos e legumes na pós-colheita (ZHANG et al., 2005). Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para avaliar o desenvolvimento destes isolados de levedura em fermentos ocasionados em frutos de Laranja Pêra, sob diferentes temperaturas, a fim de se verificar a capacidade de crescimento e colonização dos fermentos em câmara fria e em temperaturas ambientes.

No presente estudo foi observado controle de bolor azul em frutos de laranja Pêra acima de 90%, quando o isolado ACBL-05 foi aplicado de maneira preventiva, demonstrando assim, o potencial da utilização deste isolado para o biocontrole da doença. Estudos realizados por Long et al. (2005) demonstraram altos níveis de

controle de *P. italicum* e *B. cinerea*, utilizando a levedura de *Kllockera apiculata*, com porcentagens de inibições do bolor azul de até 100%.

Para a redução da incidência do bolor azul, somente o isolado ACBL-08, foi eficiente quando utilizado preventiva e curativamente, como demonstrado na figura 12.

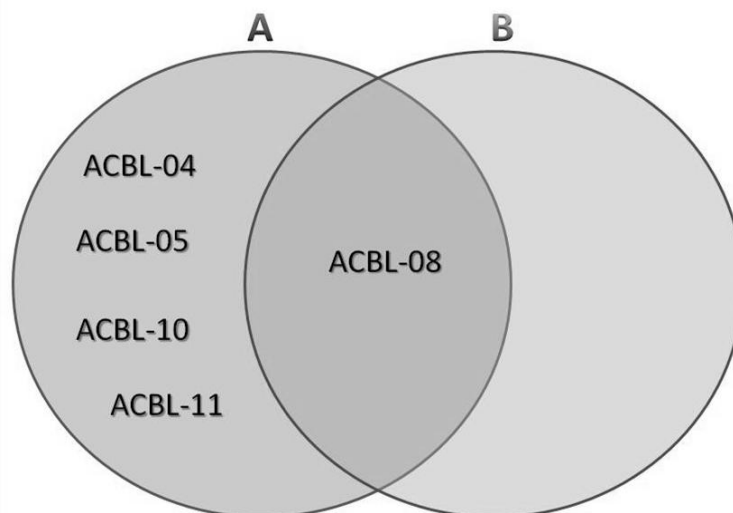


Figura 12. Diagrama de Ven demonstrando os melhores tratamentos utilizados preventiva (A) e curativamente (B) na incidência do bolor azul em frutos de laranja Pêra. Intersecção demonstra os tratamentos que foram eficientes utilizados das duas maneiras, curativa e preventivamente.

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que, os isolados de levedura ACBL-04 (*C. stellimalicola*), ACBL-05, ACBL-08 (*C. stellimalicola*), ACBL-10 (*C. stellimalicola*) e ACBL-11 têm potencial para o controle do bolor azul, quando utilizados de maneira preventiva.

5. REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M.A.; EL-MOHAMEDY, R.S.R.; EL-MOUGY, N.S. Control of sour rot disease of lime fruits using saprophytic isolates of yeast, **Egypt. J. Phytopathol.**, vol. 35, n. 2, p. 39-51, 2007.
- BERGAMIM FILHO, A; AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: epidemiologia e controle econômico.** São Paulo: Editora Ceres, 1996. 299 p.

- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, San Diego, v. 42, p. 326–335, 2007.
- COELHO, A.R.; NÓBREGA, G.M.A.; PAGNOCCA, F.C.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K.; HIROOKA, E.Y. **Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum***. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1879-1892, 2011.
- DROBY, S., VINOKUR, V., WEISS, B., COHEN, L., DAUS, A., GOLDSCHMIDT, E.E., PORAT, R., 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Biol. Control**. 92, 4, 393-399.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. (Eds.) **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables –theory and practice**. CRC Press, 1994, p.63-75.
- FAN, Q.; TIAN, S.P. 2001. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. **Postharvest Biol. Technol.** 21: 341–350.
- FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60p. Dissertação de mestrado – 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 J Microbiol Biotechnol**, 26, 925-932, 2010
- GAMAGAE, S.U.; SIVAKUMAR, D.; WIIJESUNDERA, 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**, v.23, p.575-579, 2004.

- HOLMES, G.J. AND J.W. ECKERT, 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. **Phytopathology** 89 : 716–721.
- HUSSEIN, H.S.; MACKIE, R.I.; MERCHEN, N.R.; BAKER, D.H.; PARSONS, C.M. Effects of oleaginous yeast in growth performance, fatty acid composition of muscles, and energy utilization by poultry. **Bioresource Technology**, v.55, p.125-130, 1996.
- LAHLALI, R., SERRHINI, M.N., JIJAKLI, M.H., 2004. Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain 0) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in morocco . **Appl. Biol. Sci**, Ghent University, 69/4, 601-610.
- LIMA, G., DE CURTIS, F.; CASTORIA, R.; DE CICCIO, V. 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. **Biocontrol Sci. Technol.** 8: 257–267.
- LIMA, G.; ARRU, S.; DE CURTIS, F.; ARRAS, G. 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 23: 223–229.
- LONG, C.A.; WU, Z.; DENG, B.W. Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by strain 34–9 of *Kloeckera apiculata*. **Eur Food Res Technol**, 221:197–201, 2005.
- PALOU, L., USALL, J.; MUÑOZ, J.A.; SMILANICK, J.L.; VIÑAS, I. 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Postharvest Biol. Technol.** 24: 93–96.
- ROBERTS, R.G., 1990. Postharvest biological control of gray mold of apples by *Cryptococcus laurentii*. **Phytopathology** 80: 526–530.
- SHANER, G; FINNEY, RE. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1055, 1977.
- SPOTTS, R.A.; CHAND-GOYAL, T. 1997. Combinations of biocontrol yeasts and eradicant activity of yeasts for postharvest pear diseases (Abstract). **Phytopathology** 87: 593.

- SPOTTS, R.A.; SANDERSON, P.G.; LENNOX, C.L.; SUGAR, D; CERVANTES, L.A. 1998. Wounding, wound healing and straining of mature pear fruit. **Postharvest Biol.Technol.** 13: 27–36.
- TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; PALOU, L.; ASENSIO, A.; NUNES, C.; VIÑAS, I. **Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate.** *European Journal of Plant Pathology* **107**: 685–694, 2001.
- WISNIEWSKI, M.E.; C.L. WILSON, 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. **Hort. Science** 27: 94–98.
- ZHANG, H.Y.; ZHENG, X.; XI, Y.F. 2005. Biological control of postharvest blue mould of orange by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. **BioControl** , 50:331-342.

CAPÍTULO 6- CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS ANTAGONISTAS AOS FITOPATÓGENOS DE PÓS-COLHEITA EM CITROS

RESUMO - A identificação de leveduras através do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal tem-se apresentado como uma tecnologia muito aplicada e eficiente. O DNA ribossomal apresenta regiões conservadas e repetitivas de aproximadamente 11 kb, dentro das quais está localizada a região ITS, composta pelas sequencias ITS1 e ITS2, incluindo a região denominada 5,8S. Neste trabalho, objetivou-se identificar leveduras epífitas com potencial de aplicação como agente de biocontrole aos principais fitopatógenos de pós-colheita em citros. Foi realizado o sequenciamento da região ITS do rDNA de 24 isolados de leveduras selecionados pelos testes de antagonismo à *G. candidum*, *P. digitatum* e *P. italicum*. Ao todo, 16 isolados foram identificados com base nos dados moleculares, sendo seis isolados (ACBL-04, ACBL-06, ACBL-07, ACBL-08, ACBL-10 e ACBL-84) pertencentes à espécie de *Candida stellimalicola*, cinco isolados (ACBL-50, ACBL-76, ACBL-80, ACBL-81 e ACBL-82) foram identificados como pertencentes ao Gênero *Saccharomyces* sp., e quatro isolados, ACBL-14, ACBL-44, ACBL-77 e ACBL-86, pertencem à grupos diferentes, sendo estes identificados como *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*; *Sporobolomyces koalae* e *Meyerozyma caribbica*, respectivamente.

Palavras-chave: *Candida stellimalicola*, *Geotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, identificação molecular.

CHAPTER 6 - CHARACTERIZATION OF ANTAGONISTS YEAST TO CITRUS PATHOGENS POST-HARVEST

ABSTRACT – The yeast's identification by sequence of ITS region (*Internal Transcribed Spacers*) from rDNA have been showed with an efficacy technology. The rDNA has conserved regions around 11 kb, in side of than was found the ITS region, and the sequences ITS1 and TS2, incluín the 5.8S region. This work, aimed to identify epifictis yeasts with a potential application by biocontrol agent against the mos important pathogens of postharvest in citrus. The sequencing by ITS from rDNA of the 24 yeast strains, selected by antagonism assays to *G. candidum*, *P. digitatum* and *P. italicum*. Altogether, 16 strains were identify, through genetic material and observation of morphological characteristics, six isolates of *Candida stellimalicola* were identified, five isolates of the genus *Saccharomyces* sp., and four isolates belonging to different groups, *Cryptococcus* sp., *R. mucilaginosa*, *Sporobolomyces koalae* and *Meyerozyma caribbica*, respectively.

Keywords: *Candida stellimalicola*, *Geotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, molecular characterization.

1. INTRODUÇÃO

Na identificação de micro-organismos a taxonomia clássica utiliza caracteres morfológicos, estruturais, bioquímicos e fisiológicos para criar comparações entre organismos e grupos de organismos. Para leveduras, caracteres morfológicos, tais como a forma da célula, os tipos de brotamento, e a formação de filamentos, são considerados para identificação de gêneros. E os fisiológicos, como os de assimilação e fermentação de açúcares, são utilizados para níveis taxonômicos de espécies (RIBEIRO, 2009).

A taxonomia polifásica se caracteriza pela inclusão de dados moleculares ao conjunto de dados que anteriormente eram utilizados e de dados filogenéticos para a classificação do organismo (COLWELL, 1970). Na Microbiologia, muitas vezes os dados estruturais são limitados e provas bioquímicas e fisiológicas se mostram taxonomicamente inconsistentes, sendo assim, a utilização de características dos ácidos nucleicos mais uma ferramenta na caracterização de levedura.

Para leveduras, a abordagem polifásica tem sido utilizada para a classificação e descrição de novas espécies (MONTES et al., 1999; GADANHO et al., 2001), porém, em trabalhos mais recentes, encontrados na revisão de literatura, sobre o levantamento de leveduras de solo, rizoplano e filoplano a biologia molecular é utilizada para a classificação de isolados (RIBEIRO, 2009).

A identificação de leveduras através do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal tem-se apresentado como uma tecnologia muito aplicada e eficiente (WHITE et al., 1994; DROBY et al., 1999; CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2007; ROSA-MAGRI et al., 2011). O DNA ribossomal apresenta regiões conservadas e repetitivas de aproximadamente 11 kb, dentro das quais está localizada a região ITS, composta pelas sequências ITS1 e ITS2, incluindo a região denominada 5,8S.

Neste trabalho, objetivou-se identificar leveduras epífitas com potencial de aplicação como agente de biocontrole aos principais fitopatógenos de pós-colheita em citros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação das leveduras

Vinte e quatro isolados de leveduras (ACBL-04, ACBL-05, ACBL-06, ACBL-07, ACBL-08, ACBL-10, ACBL-11, ACBL-14, ACBL-23, ACBL-42, ACBL-44, ACBL-50, ACBL-52, ACBL-68, ACBL-76, ACBL-77, ACBL-78, ACBL-80, ACBL-81, ACBL-82, ACBL-84, ACBL-86, ACBL-87 e ACB-K1) que apresentaram os melhores resultados nos teste de antagonismo à *Geotrichum candidum* (Capítulo 3), *Penicillium digitatum* (Capítulo 4) e *Penicillium italicum* (Capítulo 5), foram identificados através da análise do material genético, utilizando técnicas de biologia molecular. Além dos testes moleculares, para determinar as espécies dos isolados de levedura selecionados, foram realizadas observações das características morfológicas dos isolados, como a observação das colônias, quanto à coloração, a borda e superfície, sendo estas características observadas diretamente, ou posteriormente, através das fotografias.

2.1.1. Extração de DNA

Foi realizada, inicialmente, a extração de DNA das leveduras, através do kit Wizard Genomic DNA Purification KIT - Promega. Uma alçada das células de uma colônia de cada isolado de levedura, cultivada em meio YEDP durante 48 horas, foi transferida para tubos estéreis contendo 500µL de tampão TE 1 X. Aliquotas de 6 µL de proteinase K (20mg/mL) foram adicionadas e a reação foi incubada a 37°C durante 1 hora. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 13000 x g por 6 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 600 µL de Nuclei Lysis Solution, sendo os tubos incubados em seguida a 80°C durante 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente (15 minutos).

Após o resfriamento, adicionou-se 200 µL de Protein Precipitation Solution, e os tubos foram agitados em vortex durante 30 segundos e, em seguida, incubados em gelo durante 5 minutos. Após este período, deu-se início a uma nova centrifugação a 13000 x g por 3 minutos. Aliquotas de 1,5 mL da fase superior foram

transferidas para tubos estéreis onde adicionaram-se 600 µL de isopropanol ou 2 volumes de etanol absoluto, misturando os tubos suavemente.

Os tubos foram mantidos a -20°C (*overnight*) e após este período foram centrifugados a 14000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, sendo o *pellet* seco ao ar por 1 hora. Em seguida o *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE 1 X, e armazenado em freezer a -20°C.

A quantidade e a qualidade (pureza) do DNA extraído foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c).

2.1.2. Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, incluindo o gene 5.8S, foi realizada através de reação de PCR, utilizando-se os seguintes *primers*: *forward*- ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e *reverse* - ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), conforme protocolo de WHITE et al., 1994.

A reação ocorreu em um volume de 100 µL, contendo 10 µL do tampão 10X, 3 µL de cloreto de magnésio 50 mM, 8 µL de cada dNTP 2,5 mM, 1 µL de cada *primer* 100 µM, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL), 100 ng de DNA genômico e 51,75 µL de água milli-Q estéril. O ciclo de amplificação foi o seguinte: 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos, e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de 1 ciclo final de extensão 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit comercial “*PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit*” (Invitrogen™).

Para a estimativa da presença, quantidade e integridade dos amplicons, 25 µL do produto de amplificação foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 1X. O gel foi submetido a uma voltagem de 2,24 volts/cm e corrente de 90 mA, por 90 minutos (Fonte EPS301 – Amersham Biotechnology). A estimativa de concentração do DNA foi realizada comparativamente com a espessura e intensidade das bandas do marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 0,3 µL/mL, sendo a visualização do gel realizada em transiluminador de luz UV.

2.1.3. Sequenciamento da região ITS do rDNA

A reação de sequenciamento foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pertencente ao Instituto Agronômico de Campinas, em Cordeirópolis/SP.

A reação consistiu em 3 µL do produto de PCR purificado, 0,5 µL de *primer* (ITS-1 ou ITS-4), 0,4 µL do kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), 2 µL do tampão SM e água Milli-Q estéril para completar 10 µL. O programa consistiu de 1 ciclo de 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de 96°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos, e 60°C por 4 minutos. Para a precipitação foram utilizados 80 µL de isopropanol 65%, deixando-se em repouso na bancada por 15 minutos. Após o repouso, foi realizada a centrifugação a 3000 rpm por 45 minutos, sendo o sobrenadante descartado e deixado para secar ao ar por 1 minuto. Foram adicionados 200 µL de etanol 60%, e nova centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, secado e lavado com etanol novamente. Em seguida foi dado um pulso de centrifugação e secagem ao ar por 1 hora, ressuspendendo em 10 µL de Hi-Di Formamida, procedendo-se a desnaturação do DNA por incubação a 95°C por 5 minutos e imediatamente em seguida, a solução foi colocada em gelo até o momento do sequenciamento, realizado em sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram trabalhadas, utilizando-se o programa BioEdit, e comparadas com outras já conhecidas e disponíveis no banco de dados GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), sendo estas submetidas a um alinhamento através do aplicativo Clustal W 1.4 (THOMPSON et al., 1994).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação das leveduras

As características morfológicas das leveduras selecionadas como potenciais agentes no controle de *G. candidum* estão representadas na Figura 1.

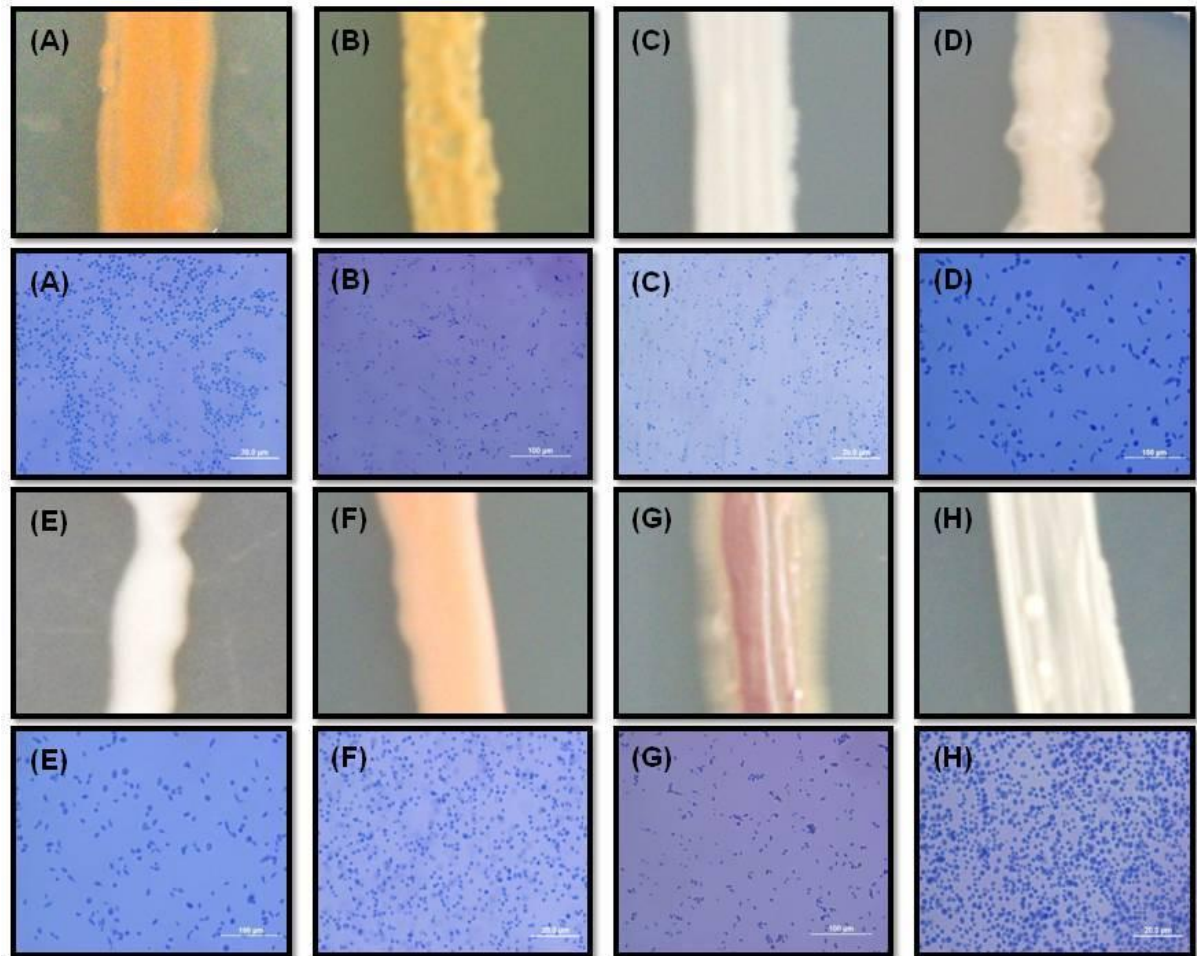


Figura 1. Aspecto das colônias (acima) em meio BDA e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas à *G. candidum* (aumento de 400 X, para as fotos das células). ACBL-23 (A); ACBL-42 (B); *Rhodotorula mucilaginosa* ACBL-44 (C); *Saccharomyces* sp ACBL-50 (D); ACBL-52 (E); ACBL-68 (F); *Sporobolomyces koalae* ACBL-77 (G) e *S. cerevisiae* ACB-K1 (H).

As características morfológicas das leveduras selecionadas como potenciais agentes no controle de *P. digitatum* estão apresentadas na Figura 2.

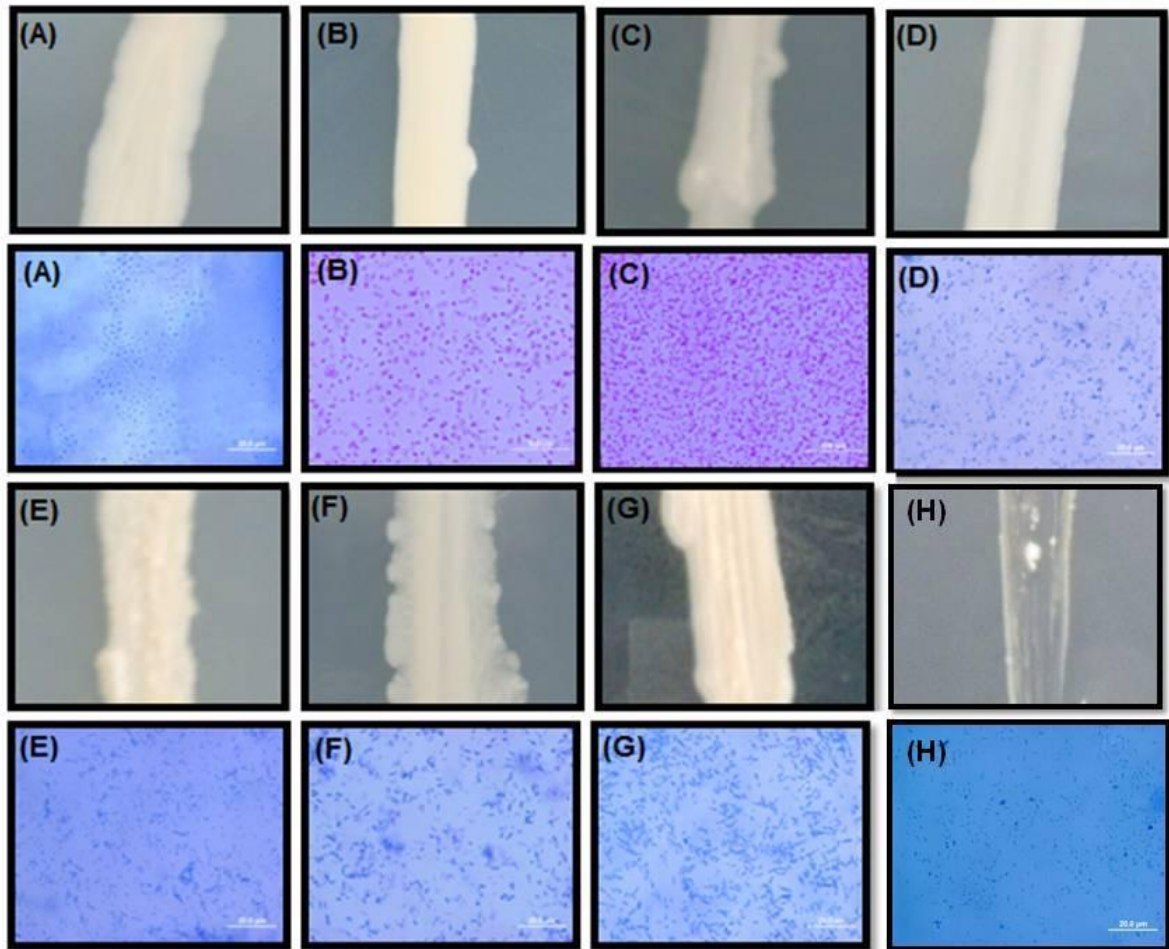


Figura 2. Aspecto das colônias (acima) em meio BDA e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas à *P. digitatum* (aumento de 400 X, para as fotos das células). *Saccharomyces cerevisiae* ACBL-76 (A); ACBL-78 (B); *S. cerevisiae* ACBL-80 (C); *S. cerevisiae* ACBL-81 (D); *S. cerevisiae* ACBL-82 (E); *Candida stellimalicola* ACBL-84 (F); *Meyerozyma caribbica* ACBL-86 (G) e ACBL-87 (H).

As características morfológicas das leveduras selecionadas como potenciais agentes no controle de *P. italicum* estão representadas na Figura 3.

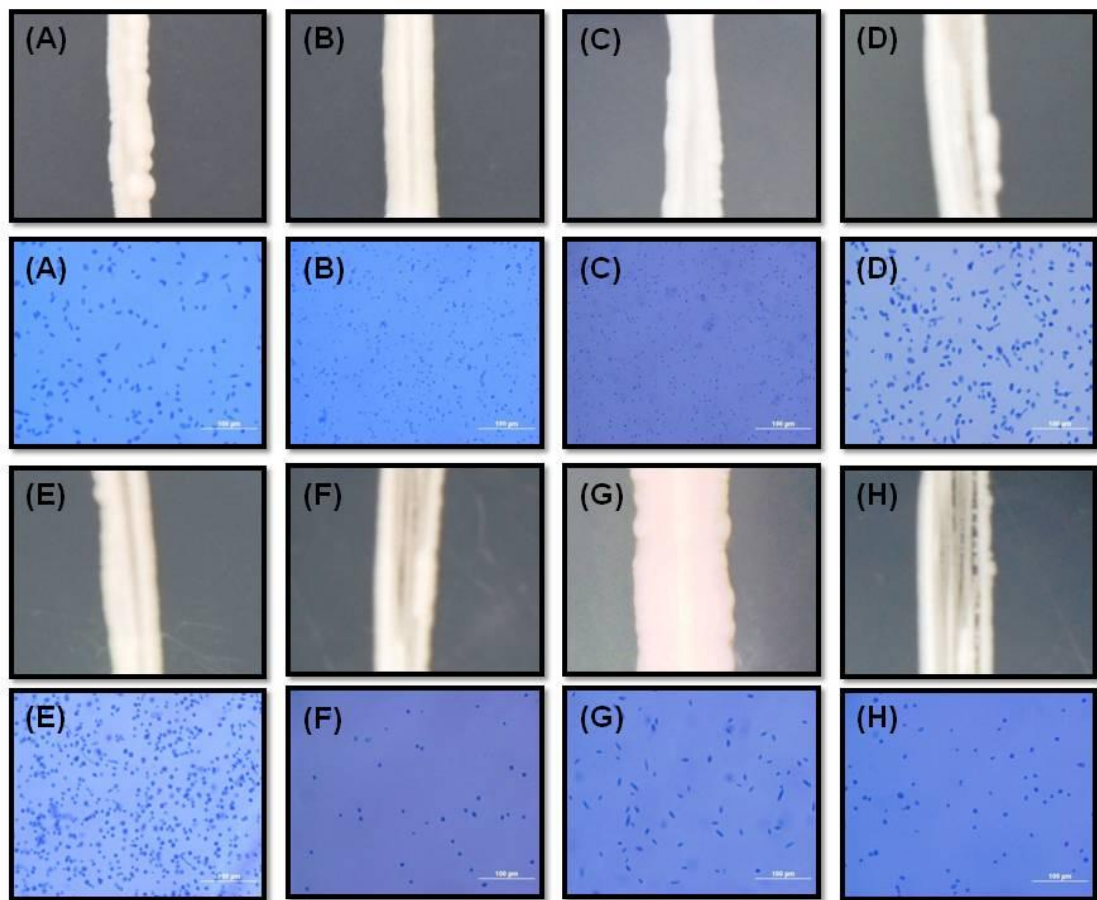


Figura 3. Aspecto das colônias (acima) em meio BDA e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas à *P. italicum* (aumento de 400 X, para as fotos das células). *Candida stellimalicola* ACBL-04 (A); ACBL-05 (B); *C. stellimalicola* ACBL-06 (C); *C. stellimalicola* ACBL-07 (D); *C. stellimalicola* ACBL-08 (E); *C. stellimalicola* ACBL-10 (F); ACBL-11 (G) e *Cryptococcus* sp ACBL-14 (H).

Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, a identificação de micro-organismos pode ser realizada de forma rápida e mais eficiente, sem a necessidade de uso dos métodos clássicos que utilizam padrões de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, além de testes fisiológicos e morfológicos, os quais são laboriosos, demorados e muitas vezes não conclusivos.

A identificação de leveduras através do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal tem-se apresentado como uma tecnologia muito aplicada e eficiente (WHITE et al. 1994; DROBY et al., 1999; CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2007). O DNA ribossomal apresenta regiões conservadas e repetitivas de aproximadamente 11 kb, dentro das quais está

localizada a região ITS, composta pelas seqüências ITS1 e ITS2, incluindo a região denominada 5,8S.

Os isolados de levedura, selecionados nos testes de antagonismo aos principais fitopatógenos de pós-colheita em citros (Capítulos, 3, 4 e 5), foram submetidos à extração do DNA genômico, seguido de PCR da região ITS do rDNA, purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados. Na Figura 4 é apresentado o gel de agarose com o produto de PCR das linhagens de leveduras, utilizando-se os *primers* ITS-1 e ITS-4.

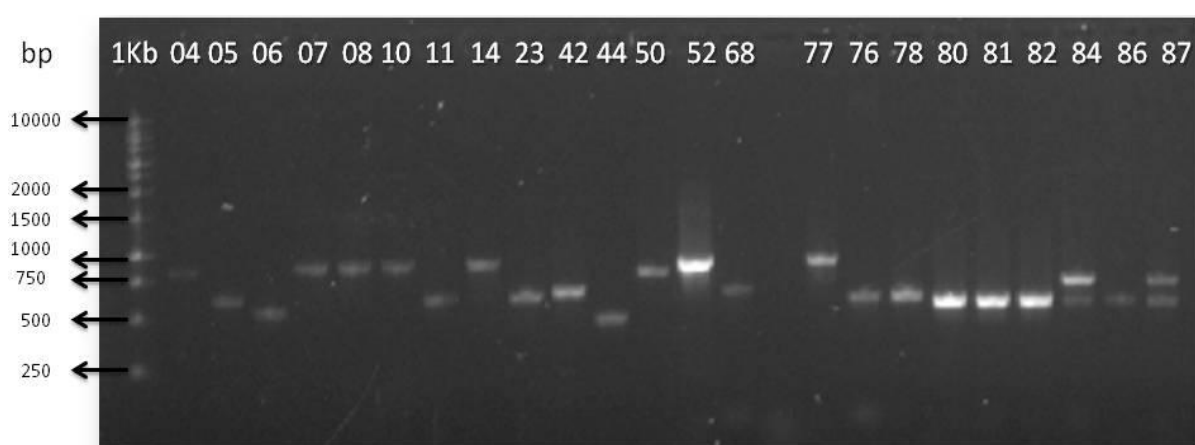


Figura 4. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR das linhagens de leveduras selecionadas. 1Kb – marcador molecular, os números correspondem número do código de identificação dos Agentes de Controle Biológico Levedura – ACBL.

Os resultados mostraram que os isolados ACBL-04, ACBL-07, ACBL-08, ACBL-10, ACBL-14, ACBL-50, ACBL-52 e ACBL-77, apresentaram região ITS do rDNA entre 750 a 1000 bp (Figura 4). O isolado de levedura ACB-K1 foi identificado, através do material genético em estudos preliminares realizados por Fialho et al. (2010), como *Saccharomyces cerevisiae*. No presente estudo, cinco isolados de levedura (ACBL-50, ACBL-76, ACBL-80, ACBL-81 e ACBL-82) foram identificados como pertencentes ao Gênero *Saccharomyces* sp., sendo que destes a maioria foi identificado como pertencente à espécie *S. cerevisiae*, apresentando colônias com bordas e superfície lisas, opacas, com coloração creme e sem filamentos (Figura 1-E e Figura 2-A, C, D, E e F).

Seis isolados de levedura (ACBL-04, ACBL-06, ACBL-07, ACBL-08, ACBL-10 e ACBL-84) foram identificados como pertencentes à espécie de *Candida stellimalicola*, os quais apresentaram colônias com bordas irregulares, com superfície lisa e fosca, e coloração branco/creme, opaca e sem filamentos (Figura 2-F, Figura 3-A, C, D, E e F). Outro fato importante a ser ressaltado, é de que dentre os seis isolados identificados como *C. stellimalicola*, cinco foram selecionados pelos testes de antagonismo à *P. italicum* (Figura 3), e obtidos de amostras retiradas do mesmo local, na cidade de Leme/SP e da mesma variedade de *Citrus* spp. (Laranja Pêra), o que poderia explicar o fato da maioria dos isolados pertencer à mesma espécie.

Os isolados ACBL-05, ACBL-06, ACBL-11, ACBL-23, ACBL-42, ACBL-44, ACBL-68, ACBL-76, ACBL-78, ACBL-80, ACBL-81 e ACBL-82, apresentaram reação ITS entre 500 a 750 bp (Figura 4). O isolado ACBL-14 foi identificado como pertencente ao Gênero *Cryptococcus* sp., sendo que o isolado foi muito similar as espécies *C. nemorosus* e *C. perniciosus*, apresentando colônia com borda irregular, com superfície lisa de coloração branca e opaca, sem filamentos (Figura 3-H). O agente de controle biológico ACBL-44 foi identificado através das sequências obtidas dos amplicons da região 5.8S, como *Rhodotorula mucilaginosa*; o qual apresentou colônia com bordas irregulares, lisas, com coloração creme e sem filamentos (Figura 1-C).

O ACBL-77, selecionado pelos testes com *G. candidum*, foi identificado através do material genético, como *Sporobolomyces koalae*, apresentando colônias com bordas irregulares, com superfície lisa e brilhante, coloração roxa, e filamentos na base (Figura 1-G), já o isolado de levedura ABL-86, selecionado pelos testes *in vivo* para controle de *P. digitatum*, foi identificado como *Meyerozyma caribbica*, com colônias com borda irregular, superfície opaca, coloração creme e ausência de filamentos (Figura 2-G).

Entretanto, para oito isolados (ACBL-05, ACBL-11, ACBL-23, ACBL-42, ACBL-52, ACBL-68, ACBL-78 e ACBL-87) o sequenciamento, a partir dos amplicons obtidos, não obteve sucesso. Possivelmente pode ter ocorrido algum problema durante a purificação a partir do gel de agarose, ou até mesmo uma contaminação com os *primers* utilizados na reação de amplificação, sendo assim necessária a

repetição deste ensaio para estes isolados testando diferentes métodos de purificação dos amplicons, além de diferentes quantidades de DNA purificado utilizados para a reação de sequenciamento.

A identificação de leveduras através da amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA é empregada em diversos estudos. Em estudos realizados por Droby et al. (1999), leveduras isoladas da superfície de uvas, foram identificadas através da amplificação da região ITS e sequenciamento dos amplicons resultantes. Para comprovar a identidade da levedura *Pichia membranifaciens*, Masih et al. (2001) amplificaram a região ITS do rDNA, realizando o sequenciamento deste fragmento, sendo a sequência comparada à outras do banco de dados GenBank. Leveduras epífitas de uvas, foram identificadas em estudos realizados por Bleve et al. (2006), os quais avaliaram também polimorfismos da região ITS através da digestão dos amplicons por enzimas de restrição para agrupar os isolados, seguindo-se o sequenciamento desta região. Para identificar leveduras isoladas de cana-de-açúcar, Rosa-Magri et al. (2011), utilizaram sequências obtidas através da purificação de amplicons da região ITS.

No presente estudo, dos 24 isolados de leveduras selecionados pelos testes de antagonismo à *G. candidum*, *P. digitatum* e *P. italicum*, seis isolados (ACBL-04, ACBL-06, ACBL-07, ACBL-08, ACBL-10 e ACBL-84) foram identificados como pertencentes à espécie de *Candida stellimalicola*, cinco isolados (ACBL-50, ACBL-76, ACBL-80, ACBL-81 e ACBL-82) foram identificados como pertencentes ao Gênero *Saccharomyces* sp., e quatro isolados, ACBL-14, ACBL-44, ACBL-77 e ACBL-86, pertencem à grupos diferentes da maioria dos isolados identificados, sendo estes identificados como *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*; *Sporobolomyces koalae* e *Meyerozyma caribbica*, respectivamente.

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, conclui se que:

- Dois Gêneros (*Candida* e *Saccharomyces*) foram predominantes entre os agentes de controle biológico, sendo que apenas quatro isolados, dos 16 que foram identificados, pertencem à gêneros diferentes.

5. REFERÊNCIAS

- 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**, v.108, p.204-209, 2006.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, San Diego, v. 42, p. 326–335, 2007.
- COLWEEL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v.104, n.1, p. 410-433, 1970.
- DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHAND-GOYAL, T.; ECKERT, J. W.; MANULIS, S. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. **Biol. Control**, v.16, p.27-34, 1999.
- FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60p. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- GADANHO, M.; SAMPAIO, J.P.; SPENCER-MARTINS, I. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*: *R. azoricum* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n.3, p. 213-221, 2001.
- 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.
- MONTES, M.J.; BELLOCH, C.; GALIANA, M.; GARCIA, M.D.; ANDRÉS, C.; FERRER, S.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M.; GUINEA, J. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus*

victoriae sp. Nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, n.1, p. 97-105, 1999.

RIBEIRO, J.R.A. **Diversidade e Ecofisiologia de leveduras em plantio orgânico de cana-de-açúcar**. Tese (doutorado), Universidade Federal Rural, Rio de Janeiro, 167 f., 2009.

ROSA-MAGRI, M.M.; TAUK-TORNISIELO, S.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds, Braz. **Arch. Biol. Technol.** v.54 n. 1: pp. 1-5, 2011.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND; D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1994. p. 315-321.

APÊNDICE

RESULTADO DO BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) DOS ISOLADOS DE LEVEDURA SELECIONADOS PELOS TESTES DE ANTAGONISMO

Isolado ACBL-04 Query ID - |cl|109832

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Fungal sp. LL11 111 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, part	544	544	99%	3e-151	96%	KF057603.1
Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14	544	544	100%	3e-151	96%	FM199968.1
Candida stellimalicola strain YD124 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	518	518	100%	2e-143	94%	JQ927545.1
Candida stellimalicola strain YD121 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s	518	518	100%	2e-143	94%	JQ927544.1
Candida stellimalicola strain LL11 154 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete s	475	475	99%	1e-130	92%	KF057735.1
Candida stellimalicola voucher ITV118 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcrib	324	324	59%	5e-85	96%	KC765121.1
Kazachstania naqanishii CBS 8797 chromosome 1, complete genome	263	526	51%	1e-66	94%	HE978314.1
Kazachstania sp. CBS 11951 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed space	263	263	51%	1e-66	94%	JF813190.1
Kluveromyces sinensis internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, p	263	263	51%	1e-66	94%	AY046167.1
Saccharomyces naqanishii 18S ribosomal RNA, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, 26S ribosomal RNA, partial and complete sequence	263	263	51%	1e-66	94%	AB097398.1
Torulaspora delbrueckii partial 5.8S rRNA gene, strain ZIM 2458, isolate B5/II/12	254	254	51%	6e-64	93%	HE660080.1
Kluveromyces nonfermentans isolate L10A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal trar	254	254	51%	6e-64	93%	FJ713088.1
Kluveromyces nonfermentans internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spa	254	254	51%	6e-64	93%	AY046211.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	254	254	51%	6e-64	93%	AB012264.1
Kluveromyces nonfermentans gene for 5.8S rRNA, complete sequence	254	254	51%	6e-64	93%	AB011512.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	254	254	51%	6e-64	93%	AB011510.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	254	254	51%	6e-64	93%	AB011509.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	254	254	51%	6e-64	93%	AB011508.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	254	254	51%	6e-64	93%	AB011507.1

Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14

Sequence ID: [emb|FM199968.1](#) Length: 518 Number of Matches: 1

Range 1: 122 to 460 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
544 bits(294)	3e-151	325/340(96%)	2/340(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCTITGCAGAGATGCCGTCGTCGCTTG-CAACTCTGTAAGGACGTTCCCTATGACAITTGCT	59		
Sbjct 460				
Query 60	GCGTGGCGCTTTACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTCGTGTACCTGTGT	119		
Sbjct 401				
Query 120	TTTAGAGGAGTGCCAGACTTCCCCCACCACAAAACACTACCGCTTTGAGAAGGCAACGACG	179		
Sbjct 341				
Query 180	CTCAAACAGGCATGCCCGCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATG	239		
Sbjct 281				
Query 240	ACTCACGAAAATCTGCAATTTCGCAATTACGTATCGCAATTGCGTTCCTTTCATCGATGA	299		
Sbjct 221				
Query 300	TAGCACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATTTATA 339			
Sbjct 161				
	GAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATTTATA 122			

Isolado ACBL-06 Query ID - Icl|109831

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Fungal sp. LL11 111 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, parti	357	357	96%	5e-95	98%	KF057603.1
Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14	357	357	96%	5e-95	98%	FM199968.1
Candida stellimalicola strain YD124 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	333	333	93%	8e-88	97%	JQ927545.1
Candida stellimalicola strain YD121 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s	333	333	93%	8e-88	97%	JQ927544.1
Candida stellimalicola strain LL11 154 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete s	296	296	93%	1e-76	94%	KF057735.1
Candida stellimalicola voucher ITV118 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcrib	135	135	36%	2e-28	97%	KC765121.1
Kluveromyces polysporus internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2	86.1	86.1	25%	2e-13	95%	AY046182.1
Kluveromyces polysporus 5.8S gene and ITS1 and ITS2 (strain CBS 2163)	86.1	86.1	25%	2e-13	95%	AJ229076.1
Candida sp. Z8Y15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28	82.4	82.4	20%	3e-12	100%	JF781425.1
Saccharomyces sp. 3AD23 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer;	82.4	82.4	20%	3e-12	100%	DQ646696.1
Saccharomyces sp. 3AD15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer;	82.4	82.4	20%	3e-12	100%	DQ646695.1
Saccharomyces sp. 1AD8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2,	82.4	82.4	20%	3e-12	100%	DQ646694.1
Zygosaccharomyces rouxii strain LL12_088 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, con	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	KF057681.1
Zygosaccharomyces rouxii strain ATCC 28252 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	KC881077.1
Zygosaccharomyces rouxii strain ATCC 56076 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	KC881078.1
Zygosaccharomyces rouxii strain ATCC 28253 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	KC146358.1
Kazachstania naqanishii CBS 8797 chromosome 1, complete genome	80.5	161	25%	1e-11	93%	HE978314.1
Uncultured fungus clone MAD11GadID 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trar	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	JN890088.1
Uncultured fungus clone MAD06GadID 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trar	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	JN890083.1
Uncultured fungus clone MAC10GadID 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trar	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	JN890076.1
Zygosaccharomyces rouxii genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain CBS4838_copy1	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	HE664093.1
Zygosaccharomyces rouxii genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain CBS4838_copy2	80.5	80.5	25%	1e-11	93%	HE664091.1

Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14

Sequence ID: [emb|FM199968.1](#) Length: 518 Number of Matches: 1

Range 1: 245 to 452 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
357 bits(193)	5e-95	203/208(98%)	0/208(0%)	Plus/Minus
Query 8	AGATGCCGTC	TCGCTTGCCAACAAATGAAAAGACGTTCCCTTAAACATTGCAGCGTGCCT		67
Sbjct 452	AGATGCCGTC	TCGCTTGCCAACAAATGAAAAGGACGTTCCCTTAAGACATTGCAGCGTGCCT		393
Query 68	AAACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTCGTGTACCTGTGTTTTAGTGGA			127
Sbjct 392	AAACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTCGTGTACCTGTGTTTTAGGGGA			333
Query 128	GTGCCAGACTTCCCCACCACCAAACTACCGCTTTGATAAGGTAACGACGCTCAAACAG			187
Sbjct 332	GTGCCAGACTTCCCCACCACCAAACTACCGCTTTGAGAAGGTAACGACGCTCAAACAG			273
Query 188	GCA TGCCCCCGGAATACCAAGGGGCGC		215	
Sbjct 272	GCA TGCCCCCGGAATACCAAGGGGCGC		245	

Isolado ACBL-07 Query ID - Icl|109830

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14	793	793	98%	0.0	97%	FM199968.1
Candida stellimalicola strain YD124 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	774	774	99%	0.0	96%	JQ927545.1
Candida stellimalicola strain LL11_154 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	706	706	97%	0.0	94%	KF057735.1
Candida stellimalicola strain YD121 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	701	701	87%	0.0	97%	JQ927544.1
Fungal sp. LL11_111 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	610	610	84%	3e-171	94%	KF057603.1
Candida stellimalicola voucher ITV118 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	451	451	55%	2e-123	97%	KC765121.1
Candida stellimalicola voucher ITV116 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	315	315	45%	3e-82	93%	KC765120.1
Kazachstania naganishii CBS 8797 chromosome 1, complete genome	285	571	36%	2e-73	96%	HE978314.1
Kazachstania sp. CBS 11951 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	285	285	36%	2e-73	96%	JF813190.1
Kluveromyces sinensis internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	285	285	36%	2e-73	96%	AY046167.1
Saccharomyces naganishii 18S ribosomal RNA, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, 26S ribosomal RNA, partial and complete sequence	285	285	36%	2e-73	96%	AB097398.1
Torulaspora delbrueckii partial 5.8S rRNA gene, strain ZIM 2458, isolate B5/II/12	276	276	36%	1e-70	95%	HE660080.1
Kazachstania sp. QMW-2009a strain TATR11-1 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	276	276	37%	1e-70	94%	GQ181169.1
Kluveromyces nonfermentans isolate L10A internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	FJ713088.1
Kluveromyces nonfermentans internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	AY046211.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	AB012264.1
Kluveromyces nonfermentans gene for 5.8S rRNA, complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	AB011512.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	AB011510.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	AB011509.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	AB011508.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	276	276	36%	1e-70	95%	AB011507.1

Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14

Sequence ID: [emb|FM199968.1](#) Length: 518 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 464 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
793 bits(429)	0.0	461/474(97%)	11/474(2%)	Plus/Minus
Query 1	TCGAGCTTGCAGAGATGCCGTCTCGCTTTGCC-ACAATGAAAAGGACGTTCCCTTAAGGAC	59		
Sbjct 464	TCGAGCTTGCAGAGATGCCGTCTCGCTT-GCCAAACAATG-AAAGGACGTTCCCTTAAG-AC	408		
Query 60	ATTGCAGCGTGCCTAAACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTCGTGTAC	119		
Sbjct 407	ATTGCAGCGTGCCTAAACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTCGTGTAC	348		
Query 120	CTGTGTTTTAGAGGAGTGCCAGACTTCCCCCACCACCAAACTACCGCTTTGAGAAGGTA	179		
Sbjct 347	CTGTGTTTTAGGGGAGTGCCAGACTTCCCCCACCACCAAACTACCGCTTTGAGAAGGTA	288		
Query 180	ACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT	239		
Sbjct 287	ACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT	228		
Query 240	TCGATGACTCACGAAAATCTGCAATTCGCATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTCAT	299		
Sbjct 227	TCGATGACTCACGAAAATCTGCAATTCGCATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTCAT	168		
Query 300	CGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATTTATATCAAGTATGACAAA	359		
Sbjct 167	CGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATTTATATCAAGTATGACAA-	109		
Query 360	TCAGTTTCGGTTTACAGAGTTTATGTTTAAACATCTCACACGTTAGACGGTGTGCGGCA	419		
Sbjct 108	TCAGTTTCGGTTTACAGAGTTTATGTTTAA-CATCTCACATGTTGTTAGACGGTGTGCGGCA	51		
Query 420	AGCTTAAGACGCAGACAAATCAATAATGATCCCTTCCGCGAGTTACCTACGGA	473		
Sbjct 50	-GCT-AAG-CGCAGACAAATCAATAATGATCC-TTCCGCGAGTTACCTACGGA	1		

Isolado ACBL-08 Query ID - Icl|109829

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Fungal sp. LL11 111 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial	176	176	100%	1e-40	85%	KF057603.1
Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14	171	171	100%	7e-39	84%	FM199968.1
Candida stellimalicola strain YD124 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial	158	158	92%	5e-35	84%	JQ927545.1
Candida stellimalicola strain YD121 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	158	158	92%	5e-35	84%	JQ927544.1

Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14

Sequence ID: [emb|FM199968.1](#) Length: 518 Number of Matches: 1

Range 1: 279 to 454 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
171 bits(92)	7e-39	150/178(84%)	4/178(2%)	Plus/Minus
Query 1	AGATATGCAGACGTCGATTG-CAACTATGTAAGGACGTTCCCTTAAGACATTGCTGCGTGA	59		
Sbjct 454	AGAGATGCCGTC-TCGCTTGCCAACAATGAAAGGACGTTCCCTTAAGACATTGACGCGTGC	396		
Query 60	CATTACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCCGTGTGAGGACCTGTGTTTTAGA	119		
Sbjct 395	GCTAAACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTGCTGTACCTGTGTTTTAGG	336		
Query 120	GGAGTGCACCGACATCCCCACGCCCAAACTACCGCTTTGAGAAGC-AACGACCCTC	176		
Sbjct 335	GGAGTGC-CAGACTTCCCCACCACCAAACTACCGCTTTGAGAAGGTAACGACGCTC	279		

Isolado ACBL-10 Query ID - ICI|109828

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Fungal sp. LL11 111 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, parti	460	460	88%	4e-126	91%	KF057603.1
Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14	459	539	100%	1e-125	91%	FM199968.1
Candida stellimalicola strain YD124 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	433	519	100%	8e-118	90%	JQ927545.1
Candida stellimalicola strain YD121 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete se	433	433	88%	8e-118	90%	JQ927544.1
Candida stellimalicola strain LL11_154 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete se	390	469	99%	5e-105	88%	KF057735.1
Candida stellimalicola voucher ITV118 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribe	250	250	49%	8e-63	91%	KC765121.1
Kluveromyces nonfermentans isolate L10A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal trans	206	206	43%	2e-49	89%	FJ713088.1
Kluveromyces aestuarii strain ZH9-(6) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	206	206	43%	2e-49	89%	FJ487943.1
Kluveromyces nonfermentans internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spac	206	206	43%	2e-49	89%	AY046211.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	206	206	43%	2e-49	89%	AB012264.1
Kluveromyces nonfermentans gene for 5.8S rRNA, complete sequence	206	206	43%	2e-49	89%	AB011512.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	206	206	43%	2e-49	89%	AB011510.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	206	206	43%	2e-49	89%	AB011509.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	206	206	43%	2e-49	89%	AB011508.1
Kluveromyces nonfermentans genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA, partial and complete sequence	206	206	43%	2e-49	89%	AB011507.1
Lachancea sp. MC-SPC2(7) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2	204	204	44%	7e-49	88%	FJ666085.1
Hollelya sinecauda 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacers 1 and 2, complete sequence	204	204	43%	7e-49	88%	U51435.1
Ashbya gossypii strain HA88 internal transcribed spacer 1 (ITS1) and 2 (ITS2) and 5.8S rRNA gene, complete sequence	202	202	45%	2e-48	88%	U09322.1
Saccharomycetaceae sp. 'Ashbya acari' chromosome VII, complete sequence	200	200	43%	8e-48	88%	CP006026.1
Kluveromyces sp. HF12172 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed sp	200	200	43%	8e-48	88%	JQ863227.1
Ashbya gossypii FDAG1 chromosome VII, complete sequence	200	8423	43%	8e-48	88%	CP002711.1

Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14

Sequence ID: [emb|FM199968.1|](#) Length: 518 Number of Matches: 2

Range 1: 123 to 463 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
459 bits(248)	1e-125	312/343(91%)	4/343(1%)	Plus/Minus
Query 1	CGAGCTTGCGAGAGATGCCGTCGCTCGCTTG-CAACTATGAAAGGACGTTCCCTTATGACATT			59
Sbjct 463	CGAGCTTGCGAGAGATGCCGTC-TCGCTTGCCAACAATGAAAGGACGTTCCCTTAAGACATT			405
Query 60	GCTGCGAGCGCTTTACAACACCCACTACTACTACAACAGCTCCGGTGTGAGTACCTG			119
Sbjct 404	GCAGCGTGCCTAAACAAACACCCACTACTACTACAACAGCTCCGCTGTGAGTACCTG			345
Query 120	TGTTTTAGAGTAGTGCCCGACTTCCGCCTCGAACAAAACACTACCGCTTTGAGAAGGCAACG			179
Sbjct 344	TGTTTTAGGGGAGTGCCAGACTTCCCGCCACCAAAAACACTACCGCTTTGAGAAGGTAACG			285
Query 180	ACGCTCCAACGGGCATGCTGCCAGTAATACCAGGGTGCAGCAATGTGCGCGCCAAAGATT			239
Sbjct 284	ACGCTCAAACAGGCATGCCCGCGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGG-TTCAAAGATT			226
Query 240	GATGACTCAGAAAATCTGCAATTCGCATTACGTAICGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCG			299
Sbjct 225	GATGACTCAGAAAATCTGCAATTCGCATTACGTAICGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCG			166
Query 300	ATGCAAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAGGTTT-AAATTTAT			341
Sbjct 165	ATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATTTAT			123

Isolado ACBL-14 Query ID - Icl|109827

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cryptococcus sp. CBS 8363 18S ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	850	850	96%	0.0	97%	AF444390.1
Cryptococcus sp. UFMG-BRO506 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	832	832	97%	0.0	96%	JX268527.1
Cryptococcus nemorosus ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain IMUFRJ 52000	830	830	95%	0.0	96%	FN428910.1
Cryptococcus sp. LRB-2012b strain UFMG LR2.04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	817	817	92%	0.0	97%	KC193600.1
Cryptococcus sp. S5-2 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA, partial sequence	802	896	97%	0.0	95%	JN581131.1
Cryptococcus periculosus strain VKM Y-2905 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	798	798	93%	0.0	96%	AF472627.1
Cryptococcus nemorosus ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain IMUFRJ 52003	782	782	97%	0.0	94%	FN428944.1
Cryptococcus nemorosus ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain IMUFRJ 51999	776	776	97%	0.0	94%	FN428883.1
Cryptococcus nemorosus strain VKM Y-2905 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	774	774	93%	0.0	95%	AF472628.1
Uncultured soil fungus clone 137-64 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	771	771	97%	0.0	94%	DQ421212.1
Cryptococcus nemorosus ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain IMUFRJ 52001	769	769	97%	0.0	94%	FN428918.1
Papillotrema bandonii strain CBS9107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	763	763	97%	0.0	94%	GU327539.1
Cryptococcus sp. LCF-08 strain NN9L04 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	739	739	87%	0.0	96%	HQ623590.1
Cryptococcus sp. LCF-08 strain GE20L02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	739	739	87%	0.0	96%	HQ623588.1
Cryptococcus sp. SJ10L03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	739	739	87%	0.0	96%	FJ153167.1
Cryptococcus sp. FN18L03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	734	734	87%	0.0	95%	FJ153166.1
Cryptococcus nemorosus ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain IMUFRJ 52002	726	726	92%	0.0	94%	FN428919.1
Cryptococcus sp. LCF-08 strain NF3L08 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence	725	725	87%	0.0	95%	HQ623589.1

Cryptococcus sp. CBS 8363 18S ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA, partial sequence

Sequence ID: [gb|AF444390.1](#) Length: 555 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 506 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
850 bits(460)	0.0	500/517(97%)	12/517(2%)	Plus/Minus
Query 15	TGAGGTCAGAGTCAAA-CAGTGTGGCACACGAGGCCAAAAGCGGTGTTCTCGAGCAGGCT			73
Sbjct 506	TGAGGTCAGAGTCAAAAAGTGT-GCACA-GAGGC--AAGCGGTGTTCT-GAGCAGGCT			452
Query 74	TGACGCACGCAAGGGACAAGACGAAACTTATTACGTCTGTACGGATGCTAGCGATCCCA			133
Sbjct 451	TGACGCACGCAAGGGACAAGACGAAACTTATTACGTCTGTACGGATGCTAGCGATCCCA			392
Query 134	CTAAGTCATTTGAGGCGAGCCGTGTAACCGGCAGACGCCCATGTCCAAGCCCCGACTGAT			193
Sbjct 391	CTAAGTCATTTGAGGCGAGCCGTGTAACCGGCAGACGCCCAAGTCCAAGCCCCAAGTGA			332
Query 194	CATAAACCAGATGGGGTTGAGATTTCCATGACACTCAAACAGGCATGCCTTTTCGGAATAC			253
Sbjct 331	CATAAACCAGATGGGGTTGAGATTTT-ATGACACTCAAACAGGCATGCCTTTTCGGAATAC			273
Query 254	CAAAAGGCGCAAGGTGCGTTTCAAAGATTGATGATTCACTGGAATTCTGCAATTCACAT			313
Sbjct 272	CAAAAGGCGCAAGGTGCGTTTCAAAGATTGATGATTCACTG-AATTCTGCAATTCACAT			215
Query 314	TACTTATCGCAITTCGCTGCGTTCITCATCGATGCGAGGCCAAGAGATCCGTTGTATAA			373
Sbjct 214	TACTTATCGCAITTCGCTGCGTTCITCATCGATGCGAGGCCAAGAGATCCGTTGTATAA			155
Query 374	AGTTTTGTTTTTGTAAAGATAACAAGACGTTCACTACTTGATGTTTGTATAGTTTTGT			433
Sbjct 154	AGTTTTGTTTTTGTAAAGATAACAAGACGTTCACTACT-GATGTTTGTATAGTTT-GT			97
Query 434	TAGACCCGGAGGTCAAACGGTTCACAGAGGTGAGGGAAGTTAAAGATAGGACCTTTCGGT			493
Sbjct 96	TAGACCCGGAGGTCAAACGGTTCACAGAGGTGAGGATGTTAA-GATAAGACCTTTCGGT			38
Query 494	CAATCATTAAATGATCCITCCGCAGGTTACCTACGGA 530			
Sbjct 37	CAATCATTAAATGATCCITCCGCAGGTTACCTACGGA 1			

Isolado ACBL-44 Query ID - Icl|109826

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rhodotorula mucilaginosa strain ATCC 4054 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	750	750	97%	0.0	99%	KC881069.1
Rhodotorula sp. IIP33 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	750	750	97%	0.0	99%	KF313359.1
Rhodotorula mucilaginosa strain ATCC 4054 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	750	750	97%	0.0	99%	KC601851.1
Rhodotorula mucilaginosa strain Sc13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	750	750	97%	0.0	99%	KC515367.1
Rhodotorula mucilaginosa isolate PKU Y1 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, an	750	750	97%	0.0	99%	KC113304.1
Rhodotorula mucilaginosa strain IMB139_2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, compl	750	750	97%	0.0	99%	KC349929.1
Rhodotorula mucilaginosa voucher AF3-101B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	750	750	97%	0.0	99%	JX967104.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	750	750	97%	0.0	99%	JX499189.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 467 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	750	750	97%	0.0	99%	JX512683.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 3201 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	750	750	97%	0.0	99%	JX512712.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 10amb 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	750	750	97%	0.0	99%	JX272796.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 740 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	750	750	97%	0.0	99%	JX512687.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 2675 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	750	750	97%	0.0	99%	JX512701.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 2595 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	750	750	97%	0.0	99%	JX512700.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 2495 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	750	750	97%	0.0	99%	JX512698.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 2334B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	750	750	97%	0.0	99%	JX512696.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 2413 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	750	750	97%	0.0	99%	JX512697.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 2265 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	750	750	97%	0.0	99%	JX512695.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 15amb 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	750	750	97%	0.0	99%	JX494372.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 1385 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	750	750	97%	0.0	99%	JX512692.1
Rhodotorula mucilaginosa strain LEMI 755 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	750	750	97%	0.0	99%	JX512688.1

Rhodotorula mucilaginosa strain ATCC 4054 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [gb|KC881069.1](#) Length: 609 Number of Matches: 1

Range 1: 138 to 554 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
750 bits(406)	0.0	415/419(99%)	2/419(0%)	Plus/Minus
Query 10	ATGTAGATTTTCTGATTAGAAGCTTCCTTTAACCCAACCCGGCTCTAGTCCGAAGACTAG	69		
Sbjct 554	ATGTAGACATTCTGATTAGAAGCTTCCTTTAACCCAACCCGGCTCTAGTCCGAAGACTAG	495		
Query 70	AATTCCTCAGCGAATAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCGAAGTTCGATTGCGGATGCTAA	129		
Sbjct 494	AATTCCTCAGCGAATAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCGAAGTTCGATTGCGGATGCTAA	435		
Query 130	TGCATTACGAACGAGCTAGACCGTAAAGGCCAGCAGCGCTCAGAAACCAACACCTCTTC	189		
Sbjct 434	TGCATTACGAACGAGCTAGACCGTAAAGGCCAGCAGCGCTCAGAAACCAACACCTCTTC	375		
Query 190	AATCATTAAAGAAAGAGGAGGTTGAAGTATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCACGG	249		
Sbjct 374	AATCATTAAAGAAAGAGGAGGTTGAAGTATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCACGG	315		
Query 250	AATACCATGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCA	309		
Sbjct 314	AATACCATGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCA	255		
Query 310	CATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCAICGATGCGAGAGCCAAAGATCCGTTGTT	369		
Sbjct 254	CATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCAICGATGCGAGAGCCAAAGATCCGTTGTT	195		
Query 370	TGAAAGTTTTATTTTGTATAAAAAATTAATACATTCATAGACTTTGTGTTTATAAGTG	428		
Sbjct 194	-GAAAGTTTTATTTTGTATAAAAA-TTAAATACATTCATAGACTTTGTGTTTATAAGTG	138		

Isolado ACBL-50 Query ID - Icl|109841

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomyces sp. 98c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC834825.1
Saccharomyces sp. 96c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC834824.1
Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP_12	769	769	98%	0.0	95%	AB830591.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-40 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC544484.1
Saccharomyces cerevisiae strain JN35 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC342940.1
Saccharomyces cerevisiae strain JN31 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC342936.1
Saccharomyces cerevisiae strain JN27 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC342932.1
Saccharomyces cerevisiae strain JN8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC342913.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC515376.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC515365.1
Saccharomyces cerevisiae strain W28 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC588953.1
Saccharomyces cerevisiae strain W46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC588952.1
Saccharomyces cerevisiae strain W13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC542799.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4900 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC113638.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4899 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC113637.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:14280 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC254081.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:13357 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC254080.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:13182 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC254079.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:13166 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC254078.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:11907 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC254077.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:11334 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC254076.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:10839 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 1, partial sequence	769	769	98%	0.0	95%	KC254075.1

Saccharomyces sp. 98c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KC834825.1|](#) Length: 776 Number of Matches: 1

Range 1: 266 to 746 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
769 bits(416)	0.0	461/483(95%)	2/483(0%)	Plus/Minus
Query 10	CTCACTGCTCTTATGCGAGAACGTTTCATGTACGGTCAGGCTGGGAAAAGATTAGCCGCGGT	69		
Sbjct 746	CTCTCT-TCCTTAT-CGATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAAGATTAGCCGCAGT	689		
Query 70	TGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCCTTATACCTCAAGCAGCAGAGAAACCTCTCT	129		
Sbjct 688	TGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCAGCAGAGAAACCTCTCT	629		
Query 130	TTGGAaaaaaaCATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATCA	189		
Sbjct 628	TTGGAaaaaaaCATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATCA	569		
Query 190	CTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGA	249		
Sbjct 568	CTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGA	509		
Query 250	ATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCAC	309		
Sbjct 508	ATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCAC	449		
Query 310	ATTACGATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG	369		
Sbjct 448	ATTACGATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG	389		
Query 370	AAAGTTTTTAATATTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTCCTTGCTTTTGACAAAAATTTA	429		
Sbjct 388	AAAGTTTTTAATATTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTCCTTGCTTTTGACAAAAATTTA	329		
Query 430	ATGAATAGATAAGATTGTTTGTGTGTGTACCTCTGGGCCCGGATTGCTCGAATGACAAA	489		
Sbjct 328	ATGAATAGATAAAAATTGTTTGTGTGTGTACCTCTGGGCCCGGATTGCTCGAATGACAAA	269		
Query 490	AGA 492			
Sbjct 268	AGA 266			

Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP 12

Sequence ID: [dbj|AB830591.1](#) Length: 789 Number of Matches: 1

Range 1: 234 to 714 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
769 bits(416)	0.0	461/483(95%)	2/483(0%)	Plus/Minus
Query 10	CTCACTGTCTTATGCGAGAACGTTTCATGTACGGTCAGGCTGGGAAAAGATTAGCCGCGGT			69
Sbjct 714	CTCTCT-TCTTAT-CGATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGATTAGCCGCGGT			657
Query 70	TGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCCTTATAACCTCAAGCACGCAGAGAAAACCTCTCT			129
Sbjct 656	TGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATAACCTCAAGCACGCAGAGAAAACCTCTCT			597
Query 130	TTGGaaaaaaaaCATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATCA			189
Sbjct 596	TTGGAAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATCA			537
Query 190	CTCACTACCAAACAGAAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGA			249
Sbjct 536	CTCACTACCAAACAGAAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGA			477
Query 250	ATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCTGAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCAC			309
Sbjct 476	ATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCAC			417
Query 310	ATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG			369
Sbjct 416	ATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG			357
Query 370	AAAGTTTTTAATATTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTCCTTGCTTTTGACAAAAATTTA			429
Sbjct 356	AAAGTTTTTAATATTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTCCTTGCTTTTGACAAAAATTTA			297
Query 430	ATGAATAGATAAAGATTGTTTGTGTGTTACCTCTGGGCCCGATTGCTCGAATGACAAA			489
Sbjct 296	ATGAATAGATAAAAATGTTTGTGTGTTGTTACCTCTGGGCCCGATTGCTCGAATGCCCAA			237
Query 490	AGA 492			
Sbjct 236	AGA 234			

Isolado ACBL-76 Query ID - Icl|109840

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured eukarvot clone N707T_35 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA	732	732	97%	0.0	95%	GU942356.1
Uncultured eukarvot clone N104T_301 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RN	732	732	97%	0.0	95%	GU941216.1
Saccharomyces cerevisiae strain B1M 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	730	730	97%	0.0	94%	JF715198.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC 18824 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	726	726	97%	0.0	94%	KC881067.1
Saccharomyces sp. 98c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	726	726	97%	0.0	94%	KC834825.1
Saccharomyces sp. 96c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	726	726	97%	0.0	94%	KC834824.1
Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP 225	726	726	97%	0.0	94%	AB830593.1
Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP 12	726	726	97%	0.0	94%	AB830591.1
Saccharomyces cerevisiae voucher ITV138 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcri	726	726	97%	0.0	94%	KC785126.1
Saccharomyces cerevisiae voucher ITV131 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	726	726	97%	0.0	94%	KC785124.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-40 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, cy	726	726	97%	0.0	94%	KC544484.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	726	726	97%	0.0	94%	KC515376.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	726	726	97%	0.0	94%	KC515365.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc07 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	726	726	97%	0.0	94%	KC515361.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	726	726	97%	0.0	94%	KC515356.1
Saccharomyces cerevisiae strain W28 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed;	726	726	97%	0.0	94%	KC588953.1
Saccharomyces cerevisiae strain W46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	726	726	97%	0.0	94%	KC588952.1
Saccharomyces cerevisiae strain W13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed;	726	726	97%	0.0	94%	KC542799.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4900 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,	726	726	97%	0.0	94%	KC113638.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4899 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,	726	726	97%	0.0	94%	KC113637.1
Saccharomyces cerevisiae genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, culture collection ZIM:2447, isolate ZG7-Y178	726	726	97%	0.0	94%	HF545670.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC 46740 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	726	726	97%	0.0	94%	JX094776.1

Saccharomyces cerevisiae strain B1M 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|JF715198.1|](#) Length: 741 Number of Matches: 1

Range 1: 42 to 519 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
730 bits(395)	0.0	451/478(94%)	3/478(0%)	Plus/Plus
Query 11	AGAGCTTTTACTGTCTTAGAAGA-AAGAGATGGAGAGI-CAGCCGGGACTGCGCTTAAGT	68		
Sbjct 42	AGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGT	101		
Query 69	GCGCGGGCTTGCTAGGCTTGTCTAGTATCTTTCTTGCTATTCCTCAACCGGTGAGAGATTTCT	128		
Sbjct 102	GCGCGGCTTGCTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTGCTATTCCTCAACCGGTGAGAGATTTCT	161		
Query 129	GTGCTTTTGTAAAGGACAATTAACCGGCTTCAATACAACACACTGTGGAGATTTTATA	188		
Sbjct 162	GTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGGCTTCAATACAACACACTGTGGAGATTTTATA	221		
Query 189	TCTTTGCAACTTTTTCATTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGGAACAACACAGA	248		
Sbjct 222	TCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAACACAAA	281		
Query 249	CAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTG-AAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTT	307		
Sbjct 282	CAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTGCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTT	341		
Query 308	AAAATATTAATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC	367		
Sbjct 342	AAAATATTAATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC	401		
Query 368	GAAATGTGATACGTATTGAGAAATTCAGAAATTCGAGTATCATCGTATCTTTGAACGCAC	427		
Sbjct 402	GAAATGCGATACGTAAATGTGAAATTCAGAAATTCGAGTATCATCGAATCTTTGAACGCAC	461		
Query 428	ATTGCGCCCCTAGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTGTGAGCGTCAITTCCTTCTCACA	485		
Sbjct 462	ATTGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTGTGAGCGTCAITTCCTTCTCACA	519		

Isolado ACBL-77 Query ID - ICI|109839

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Sporobolomyces koalae strain ATCC MYA-4637 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	809	809	100%	0.0	96%	GU291280.1
Sporobolomyces koalae strain JCM15098 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	809	809	100%	0.0	96%	EU276010.1
Sporobolomyces koalae strain JCM15099 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	809	809	100%	0.0	96%	EU276009.1
Sporobolomyces koalae strain JCM 15063 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	809	809	100%	0.0	96%	EU276008.1
Uncultured Sporobolomyces isolate Kk-80-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	806	806	100%	0.0	96%	JQ90211.1
Sporobolomyces koalae isolate LH7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	798	798	100%	0.0	96%	HQ832829.1
Sporobolomyces sp. AL-S2 isolate AL-S2-9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	643	643	97%	0.0	91%	JN255418.1
Sporobolomyces camicolor strain MCA 3710 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	641	641	97%	1e-180	91%	JN942195.1
Sporobolomyces sp. YR-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	636	636	97%	5e-179	91%	JX205094.1
Uncultured Sporobolomyces clone M79 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	636	636	97%	5e-179	91%	HQ875447.1
Rhodotorula sp. SY-72 gene for 18S, 5.8S and 28S ribosomal RNA, strain:SY-72	636	636	97%	5e-179	91%	AB025982.1
Sporobolomyces camicolor 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	636	636	97%	5e-179	91%	AY069991.1
Sporobolomyces camicolor strain SL-94 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	630	630	97%	3e-177	91%	KC460888.1
Sporobolomyces camicolor strain SL-84 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	630	630	97%	3e-177	91%	KC460878.1
Sporobolomyces sp. AL-S2 isolate AL-S2-9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, and 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	630	630	90%	3e-177	92%	AY313077.1
Sporobolomyces phaffii strain AS 2.2137 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	627	627	97%	3e-176	91%	AY069995.1
Sporobolomyces phaffii strain AS 2.2243 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	627	627	97%	3e-176	91%	AY069994.1
Sporobolomyces pataonius strain CRUB 1043 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	627	627	85%	3e-176	93%	AY552329.1
Sporobolomyces pataonius strain CRUB 1038 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	627	627	85%	3e-176	93%	AY552328.1
Sporidiobolus paroseus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	627	627	85%	3e-176	93%	AY015429.1
Uncultured fungus clone 25F2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	625	625	100%	1e-175	90%	KC765966.1
Sporidiobolus paroseus strain J1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	621	621	85%	2e-174	93%	KF308684.1

Sporobolomyces koalae strain ATCC MYA-4637 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|GU291280.1|](#) Length: 610 Number of Matches: 1

Range 1: 80 to 571 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
809 bits(438)	0.0	485/505(96%)	14/505(2%)	Plus/Minus
Query 1	TTGAGATCGAATC-AGAGGTGAAACTTTTCATTTAGAAAGCTTCCTTGATAAAGTTCGCGC			59
Sbjct 571	TTGAGATCTAATCTAAAGGT-AGACTTTTCAATTAGAAAGCTTCCTTGATAAAGTT-G-GC			515
Query 60	TCCAGTAGTTAGCCACTGAATCCTTAGCGAATAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCAACT			119
Sbjct 514	T-CAGT-GTT-GCCACTGAATCCTTAGCGAATAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCAACT			458
Query 120	TGTATTAGGGATGCTGATGTATTACGAACGAGCTAGGCCAAAGCCAGCAGCGCTCAGAAT			179
Sbjct 457	TGTATTAGGGATGCTGATGTATTACGAACGAGCTAGGCCAAAGCCAGCAGCGCTCAGAAT			398
Query 180	CCAAACCAACATCGATTACCAAGAAAAGATTGGGTTGAAGAATTTCATGACACTCAAACAG			239
Sbjct 397	CCAAACCAACATCGATTACTAAGAAAAGATTGGGTTGAAGAATTTCATGACACTCAAACAG			338
Query 240	ACATGCTCTCCGGAATACCAGAGAGCGCAAGATGCGTTCAAAGATTTCGATGATCACTGA			299
Sbjct 337	ACATGCTCTCCGGAATACCAGAGAGCGCAAGATGCGTTCAAAGATTTCGATGATCACTGA			278
Query 300	ATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGGCCAA			359
Sbjct 277	ATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGGCCAA			218
Query 360	GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTATTTTGTAAATAAAAAATAAATACATTCATAGACTCG			419
Sbjct 217	GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTATTTT-GTT-ATAAAAAATAAATACATTCATAGACTCG			160
Query 420	TGTTTTTGTAAAGTTAGATAGGTTTGCCACAGCTCCGAAGAGCCGCTTTCGCCTAATAAAC			479
Sbjct 159	TGTTTTT-GTAAAGTT-GATAGG-TTGCCACAGCTCCGAAGAGCCGCTTTCGCCTAATAAAC			103
Query 480	AGATGCACAAGGGTTTAGATGTGAG			504
Sbjct 102	AGATGCACA-GGGTT-AGATGTGAG			80

Isolado ACBL-80 Query ID - Icl|109838

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomyces cerevisiae strain TFS9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KF414526.1
Saccharomyces cerevisiae strain ZJU internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KF442632.1
Uncultured fungus clone OTU_3009_75_27868 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KF222011.1
Saccharomyces cerevisiae strain SA79 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KF018556.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC 18824 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC881067.1
Saccharomyces cerevisiae strain ABT-Y1J 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KF055433.1
Saccharomyces sp. 98c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC834825.1
Saccharomyces sp. 96c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC834824.1
Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP_225	228	228	97%	4e-56	92%	AB830593.1
Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP_12	228	228	97%	4e-56	92%	AB830591.1
Uncultured Saccharomyces clone 038_G439WC_13-T7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC785564.1
Saccharomyces cerevisiae voucher ITV138 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC765126.1
Saccharomyces cerevisiae voucher ITV131 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC765124.1
Saccharomyces cerevisiae strain FSHY7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC607750.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-48 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC544501.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC544499.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-47 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC544490.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-43 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC544486.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-40 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC544484.1
Saccharomyces cerevisiae strain DQY7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC621078.1
Saccharomyces cerevisiae strain DQY2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC621077.1
Saccharomyces cerevisiae strain TEMD14 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	97%	4e-56	92%	KC182126.1

Saccharomyces cerevisiae strain TFS9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF414526.1](#) Length: 829 Number of Matches: 1

Range 1: 51 to 212 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
228 bits(123)	4e-56	150/163(92%)	1/163(0%)	Plus/Plus
Query 6	GAGCTTTTACTGGGCTAGCGAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGAGAAATGCACCTTACGT	65		
Sbjct 51	GAGCTTTTACTGGGCAAG-AAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCCTGCGCTTAAGT	109		
Query 66	GCGCGGTCCTTGCTAGGCTTGTTCAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTCT	125		
Sbjct 110	GCGCGGTCCTTGCTAGGCTTGTAAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTCT	169		
Query 126	GTGCTTTTAAAATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACTACAC	168		
Sbjct 170	GTGCTTTTGTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATAACAACAC	212		

Isolado ACBL-81 Query ID - Icl|109837

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC 18824 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC881067.1
Saccharomyces sp. 98c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1000	1000	100%	0.0	98%	KC834825.1
Saccharomyces sp. 96c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1000	1000	100%	0.0	98%	KC834824.1
Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP_12	1000	1000	100%	0.0	98%	AB830591.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-40 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC544484.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC515376.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC515365.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc07 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC515361.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC515356.1
Saccharomyces cerevisiae strain W26 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC588953.1
Saccharomyces cerevisiae strain W46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC588952.1
Saccharomyces cerevisiae strain W13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC542799.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4900 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC113638.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4899 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c:	1000	1000	100%	0.0	98%	KC113637.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC 46740 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern:	1000	1000	100%	0.0	98%	JX094776.1
Saccharomyces cerevisiae strain SD4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequi:	1000	1000	100%	0.0	98%	JQ970401.1
Saccharomyces cerevisiae strain NX3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequi:	1000	1000	100%	0.0	98%	JQ970397.1
Saccharomyces cerevisiae strain NX1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequi:	1000	1000	100%	0.0	98%	JQ970396.1
Saccharomyces cerevisiae strain BJ13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequi:	1000	1000	100%	0.0	98%	JQ970351.1
Saccharomyces cerevisiae strain BJ11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequi:	1000	1000	100%	0.0	98%	JQ970349.1
Saccharomyces cerevisiae strain BJ10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequi:	1000	1000	100%	0.0	98%	JQ970348.1
Saccharomyces cerevisiae strain BJ9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequi:	1000	1000	100%	0.0	98%	JQ970347.1

Saccharomyces cerevisiae strain ATCC 18824 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KC881067.1|](#) Length: 758 Number of Matches: 1

Range 1: 32 to 609 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1000 bits(541)	0.0	566/578(98%)	1/578(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAtttttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCTAGAAGACAAGAGATGGA	60		
Sbjct 32	GATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGA	91		
Query 61	GAGTCCAGCCGGGCCCTGCGCTTAAGTGC CGCGGTCTTGCTAGGCTTGT CAGTTTCTTCTT	120		
Sbjct 92	GAGTCCAGCCGGGCCCTGCGCTTAAGTGC CGCGGTCTTGCTAGGCTTGT AAGTTTCTTCTT	151		
Query 121	GCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AACCGTTTCA	180		
Sbjct 152	GCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AACCGTTTCA	211		
Query 181	ATACAACACACTGTGGAGATTTTCATACTTTGCAACTTTTTCTTTGGTCATT CGAGCAAT	240		
Sbjct 212	ATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATACTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATT CGAGCAAT	271		
Query 241	CGGGGCCAGAGGGAACAACAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGT -AAAAA	299		
Sbjct 272	CGGGGCCAGAGGTAACAACAACAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAA	331		
Query 300	CAAGAATTTTCGTAAC TGGAAATTTTAAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG	359		
Sbjct 332	CAAGAATTTTCGTAAC TGGAAATTTTAAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG	391		
Query 360	GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGAGAATTGCAGAAATCC	419		
Sbjct 392	GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGAGAATTGCAGAAATCC	451		
Query 420	GAGAAATCATCGTATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGTGCATGCCTG	479		
Sbjct 452	GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTG	511		
Query 480	TTTGAGCGTCAITTCCTTCTCACACATTCTGATTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTT	539		
Sbjct 512	TTTGAGCGTCAITTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTT	571		
Query 540	AACTTGAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGttttttt 577			
Sbjct 572	AACTTGAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTT 609			

Isolado ACBL-82 Query ID - Icl|109836

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomyces cerevisiae strain KDLYS9-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	826	826	99%	0.0	97%	JN599148.1
Uncultured eukarvot clone N709T_66 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA	826	826	99%	0.0	97%	GU942431.1
Saccharomyces sp. 98c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	824	824	99%	0.0	97%	KC834825.1
Saccharomyces sp. 96c 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	824	824	99%	0.0	97%	KC834824.1
Saccharomyces cerevisiae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence, strain: KKP_12	824	824	99%	0.0	97%	AB830591.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-40 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, co	824	824	99%	0.0	97%	KC544484.1
Saccharomyces cerevisiae strain JN35 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	824	824	99%	0.0	97%	KC342940.1
Saccharomyces cerevisiae strain JN31 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	824	824	99%	0.0	97%	KC342936.1
Saccharomyces cerevisiae strain JN8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed s	824	824	99%	0.0	97%	KC342913.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	824	824	99%	0.0	97%	KC515376.1
Saccharomyces cerevisiae strain Sc11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	824	824	99%	0.0	97%	KC515365.1
Saccharomyces cerevisiae strain W28 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed;	824	824	99%	0.0	97%	KC588953.1
Saccharomyces cerevisiae strain W46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	824	824	99%	0.0	97%	KC588952.1
Saccharomyces cerevisiae strain W13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed;	824	824	99%	0.0	97%	KC542799.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4900 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,	824	824	99%	0.0	97%	KC113638.1
Saccharomyces cerevisiae strain ATCC MYA-4899 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,	824	824	99%	0.0	97%	KC113637.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:14280 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	824	824	99%	0.0	97%	KC254081.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:13357 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	824	824	99%	0.0	97%	KC254080.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:13182 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	824	824	99%	0.0	97%	KC254079.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:13166 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	824	824	99%	0.0	97%	KC254078.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:11907 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	824	824	99%	0.0	97%	KC254077.1
Saccharomyces boulardii culture-collection UOAHCPF<GRC>:11334 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	824	824	99%	0.0	97%	KC254076.1

Saccharomyces cerevisiae strain KDLYS9-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|JN599148.1](#) Length: 782 Number of Matches: 1

Range 1: 252 to 737 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
826 bits(447)	0.0	478/492(97%)	6/492(1%)	Plus/Minus
Query 5	TCGCCTAGACGCTCTCTGTCTTATCGATAACCGTTTACAATACGCTCAGTATaaaaaaG	64		
Sbjct 737	TCGCCTAGACGCTCTCT-TCTTATCGATAACGGTTC-CAATACGCTCAGTATAAAAAAAG	680		
Query 65	ATTAGGCCGCGAGTTGGTAAAAACCTAAAAACGACCGTACTTGCCTTATACCTCAAGCACGCA	124		
Sbjct 679	ATTAG-CCGCGAGTTGGTAAAAACCTAAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCA	621		
Query 125	GAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAaCATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACT	184		
Sbjct 620	GAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAaCATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACT	561		
Query 185	CCAAAGAGTATCACTCACTACCCAAACAGAATGTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAG	244		
Sbjct 560	CCAAAGAGTATCACTCACTACC-AAACAGAATGTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAG	502		
Query 245	GCATGCCCCCTGGAAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGG	304		
Sbjct 501	GCATGCCCCCTGGAA-TACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGG	443		
Query 305	AATTCGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCTGATGCGAGAACC	364		
Sbjct 442	AATTCGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATC-GATGCGAGAACC	384		
Query 365	AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTGTAAATATTTAAAAATTCAGTTACGAAAGTTCTTTCG	424		
Sbjct 383	AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTGTAAATATTTAAAAATTCAGTTACGAAATTTCTTGT	324		
Query 425	TTTTGACAGAAATTTAATGGATACATAAAATTTGTTTGTGTTTACCTCTGGGCCCGGA	484		
Sbjct 323	TTTTGACAAAAATTTAATGAATAGATAAAATTTGTTTGTGTTTACCTCTGGGCCCGGA	264		
Query 485	TTGCTCGAATGC 496			
Sbjct 263	TTGCTCGAATGC 252			

Isolado ACBL-84 Query ID - ICI|109835

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Fungal sp. LL11 111 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial	372	372	97%	2e-99	93%	KF057603.1
Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14	366	366	97%	8e-98	93%	FM199968.1
Candida stellimalicola strain YD124 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	346	346	97%	1e-91	91%	JQ927545.1
Candida stellimalicola strain YD121 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	346	346	97%	1e-91	91%	JQ927544.1
Candida stellimalicola strain LL11 154 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	309	309	97%	1e-80	89%	KF057735.1
Cladosporium cladosporioides strain UFMGCB 3677 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	89.8	89.8	31%	2e-14	87%	HQ533784.1
Phomopsis sp. G7-36 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	86.1	86.1	23%	2e-13	92%	GQ461585.1
Uncultured Helotiales clone sm1a internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	82.4	82.4	27%	3e-12	88%	EF027381.1
Uncultured Ascomycota genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate agrFF981	78.7	78.7	30%	4e-11	85%	FR773499.1

Candida stellimalicola 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain H6PODK14

Sequence ID: [emb|FM199968.1|](#) Length: 518 Number of Matches: 1

Range 1: 206 to 454 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
366 bits(198)	8e-98	237/255(93%)	6/255(2%)	Plus/Minus
Query 7	AGAGATGCCGATCGTCGCTTGCCAACAATGTAAGGACGTTCCITTAAGACATTGCAGCGA	66		
Sbjct 454	AGAGATGCCG-TC-TCGCTTGCCAACAATG-AAAGGACGTTCCITTAAGACATTGCAGCGT	398		
Query 67	GCGCTTTACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTCGTGTACCTGTGTTTTA	126		
Sbjct 397	GCGCTAAACAAACACCCACTACTACTACAAACAGCTCCGCTGTCGTGTACCTGTGTTTTA	338		
Query 127	GAGGAGTGCCAGACATTCCTCCACCACAAAACTACCGCTTTGAGAAGGCAACGACGCT	186		
Sbjct 337	GGGGAGTGCCAGAC-TT-CCCCACCACCAAACTACCGCTTTGAGAAGGTAACGACGCT	280		
Query 187	CAAACAGGCATGCCGCCAGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGCATCAAAGATTTCGCTCA	246		
Sbjct 279	CAAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGT-TCAAAGATTTCGATGA	221		
Query 247	CTCACGTAAATCTGC	261		
Sbjct 220	CTCACGAAAATCTGC	206		

Isolado ACBL-86 Query ID - Icl|109834

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Meyerozyma caribbica strain Kw3S2Y1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	KF268354.1
Meyerozyma caribbica strain Kw1S7Y2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	KF268353.1
Meyerozyma caribbica strain L5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	KC977491.1
Meyerozyma caribbica isolate A-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	KC556809.1
Meyerozyma caribbica isolate F4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JX910353.1
Meyerozyma caribbica isolate B-WHX-12-26 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	KC544483.1
Meyerozyma caribbica strain Hb36b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	298	298	98%	3e-77	86%	KC422423.1
Meyerozyma caribbica strain JEY267 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	KC111450.1
Meyerozyma caribbica strain CDF4905 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JX886025.1
Meyerozyma caribbica strain CDF4887 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JX886024.1
Meyerozyma caribbica strain IWBT-Y836 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JQ993381.1
Meyerozyma sp. Y-42 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	AB693157.1
Meyerozyma caribbica isolate WM10.15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JN183445.1
Saccharomyces sp. qenotype 371 isolate FL0737 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JQ760408.1
Saccharomyces sp. qenotype 371 isolate FL0731 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JQ760406.1
Meyerozyma caribbica strain AUMC 7262 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JQ425349.1
Meyerozyma caribbica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JQ083436.1
Meyerozyma quilliermondii internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and internal transcribed spacer 3, partial sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JN974905.1
Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-71 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JN255516.1
Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-69 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JN255514.1
Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-60 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	298	298	98%	3e-77	86%	JN255505.1

Meyerozyma caribbica strain Kw3S2Y1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Sequence ID: [gb|KF268354.1|](#) Length: 552 Number of Matches: 1

Range 1: 191 to 464 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
298 bits(161)	3e-77	238/276(86%)	2/276(0%)	Plus/Minus
Query 5	CCTAATACATTGAGAGGTAGACAGCACTATCCAGAACGACCCACGCCAATACTTTTCAAG			64
Sbjct 464	CCTAATACATTGAGAGGTCGACAGCACTATCCAGTACTACCCATGCCAATACTTTTCAAG			405
Query 65	CAAACGCCTAGTTCGACCAAGAGTATCACTCAATACCTAACCCGGAGAACGGAGAGAGAA			124
Sbjct 404	CAAACGCCTAGTTCGACTAAGAGTATCACTCAATACCAAAACCCGGGGGTTTGAGAGAGAA			345
Query 125	ATGACGCTCAAACAGGCTTGCCGCTCTGTCATACCACATCGCATCAITGTGCGTTCACATGA			184
Sbjct 344	ATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTCTGGAATACCAGAGGGGCAATGTGCGTTCA-AAGA			286
Query 185	CGCGATGATTATGCAAAATCGGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCGCTGCGAACCCTC			244
Sbjct 285	TTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCT-TC			227
Query 245	AGCGATGCGAGTACAGAGAGATCCGTAGTCGAAAGT		280	
Sbjct 226	ATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGT		191	