



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENATA MORI THOMÉ

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS PARA O  
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* EM  
MORANGO E *Penicillium digitatum* EM LARANJA**

---

Londrina  
2020

RENATA MORI THOMÉ

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS PARA O  
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* EM  
MORANGO E *Penicillium digitatum* EM LARANJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre em Agronomia (Fitossanidade/Fitopatologia).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Isabel Balbi-Peña

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- R394 Thomé, Renata Mori.  
Avaliação de leveduras antagonistas para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em morango e *Penicillium digitatum* em laranja / Renata Mori Thomé. - Londrina, 2020.  
85 f.
- Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.  
Inclui bibliografia.
1. Antagonismo - Tese. 2. Bolor verde dos citros - Tese. 3. Mofo cinzento - Tese. I. Balbi-Peña, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

RENATA MORI THOMÉ

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE  
BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* EM MORANGO E *Penicillium  
digitatum* EM LARANJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre em Agronomia (Fitossanidade/Fitopatologia).

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Isabel Balbi-Peña  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Inês Rezende  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Katia Regina Freitas Schwan-  
Estrada  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 19 de Fevereiro de 2020.

*Aos meus pais, Agenor e Regina e ao meu irmão Olivio, por todo amor, paciência e por nunca deixarem de acreditar nos meus sonhos.*

*dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Agenor e Regina Thomé, por todo o amor, compreensão, educação e incentivo para conquistar mais esta etapa em minha vida. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos. Ao meu irmão Olivio Luiz Thomé e minha cunhada Iani L. Thomé, por me proporcionarem momentos felizes durante esses anos de estudo e pelo companheirismo.

A minha orientadora Maria Isabel Balbi-Peña, pela orientação, pelo conhecimento, pela dedicação e disposição em me auxiliar sempre que necessário e principalmente pela amizade.

Ao Gustavo Aparecido Gomes Ferraz, pela ajuda diária na execução desta dissertação e por fazer parte da minha vida. Por sempre acreditar, me incentivar, me confortar nos momentos difíceis, mas nunca me deixar desistir.

Aos meus amigos do Mestrado e do laboratório de Fitopatologia, Fernanda Paduan, Ciro Sumida, Luigi Scolin, Maicon de Paula, Luiz Vitor, Karla Braga, Lucas Fantin, Helen Prudente, Allan, José Rocha, por toda ajuda, carinho e amizade.

Aos meus amigos de longa data e a novas amizades, Danieli Todaro, Patricia Zeneratti, Milena Fanhani, Cristiane Zanatta, Thiago Ribeiro Ferrari, Bruna Ferrari Santos, e outros que aqui não cito, por sempre torcerem pelo meu sucesso e sempre estarem presentes na minha vida.

A minha avó Maria Mattias Thomé, pelas risadas, pelos puxões de orelha por não ir visitá-la sempre e pelas orações. E aos meus avós (*In memoriam*) Olivio Thomé Sobrinho, Luiz Carlos Mori e Maria de Lourdes Casarotto Mori. Sempre haverá saudade, mas sempre terá vocês no meu coração.

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia, técnicos e servidores.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante o mestrado.

*"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."*

**Augusto Cury**

THOMÉ, Renata Mori. **Avaliação de leveduras antagonistas para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em morango e *Penicillium digitatum* em laranja.** 2020. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O bolor verde dos citros, causado por *Penicillium digitatum* e o mofo cinzento em morango, causado por *Botrytis cinerea*, estão dentre as doenças pós-colheita mais importantes dessas culturas. O controle biológico utilizando leveduras antagonistas, tem-se tornado uma alternativa aos fungicidas sintéticos, pois é um método de controle mais seguro tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar se as cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA0760), *Pichia manshurica* (CCMA0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA0763) são capazes de controlar o crescimento de *P. digitatum* e *B. cinerea* em condições *in vitro* e o bolor verde e o mofo cinzento em condições *in vivo*. Em testes de laboratório foram investigados o antagonismo a *P. digitatum* e *B. cinerea* em placa, a atividade *killer* e a atividade de enzimas líticas extracelulares (quitinase,  $\beta$ -1,3- glucanase, pectinase, protease e gelatinase) das leveduras. Nos testes *in vivo*, frutos de laranja e morango foram inoculados com *P. digitatum* e *B. cinerea*, respectivamente, e 2h após foram tratados com as suspensões de leveduras. Os frutos de citros foram mantidos por 10 dias e o de morangos por 5 dias a 25°C. Os dados de incidência e severidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas de pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Apenas a cepa de levedura *P. manshurica* (CCMA0762) apresentou efeito positivo ao fator *killer*. Os compostos voláteis de todas as cepas testadas apresentaram efeito significativo no crescimento micelial (CM) de *B. cinerea*. A cepa CCMA0763 se destacou em relação as outras cepas apresentando uma redução de 41,47% na porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%) para *B. cinerea*. Já para *P. digitatum* apenas a cepa CCMA0763 apresentou efeito significativo, com uma redução de 19,87% no ICM% em relação ao controle. Para os testes de antagonismo em placa, todas as cepas apresentaram efeito significativo no crescimento micelial de *B. cinerea*, contudo, a cepa CCMA0759, se destacou apresentando uma redução de 50,8% no ICM%. Para *P. digitatum* todas as cepas tiveram efeito significativo sobre o patógeno, no entanto, as cepas CCMA0762 e CCMA0759 se destacaram, apresentando uma redução de 24,52 e 23,24% no ICM%, respectivamente. A respeito da produção de enzimas extracelulares, apenas *P. manshurica* (CCMA0762) apresentou atividade proteolítica e somente a cepa *L. thermotolerans* (CCMA 0763) manifestou atividade pectinolítica. *P. manshurica* (CCMA0762) e *L. thermotolerans* (CCMA 0763) apresentaram atividade  $\beta$ -1,3-glucanase e baixa atividade de gelatinase. Nenhuma cepa hidrolisou quitinase. Nos testes *in vivo*, a % de incidência de mofo cinzento se mantiveram baixos até 48h após inoculação, contudo a partir de 72 h, apenas a levedura *P. caribbica* (CCMA0759) manteve uma menor incidência de mofo cinzento. Entretanto, nenhuma cepa testada apresentou efeito no controle do bolor verde em frutos de citros.

**Palavras-chave:** Antagonismo. Bolor verde dos citros. *Hanseniaspora opuntiae*. *Lachancea thermotolerans*. Mofo cinzento. *Pichia caribbica*. *Pichia manshurica*.

THOMÉ, Renata Mori. **Evaluation of antagonist yeasts for the biological control of *Botrytis cinerea* in strawberry and *Penicillium digitatum* in orange.** 2020. 86 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Green mold of citrus, caused by *Penicillium digitatum* and gray mold in strawberry, caused by *Botrytis cinerea*, are among the most important post-harvest diseases of these crops. Biological control using antagonistic yeasts has become an alternative to synthetic fungicides, as it is a safer control method for both human health and the environment. The objective of this work was to investigate whether *Pichia caribbica* (CCMA0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA0760), *Pichia manshurica* (CCMA0762) and *Lachancea thermotolerans* (CCMA0763) yeast strains are able to restrain both *P. digitatum* and *B. cinerea* growths under *in vitro* conditions. In laboratory tests, antagonism to *P. digitatum* and *B. cinerea*, killer activity and activity of extracellular lytic enzymes (chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, pectinase, protease and gelatinase) of yeasts were investigated. Related to the *in vivo* experiments, orange and strawberry fruits were inoculated individually with *P. digitatum* and *B. cinerea*, respectively, and after 2 h, fruits were treated with yeast suspensions. Orange fruits were kept for 10 days whereas strawberries for five days at 25 C°. Data of incidence and severity were submitted to analysis of variance and Tukey test ( $p < 0,05$ ). *P. manshurica* (CCMA0762) was the only strain that was *killer* factor positive. Volatile compounds from all yeast strains inhibited *B. cinerea* mycelial growth. The highest effect was exerted by CCMA0763 strain with an inhibition mycelial growth (IMG) of 41,47%. CCMA0763 strain was the only one that had a significant effect on *P. digitatum* by volatiles, showing 19,87% of IMG %. In relation to the antagonism tests, all yeast strains showed significant effect on *B. cinerea* IMG. CCMA0759 strain exerted the highest reduction of mycelial growth (50,8%). All yeast strains displayed significant effect over *P. digitatum*. The highest effect was exerted by CCMA0762 and CCMA0759 with 24,52 and 23,24% of IMG, respectively. Regarding the production of extracellular enzymes, only *P. manshurica* (CCMA0762) showed proteolytic activity and only *L. thermotolerans* strain (CCMA 0763) showed pectinolytic activity. *P. manshurica* (CCMA0762) and *L. thermotolerans* (CCMA 0763) showed  $\beta$ -1,3-glucanase activity and low gelatinase activity. In *in vivo* tests, the gray mold incidence remained low until 48h after inoculation, however after 72 h, only the yeast *P. caribbica* (CCMA0759) maintained a lower incidence of gray mold. However, no tested strain had an effect on the control of green mold in oranges.

**Key words:** Antagonism. Citrus green mold. Gray mold of strawberry. *Hanseniaspora opuntiae*. *Lachancea thermotolerans*. *Pichia caribbica*. *Pichia manshurica*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1** Componentes da parede celular fúngica. As proteases degradam a camada de mananaproteínas,  $\beta$ -1,3-glucanases atuam degradando a camada de  $\beta$ -glucanas e quitinase degradando a camada mais interna de quitina. Diferentes paredes celulares dos fungos contêm diferentes glucanos (VEGA; KALKUM, 2011) .....30
- Figura 3.1** Esquema de estriamento das leveduras e deposição do disco micelial para determinação da atividade antagônica em placas. (A) placas contendo fungo fitopatogênico e leveduras, (B) estriamento da levedura paralelamente a borda da placa, (C) placas contendo o disco micelial fúngico a 3 cm da levedura .....39
- Figura 3.2** Esquema de montagem das placas para a determinação da produção de compostos voláteis. (A) placas bipartidas, (B) Suspensão de leveduras  $3,0 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, (C) deposição do disco micelial e aplicação da suspensão de leveduras em lados opostos da placa .....40
- Figura 3.3** Esquema de montagem das placas para a determinação da atividade proteolítica. (A) placas contendo meio de cultura com leite desnatado, (B) aplicação da suspensão de leveduras, (C) determinação da atividade protease com um halo claro ao redor da levedura .....42
- Figura 3.4** Determinação da atividade killer. (A) Controle *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Saccharomyces cerevisiae* 232(+) (B) Controle *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Saccharomyces cerevisiae* 732 (+) (C) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (D) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (E) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (F) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....46
- Figura 3.5** Determinação da atividade killer. (A) Controle *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-) vs. *Saccharomyces cerevisiae*

232(+)  
 (B) Controle *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-)  
 vs. *Saccharomyces cerevisiae* 732 (+)  
 (C) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-)  
 vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759),  
 (D) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-)  
 vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760),  
 (E) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-)  
 vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762),  
 (F) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-)  
 vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).....47

**Figura 3.6** Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* (Bc) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Bc), (B) Bc vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Bc vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Bc vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Bc vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).....48

**Figura 3.7** Crescimento micelial de *Penicillium digitatum* (Pd) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Pd), (B) Pd vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Pd vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Pd vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Pd vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....50

**Figura 3.8** Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* (Bc) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Bc), (B) Bc vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Bc vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Bc vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Bc vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).....52

**Figura 3.9** Crescimento micelial de *Penicillium digitatum* (Pd) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Pd), (B) Pd vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Pd vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Pd vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Pd vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....54

**Figura 3.10** Teste de atividade de protease em meio YPD com 10% leite em pó desnatado cultivado com leveduras. (A) Controle, (B) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (D) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).....55

- Figura 3.11** Teste de liquefação de gelatina em meio dextrose com gelatina 10% cultivado com leveduras. (A) Controle, (B) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (D) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....56
- Figura 3.12** Teste de atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em meio YNB com 5% de laminarina cultivado com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....57
- Figura 3.13** Teste de atividade de pectinase em meio YNB com 1 % de pectina cultivado com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....58
- Figura 3.14** Teste atividade enzimática quitinase cultivadas com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....60
- Figura 3.15** (A) Incidência (%) às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da incidência de mofo cinzento (AACPD). (B) Curva de progresso de mofo cinzento (% incidência) em morangos inoculados com *Botrytis cinerea* e tratados com cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....62
- Figura 3.16** Incidência de *Botrytis cinerea* 72h após-inoculação sobre frutos de morangos tratados com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763), (E) Controle .....64
- Figura 3.17** (A) Severidade (%) às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação e área abaixo da curva de progresso (AACPD) do

bolor verde em laranjas. (B) Curva de progresso da doença de bolor verde dos citros em laranjas inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados com cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) .....65

**Figura 3.18** Diâmetro médio das lesões de bolor verde dos citros em laranjas inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados com cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).....66

**Figura 3.19** Severidade de bolor verde dos citros às 120h pós-inoculação em frutos de laranja inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados com cepas de leveduras (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763), (E) Controle .....67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Caracterização da presença do fenótipo killer nas leveduras testadas. (+) positivo ao fenótipo killer; (-) negativo ao fenótipo killer.....	45
<b>Tabela 3.2</b>	Crescimento micelial no sexto dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) e halo de inibição de <i>Botrytis cinerea</i> (Bc) co-cultivado com <i>Pichia caribbica</i> (CCMA 0759), <i>Hanseniaspora opuntiae</i> (CCMA 0760), <i>Pichia manshurica</i> (CCMA 0762) e <i>Lachancea thermotolerans</i> (CCMA 0763) .....	48
<b>Tabela 3.3</b>	Crescimento micelial no sétimo dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) e halo de inibição de <i>Penicillium digitatum</i> (Pd) co-cultivado com <i>Pichia caribbica</i> (CCMA 0759), <i>Hanseniaspora opuntiae</i> (CCMA 0760), <i>Pichia manshurica</i> (CCMA 0762) e <i>Lachancea thermotolerans</i> (CCMA 0763) .....	50
<b>Tabela 3.4</b>	Crescimento micelial no terceiro dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) <i>Botrytis cinerea</i> (Bc) co-cultivado com <i>Pichia caribbica</i> (CCMA 0759), <i>Hanseniaspora opuntiae</i> (CCMA 0760), <i>Pichia manshurica</i> (CCMA 0762) e <i>Lachancea thermotolerans</i> (CCMA 0763) .....	51
<b>Tabela 3.5</b>	Crescimento micelial no quinto dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) <i>Penicillium digitatum</i> (Pd) co-cultivado com <i>Pichia caribbica</i> (CCMA 0759), <i>Hanseniaspora opuntiae</i> (CCMA 0760), <i>Pichia manshurica</i> (CCMA 0762) e <i>Lachancea thermotolerans</i> (CCMA 0763) .....	53
<b>Tabela 3.6</b>	Atividade de enzimas líticas extracelulares em <i>Pichia caribbica</i> (CCMA 0759), <i>Hanseniaspora opuntiae</i> (CCMA 0760), <i>Pichia manshurica</i> (CCMA 0762) e <i>Lachancea thermotolerans</i> (CCMA 0763).....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata-dextrose-ágar
Bc	Botrytis cinerea
cél/MI	Células por mL
cm	centímetros
hpi	horas pós inoculação
IVCM	Índice de velocidade de crescimento micelial
ICM (%)	Porcentagem de inibição de crescimento micelial
LMR	Limite máximo de resíduos
Pd	Penicillium digitatum
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
YNB	Yeast nitrogen base

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E PRODUTIVIDADE .....	18
2.1.1	Morango (Fragaria x ananassa Duch.) .....	18
2.1.2	Citros .....	19
2.2	DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM FRUTOS .....	20
2.2.1	Mofo Cinzento (Botrytis cinerea) .....	21
2.2.2	Bolor Verde (Penicillium digitatum).....	22
2.3	CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPÁTOGENOS .....	24
2.3.2	Leveduras como Agentes de Biocontrole .....	25
2.3.2.1	Fator killer.....	27
2.3.3	Enzimas Líticas Extracelulares produzidas por leveduras.....	28
2.3.3.1	Proteases .....	30
2.3.3.2	$\beta$ -1,3-glucanases .....	31
2.3.3.3	Quitinases .....	32
2.3.3.4	Pectinases.....	32
<b>3</b>	<b>ARTIGO A: AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE BOTRYTIS CINEREA EM MORANGO E PENICILLIUM DIGITATUM EM LARANJA</b> .....	34
3.1	RESUMO .....	34
3.3	INTRODUÇÃO .....	36
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.4.1	Manutenção das Cepas de Leveduras e Isolados de Fungos Patogênicos.....	37
3.4.2	Ensaio in vitro .....	38
3.4.2.1	Determinação da atividade killer.....	38
3.4.2.2	Determinação da atividade antagonista em placa .....	38
3.4.2.3	Determinação da produção de compostos voláteis .....	40
3.4.2.4	Determinação qualitativa de enzimas líticas extracelulares .....	40
3.4.2.4.1	<i>Determinação qualitativa da atividade quitinase</i> .....	40

3.4.2.4.2	<i>Determinação qualitativa de <math>\beta</math>-1,3- glucanase</i> .....	41
3.4.2.4.3	<i>Determinação qualitativa da atividade pectinase</i> .....	41
3.4.2.4.4	<i>Determinação qualitativa da atividade protease</i> .....	42
3.4.2.4.5	<i>Determinação qualitativa da atividade de gelatinase</i> .....	42
3.4.3	Controle de Doenças Pós- Colheita em Frutos de Morango e Laranja .....	43
3.4.3.2	Morangos .....	43
3.4.3.3	Citros .....	43
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
3.5.1	Determinação da Atividade killer .....	45
3.5.2	Determinação da Atividade Antagonista em Placa.....	48
3.5.3	Determinação da Produção de Compostos Voláteis .....	51
3.5.4	Atividade de Enzimas Líticas Extracelulares .....	54
3.5.6	Eficácia das Células das Levedura no Controle in vivo de Mofo Cinzento em Morangos e de Bolor Verde em Citros .....	62
3.6	CONCLUSÕES .....	69
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

Os bolores e mofos que afetam os frutos na pós-colheita são as principais causas da perda de qualidade e quantidade de frutos. Em morangos o mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, junto com a podridão de *Rhizopus*, são as doenças pós-colheita mais importantes da cultura. Já para as doenças pós-colheita dos citros o bolor verde, causado por *Penicillium digitatum* é uma das principais doenças que acometem a citricultura.

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com os resíduos de produtos fitossanitários nos alimentos. A *Codex Alimentarius* é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), que estabelece o limite máximo para os resíduos de agrotóxico em frutas, limites estes que variam de acordo com a fruta e o agrotóxico utilizado.

Em 2012, por exemplo, a Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA, em testes em suco de laranja importado do Brasil, encontraram o fungicida carbendazim acima do limite de segurança determinado pelos EUA, vetando o embarque de suco naquele ano, gerando perdas de cerca de US\$ 100 milhões para os produtores brasileiros de laranja. Entre os anos de 2013 e 2015, o carbofurano foi um dos agrotóxicos relacionados a situações de risco agudo em laranja, onde 11% das amostras apresentaram um Limite Máximo de Resíduos (LMR) maior que 0,05 mg/kg. Os LMR em laranjas podem variar entre 0,01 a 5 mg/kg conforme o agrotóxico.

No ano de 2011, o morango foi um dos líderes em contaminação por resíduos de agrotóxicos no Brasil, com cerca de 63,4% de irregularidades nas amostras analisadas, com teores de resíduos de agrotóxicos acima do LMR permitido de 0,01 a 5 mg/kg dependendo do agrotóxico e sendo detectados também agrotóxicos não autorizados para a cultura.

O controle biológico, utilizando microrganismos antagonistas, tais como leveduras, bactérias ou fungos filamentosos, tem se tornado uma alternativa para o controle das doenças pós-colheita.

As leveduras são muito utilizadas para a proteção dos frutos *in natura*, pois não apresentam riscos à saúde humana. Podem ser encontradas na superfície dos próprios frutos e apresentam capacidade de sobrevivência em condições

adversas. Algumas espécies de leveduras apresentam o fator *killer*, que é uma toxina capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos, atuando na membrana celular, levando o microrganismo à morte.

O objetivo geral deste trabalho foi investigar se as cepas de leveduras são capazes de controlar o crescimento de *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea* em condições *in vitro* e o bolor verde e o mofo cinzento em condições *in vivo*, além de determinar características bioquímicas de cada cepa. Os objetivos específicos foram: I) analisar o potencial antagônico *in vitro* de cepas de leveduras de *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) contra *P. digitatum* e *B. cinerea*; II) Determinação da atividade *killer* e da atividade de enzimas líticas extracelulares (quitinase,  $\beta$ -1,3- glucanase, pectinase, protease e gelatinase) nessas cepas; III) avaliar o controle pós-colheita de bolor verde em citros e do mofo cinzento em morango exercido por essas leveduras.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E PRODUTIVIDADE

#### 2.1.1 Morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertence à família das *Rosaceas*, gênero *Fragaria* (CALVETE *et al.*, 2008). Possui características de planta perene, no entanto, é muito cultivada como cultura anual. A sua propagação dá-se através de estolhos, originários da planta-mãe, os quais enraízam em condições de temperatura favoráveis entre 25-26°C e fotoperíodo longo, originando assim novas plantas (MOLINA, 2016).

O morango tornou-se uma cultura de relevância econômica e social, especialmente nos Estados Unidos, onde se produzem cerca de 28% da produção mundial de morango (FERREIRA, 2017). No Brasil, não se sabe ao certo o início do cultivo comercial, porém, a expansão do cultivo pelo país se deu em 1960 (ANTUNES; PERES, 2013).

Segundo Antunes, Vignolo e Gonçalves (2016) no ano de 2016 a estimativa de produção de morango no Brasil foi de cerca de 133.391 mil toneladas em uma área cultivada de 3.718 hectares. No ano de 2017, o Brasil teve uma produção anual de 155.000 toneladas em uma área estimada de 4.300 ha, apresentando uma produtividade média de 3,0 ton/ha de morango. As variações de produtividade dependem do local onde se encontra o campo de produção e do sistema de cultivo utilizado pelo produtor (ANTUNES; FAGHERAZZI; VIGNOLO, 2017).

Conforme Santos *et al* (2016), o morango é considerado um fruto não climatérico, que conta com capacidade de armazenamento pós-colheita de menos de cinco dias, ocorrendo desidratação acelerada, lesões mecânicas, decaimento dos frutos e distúrbios fisiológicos, reduzindo a qualidade do fruto durante curtos períodos de armazenamento (MENEL *et al.*, 2012). De acordo com Cai *et al* (2014) a redução da qualidade da fruta dá-se principalmente pela alta atividade metabólica do fruto e a sensibilidade a doenças, causadas principalmente por *Botrytis cinerea* Pers (1794), agente causal do mofo cinzento e por *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. agente causal da podridão de *Rhizopus*.

O morango é definido como pseudofruto, pois o que é considerado como fruta é o receptáculo floral que é adensado e se torna doce, com formato e sabor característicos. Os verdadeiros frutos do morango são os aquênios, conhecidos popularmente como sementes (SANTOS *et al.*, 2016). Os pseudofrutos possuem em sua composição vitaminas e minerais importantes para a saúde humana tais como: vitamina C, riboflavina, piridoxina, niacina, magnésio, manganês, cálcio, ferro, fósforo e potássio. Possuem também grande quantidade de frutose e sacarose e poucos carboidratos (MACHADO, 2016).

O pseudofruto possui uma taxa respiratória muito elevada, o que acelera sua deterioração na pós-colheita, principalmente quando o fruto permanece em temperatura ambiente. Quando há uma elevação de cerca de 10°C na temperatura, essa taxa respiratória sofre um aumento de quatro a cinco vezes, chegando a 50% no amadurecimento. Já com relação ao armazenamento, a deterioração de frutos pode significar até 40% de perdas (SANTOS *et al.*, 2016).

### 2.1.2 Citros

Os citros são plantas pertencentes a família Rutaceae, originários da Ásia, principalmente das regiões tropicais e subtropicais do continente (LOPES *et al.*, 2011; UCHÔA, 2007).

A citricultura teve início no Brasil na década de 80 do século XIX, no estado do Rio de Janeiro, se consolidando mediante a exportação da laranja *in natura*. Em 1957, o estado de São Paulo, passou a desenvolver essa atividade, pelas condições meteorológicas propícias para a produção e como uma alternativa perante o decréscimo da cafeicultura. Com esse novo ramo, o agronegócio citrícola se converteu numa atividade geradora de renda e empregos para o estado de São Paulo e para o Brasil (BORGES; COSTA, 2005).

As espécies produzidos no Brasil são pertencentes ao gênero *Citrus*. Dentre elas, laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*C. reticulata* e *C. deliciosa*), limões (*C. limon*), limas ácidas, como a lima Tahiti (*C. latifolia*) e o galego (*C. aurantiifolia*), e as doces, como a Lima da Pérsia (*C. limettioides*), pomelo (*C. paradisi*), cidra (*C. medica*), laranja-azedada (*C. aurantiaum*) e toranjas (*C. grandis*) (LOPES *et al.*, 2011).

Entre todas as frutas, os citros se destacam no âmbito mundial por serem as mais produzidas e consumidas. O Brasil dispõe do mérito de ser o maior produtor mundial, principalmente, de laranja doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck.) (SOARES *et al.*, 2015). No ano de 2016, o Brasil tornou-se o maior exportador de suco de laranja do mundo, exportando US\$765,9 milhões em suco de laranja concentrado e congelado, US\$ 437,66 milhões do suco não concentrado e US\$ 524,17 milhões de outras bebidas derivadas do suco de laranja, como refrescos e águas saborizadas. Os principais países importadores foram União Europeia, Estados Unidos, Japão e China (FRANCO, 2016).

Regiões produtoras com temperaturas entre 23° e 32°C e alta UR %, favorecem a adaptabilidade das árvores cítricas no Brasil, concedendo à citricultura grande competitividade no mercado internacional (MACHADO, 2018).

## 2.2 DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM FRUTOS

As doenças de pós-colheita podem ocorrer durante a colheita, o manuseio em campo, nas operações de embalagem, transporte e armazenamento de frutos (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Os patógenos que causam estas doenças são incapazes de penetrar diretamente na cutícula da fruta, o que exige ferimentos para a sua penetração (NUNES, 2012).

As principais perdas ocorridas em pós-colheita são causadas basicamente por doenças fúngicas, as que causam danos nas frutas, bem como elevada desidratação, perda de firmeza de polpa e podridões (FONTANA *et al.*, 2018). Fungos dos gêneros *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloesporium* e *Mucor* são importante patógenos de doenças pós-colheita em geral (NUNES, 2012; MARI *et al.*, 2014).

A ocorrência dos ataques de patógenos em frutas é decorrente da alta quantidade de nutrientes, água e baixo pH presente no fruto, logo após a colheita. Estes frutos perdem a maior parte da resistência intrínseca que a planta oferece quando ainda estão presos nela (NUNES, 2012).

O grau de maturação da fruta no momento da colheita é de suma importância, pois determina a qualidade em pós-colheita. Quando realizada a colheita em um grau de maturação avançado, os frutos apresentam um aspecto amolecido, propícios a injúrias mecânicas, alterações fisiológicas e podridões acarretadas por

patógenos, determinando um menor tempo de prateleira (FISCHER; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

As perdas ocasionadas em frutos pós-colheita podem ser reduzidas, quando há uma diminuição das lesões mecânicas nos frutos, utilizando procedimentos adequados de sanitização, preservando a resistência natural dos frutos, atrasando a sua senescência. Apesar do uso destes procedimentos, técnicas e locais de armazenamentos modernos, estas medidas não são suficientes para impedir a senescência dos frutos (NUNES, 2012).

Conforme Romanazzi *et al* (2016), quando utilizadas tecnologias pós-colheita para o processo de amadurecimento dos frutos, como inibição da produção e/ou ação de etileno, uso de atmosferas modificadas e controladas e utilização de hormônios vegetais, estas podem interferir na infecção e desenvolvimento de fungos.

### 2.2.1 Mofo Cinzento (*Botrytis cinerea*)

O fungo *Botrytis cinerea* Pers. (1794), fase teleomórfica *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel (1945), é necrotrófico, colonizando tecidos de plantas senescentes ou mortas causando podridões de frutos como o mofo cinzento (MARTÍNEZ-HIDALGO *et al.*, 2015). Pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, família Sclerotiniaceae e gênero *Botrytis*, infecta ao menos 1.400 espécies de plantas, entre elas várias culturas de importância econômica (VAN KAN; STASSEN; MOSBACH, 2017).

De acordo com Castillo *et al* (2017), após a deposição dos conídios na superfície do hospedeiro, ocorre a produção de estímulos para produção dos tubos germinativos que permitem a penetração do fungo no hospedeiro. Estes tubos penetram diretamente ou após a formação de apressório nos tecidos do hospedeiro, sejam eles folhas, flores, frutas ou através de aberturas naturais, como os estômatos.

O fungo possui ciclo de vida típico, ocorrendo a infecção, penetração no hospedeiro e a formação de conidióforos (ABUQAMAR *et al.*, 2017). É um patógeno policíclico que produz inóculo constantemente (MERTELY *et al.*, 2018). O fungo é mais destrutivo em dicotiledôneas com tecidos maduros e senescentes, mas geralmente infecta os tecidos em estágios mais novos de desenvolvimento da cultura, permanecendo quiescente por um período, antes que ocorra o apodrecimento dos

tecidos quando o ambiente é favorável e muda a fisiologia do hospedeiro (WILLIAMSON *et al.*, 2007).

Conforme Parafati *et al* (2015), *B. cinerea* possui capacidade de crescer em temperaturas baixas, quase em ponto de congelamento, sendo um dos motivos pelo qual o patógeno se torna de difícil controle. O fungo possui uma variedade de modos de ataque na planta e diversos hospedeiros que servem como fonte de inóculo, podendo sobreviver na forma de micélio e/ou conídios e como estruturas de resistência, esclerócios, nos restos culturais (WILLIAMSON *et al.* 2007).

O fungo *B. cinerea*, secreta enzimas específicas que degradam a parede celular e alguns metabólitos que rompem a parede celular, nutrindo-se do tecido morto da planta. No entanto, a modulação ativa do estado redox e da via de morte celular programada do hospedeiro realizada pelo patógeno, parecem ser cruciais para o desenvolvimento da doença (CASTILHO *et al.*, 2017). Segundo Gronover *et al* (2001), enzimas de degradação da parede celular, fitotoxinas, espécies ativas de oxigênio ou transportadores de membrana para secreção de compostos de defesa da planta, têm sido considerados como fatores de patogenicidade de *B. cinerea*.

Os sintomas típicos do mofo cinzento em frutos de morango, consistem em manchas marrom-claras de tamanho variável, que possuem uma rápida evolução, envolvendo o fruto todo, que apodrece e adquire aspecto seco e firme recoberto de micélio cinza (PARISI *et al.*, 2016). Conforme a doença avança, a fruta fica mumificada e as flores e pedicelos deteriorados, tornando-se novas fontes de inóculo (MERTELY *et al.*, 2018).

Sintomas como manchas de flores, podridão de frutos, damping-off, cancos de haste ou podridões, manchas foliares e podridões de tubérculos, brotos e bulbos, são sintomas específicos de doenças causadas por *Botrytis* sp., em outras culturas (AGRIOS, 2005).

### 2.2.2 Bolor Verde (*Penicillium digitatum*)

O fungo *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. (1881) é o agente causal de bolor verde, doença importante em frutos de citros em pós-colheita. Pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Família Eurotiales e Gênero

*Penicillium*. Diferente de *P. expansum*, *P. digitatum* é considerado um patógeno específico para frutas cítricas, podendo ser considerado avirulento para outras culturas (VILANOVA *et al.*, 2016).

Dentre as doenças pós-colheita dos citros, os bolores são economicamente as mais importantes, sendo causados por três espécies: *Penicillium expansum*, *P. italicum* e *P. digitatum*, dos quais, os mais comuns nas regiões produtoras são *P. italicum* e *P. digitatum*. Os fitopatógenos deste gênero acarretam danos, tanto em pomares, quando o fruto se encontra no final da maturação, quanto em pós-colheita (FEICHTENBERGER *et al.*, 2005).

A penetração do patógeno acontece através de ferimentos nas frutas, que possuem os nutrientes disponíveis e estímulos necessários para a germinação dos esporos que encontram-se depositados na superfície do fruto. Em meios artificiais a uma temperatura de 5°C, o fungo é capaz de germinar e produzir colônias de coloração verde-oliva com até 3mm de diâmetro, não exibindo crescimento micelial a 37°C. O odor tanto em frutos quanto em placas com meio de cultura sintético é característico. Podem-se ser detectados metabólitos voláteis como limoneno, etileno, álcool etílico, acetato de etila e/ou acetato de metila, que determinam o cheiro característico do fungo (PALOU, 2014).

A temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno é de 24°C, porém, em temperaturas acima de 30°C e abaixo de 10°C seu desenvolvimento é lento, podendo ser inibido completamente quando atinge 1°C (BENATO *et al.*, 2018). As podridões moles em frutos, começam como pequenas anasarcas na superfície, que rapidamente aumentam de tamanho, tomando todo o fruto. É desenvolvido um micélio branco sobre o fruto, que em seguida, é revestido por esporos de coloração verde-oliva (BASSANEZI *et al.*, 2016).

O fungo *P. digitatum* produz enzimas que degradam a lamela média dos tecidos infectados, acarretando podridões moles. Sobrevive saprofiticamente em forma de conídios em restos culturais e pomares (BASSANEZI *et al.*, 2016).

A infecção e o desenvolvimento da doença, são determinados pela quantidade de conídios de *P. digitatum* que chega ao sítio de infecção. Essa relação entre quantidade e incidência, é quase linear, desde que o fruto seja suscetível e a temperatura de infecção seja apropriada (PALOU, 2014).

O bolor verde também apresenta problemas a saúde humana, por ser causado por um fungo que produz um vasto número de esporos que podem acarretar

uma resposta alérgica a seres humanos que manipulam o fruto com a doença (PLATANIA *et al.*, 2011).

### 2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPÁTOGENOS

O uso de produtos químicos para a preservação de frutas de estresses abióticos e bióticos, até o consumo, aumentou nos últimos anos. Neste sentido, Pretorius, Van Rooyen e Clarke, (2015) afirmam que o controle químico de *Penicillium* spp., torna-se cada vez mais difícil, pois há ocorrências de resistência a certos fungicidas. O controle biológico de doenças pós-colheita de frutos é uma alternativa para reduzir o uso de substâncias químicas (MARI, NERI, SPADONI, 2016).

Segundo Medeiros, Silva e Pascholati (2016, p.261), controle biológico é:

[...] a redução de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocadas por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem, ou ainda, a destruição parcial ou total de populações de patógenos por outros organismos frequentemente encontrados na natureza.

O controle biológico com microrganismos antagonistas como leveduras, fungos filamentosos e bactérias tem-se tornado uma alternativa aos fungicidas sintéticos, para o controle de fitopatógenos dado que são um método de controle mais seguro tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (CALVO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014 ).

Os mecanismos de ação (parasitismo, antibiose e competição) da maioria dos agentes de biocontrole de doenças pós-colheita são pouco compreendidos e geralmente assumido que eles envolvem uma complexa interação entre hospedeiro, patógeno, antagonistas e meio ambiente (CAI *et al.*, 2014).

A antibiose consiste na produção de substâncias tóxicas, em baixas concentrações (menores que 10 ppm) por um microrganismo e que atua diretamente sobre outro microrganismo, substâncias estas, que possuem a capacidade de inibição no crescimento e/ou até mesmo de causar a morte do microrganismo. Contudo, não é viável que a antibiose seja o principal mecanismo de ação de um antagonista, visto que, assim como alguns fungicidas sintéticos, há o risco de surgimento de patógenos

resistentes (ALVES, 2007).

A ação de um antagonista por competição se dá, quando há competição de dois ou mais microrganismos por nutrientes essenciais a ambos, onde um deles limita a quantidade de nutriente disponível para o outro. Com isso, há necessidade de que exista escassez de um nutriente para que a competição aconteça, visto que, um excesso do mesmo ocasionaria o desenvolvimento de ambos microrganismos (ALVES, 2007). Bem como a competição por nutrientes, há também a competição por espaço, na qual, os antagonistas necessitam ter a capacidade de crescer mais rapidamente do que o patógeno no fruto, do mesmo modo, devem ter a capacidade de sobreviver mesmo sob condições desfavoráveis ao patógeno (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009).

O mecanismo de ação por parasitismo direto, envolve uma relação nutricional, onde o parasita, adquire todo ou parte de seus nutrientes a partir do microrganismo hospedeiro (MACHADO *et al.*, 2012).

Alguns produtos, como o BIOSAVE II (*Pseudomonas syringae*) e ASPIRE (*Candida oleophila*), têm apresentado bons resultados contra fungos deteriorantes e micotoxigênicos (COELHO *et al.*, 2003).

De acordo com Kilani-Feki *et al* (2016), uma alternativa para o controle biológico do mofo cinzento, é o uso de antagonistas em pré e pós-colheita. Dentre a variedade de antagonistas, incluem-se os agentes promissores, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Candida oleophila*, *Streptomyces* spp., *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*.

Segundo Janisiewicz e Korsten (2002), a estratégia principal usada para suprimir as doenças pós-colheita é a aplicação de antagonistas na prevenção dos patógenos que infectam as feridas das frutas após a colheita, porém, as doenças de pós-colheita também podem ser suprimidas realizando aplicações a campo destes agentes de biocontrole.

### 2.3.2 Leveduras como Agentes de Biocontrole

A utilização de leveduras como agentes de controle de doenças iniciou no final dos anos 80 e início do século XX, onde uma gama de antagonistas microbianos foram evidenciados como possíveis agentes de controle de vários

patógenos de frutas (GOUVEA, 2007).

As leveduras, sejam elas ascomicetos, como espécies de *Pichia* spp., *Candida* spp. entre outras, ou basidomicetos, como exemplo *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula* spp., são caracterizadas por brotação ou fissão como o principal meio de reprodução assexual, e que não formam seus estados sexuais dentro ou sobre um corpo de frutificação (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

A parede celular das leveduras é composta por três principais grupos de polissacarídeos:  $\beta$ - glucana ( $\beta$ -1,3 glucana e  $\beta$ -1,6 glucana), o qual é o composto maioritário, seguido de mananaproteínas e quitina (XIE; LIPKE, 2010; FLEURI, 2006).

As leveduras possuem características que as tornam candidatas para o biocontrole de fitopatógenos, pois possuem características genéticas relativamente estáveis, não necessitam de nutrientes específicos para sua multiplicação rápida, apresentam resistência a condições ambientais adversas, são efetivas contra uma vasta gama de patógenos de frutos, não produzem metabólitos ou micotoxinas que afetem a saúde humana e não são muito afetados por pesticidas (RUIZ-MOYANO *et al.*, 2016).

O principal modo de ação das leveduras é a competição por nutrientes e a indução de resistência (BETTIOL; GHINI, 2009). Possuem grande capacidade de reprodução, reproduzindo-se sexuadamente com a formação de esporos ou de forma assexuada, a qual envolve brotamento, gemulação ou fissão binária (BLUMER, 2002).

Outro método de biocontrole *in vitro* se dá pela produção, por parte de microrganismos antagonistas, de compostos orgânicos voláteis, que são compostos químicos com baixo peso molecular, alta pressão de vapor e baixa solubilidade em água, geralmente, terpenoides, fenilpropanoides, derivados de ácidos graxos (DI FRANCESCO *et al.*, 2015). Os compostos voláteis são antimicrobianos ideais, pois seu espectro de atividade se estende da interação proximal através da difusão de água até maiores distâncias via difusão de ar (SPADARO; DROBY, 2016).

As leveduras estão presentes na microbiota epifítica de frutas, endofítica e no solo e se tornaram promissoras no controle de doenças. Algumas espécies que tem sido investigadas em relação ao seu potencial como agentes de biocontrole são: *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Meyerozyma caribbica*, *Candida carpophila*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Cryptococcus laurentii*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp. e *Sporobolomyces* spp. (MELLO *et al.*, 2011; RUIZ-

MOYANO, *et al.*, 2016).

De acordo com Zhou *et al* (2014), um exemplo de levedura antagonista, é a *Pichia membranifaciens*, que possui a capacidade de eliminar os bolores azuis e verdes encontrados em frutas cítricas pela competição por nutrientes e espaço nas feridas dos frutos, e por produzir duas toxinas *killer* (PMKT e PMKT2) que atuam contra leveduras e fungos ( SPADARO; DROBY, 2016).

Di Francesco *et al* (2015), utilizando cepas de *Aureobasidium pullulans*, no controle *in vitro* de *Penicillium* spp., constatou que a germinação de conídios foi inibida pela produção de compostos orgânicos voláteis produzidos pelas cepas de *A. pullulans*. Demonstrou também que *Penicillium* spp. foi o fungo mais sensível aos compostos antifúngicos voláteis emitidos pelas cepas de *A. pullulans*, diferente da baixa inibição exercida sobre *B. cinerea* e *C. acutatum*.

#### 2.3.2.1 Fator *killer*

Leveduras com a presença do fenótipo *killer* produzem toxinas *killer* que possuem a capacidade de matar células microbianas sensíveis a essa toxina (PLATANIA *et al.*, 2011). Sendo que *Saccharomyces cerevisiae* foi a primeira levedura na qual foi descrito pela primeira vez o fenótipo *killer* (CECCATO-ANTONINI; TOSTA; SILVA, 2004).

As toxinas *killer* podem causar a morte das células pela interrupção da função da membrana citoplasmática, interferindo na síntese da parede celular, inibindo a  $\beta$ -1,3- glucana sintetase, bloqueando a síntese de DNA ou inativando a divisão celular (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012; İGZÜ; ALTINBAY, 2004).

No entanto, a maior parte das proteínas *killer* somente são ativadas quando se encontram em uma faixa estreita de temperatura e pH, dificultando a aplicação em muitos ambientes (DRUVEFORS, 2004).

Segundo Champagne, Savard e Beaulieu (2017) o fator *killer* é muito conhecido, sendo detectado em aproximadamente 30% das cepas de leveduras isoladas. Essas leveduras, secretam ao meio substâncias proteicas para as quais as cepas são imunes. *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, são exemplos de gêneros de leveduras com o fator *killer*.

Pode-se observar em *S. cerevisiae*, três toxinas *killer* - K1, K2 e K28.

K1 e K2 possuem atividades idênticas, podendo se ligar aos componentes de  $\beta$ -1,6-D-glucana nas paredes das células sensíveis, rompendo a barreira de exclusão de íons da membrana plasmática da célula alvo. A K28 liga-se a resíduos de manose ligados por ligações  $\alpha$ -1-3 na monoproteína das paredes celulares das cepas sensíveis inibindo a síntese de DNA (PLATANIA *et al.*, 2011).

Moura (2017), constatou que a proteína K5 produzida por *Pichia anomala*, trata-se de uma exo  $\beta$ -1,3 glucanase que possui atividade antifúngica.

*Lachancea thermotolerans* é considerada uma levedura de baixa fermentação, e possui um alto potencial como agente de biocontrole, descontaminante e conservante contra fungos e suas micotoxinas (ZEIDAN *et al.*, 2018).

Ferreira-Saab *et al* (2018) indicaram que os compostos liberados por *Hanseniaspora opuntiae*, além de inibir o crescimento de *Corynespora cassiicola in vitro*, também podem ser utilizados como elicitores e agentes de biocontrole em plantas de soja. Ruiz-Moyano *et al* (2016), evidenciaram que dois isolados de *Hanseniaspora opuntiae* e *Metschnikowia pulcherrima*, apresentaram halos de inibição do crescimento micelial de *Penicillium expansum*, *Cladosporium cladosporioides*, *B. cinerea* e *Monilia laxa*, tornando-as potenciais agentes de biocontrole.

### 2.3.3 Enzimas Líticas Extracelulares produzidas por leveduras

As enzimas líticas estão envolvidas na lise da parede celular de fungos e de leveduras, sendo capazes de serem utilizadas na produção de diversos produtos intracelulares ligados à célula e também na eficácia de biocontrole de microrganismos patogênicos (FLEURI; SATO, 2010).

A parede celular dos fungos é composta por  $\beta$ -glucanas e quitina, tornando suscetível à atividade das enzimas glucanases e quitinases que são produzidas por bactérias, leveduras e outros microrganismos (BAUERMEISTER *et al.*, 2010; FLEURI; SATO, 2008). As  $\beta$ -1,3-glucanase assim como quitinases e algumas hidrolases, estão associadas com a quebra de ligações intra e inter poliméricas que constituem a parede celular de fungos. Para ocorrer a lise da parede celular fúngica, a protease deve atuar primeiro, e/ou em sinergismo com  $\beta$ -1,3-glucanase, onde a protease degrada a camada externa de mananaproteína e as  $\beta$ -1,3-glucanases

degradam a camada interna de glucana (FLEURI; SATO, 2010),

Conforme Bar-Shimon *et al* (2004), a capacidade que as leveduras possuem em produzir exo- $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase, está relacionada à firme fixação das células da leveduras nas hifas fúngicas e à degradação parcial dos micélios fúngicos.

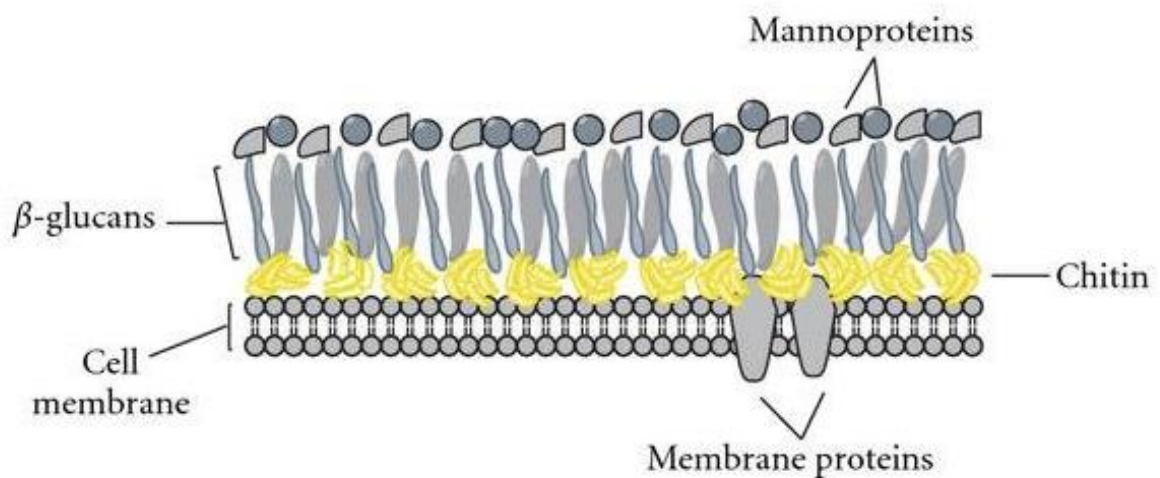
A parede celular das leveduras é constituída por  $\beta$ -glucana ( $\beta$ -1,3 glucana e  $\beta$ -1,6 glucana), mananaproteínas e uma pequena quantidade de quitina, promovendo rigidez e o transporte de nutrientes para o citoplasma propiciando a integridade, o metabolismo e o crescimento celular (FLEURI; SATO, 2008; SANTOS, 2000). É uma estrutura dinâmica e ajustável durante todo o ciclo celular, principalmente frente às condições ambientais adversas, disponibilidade de nutrientes, O<sub>2</sub>, temperatura e pH (FLEURI; SATO, 2005).

Os fitopatógenos são uma fonte importante de genes que codificam enzimas despolimerizadoras da parede celular vegetal, já que estes secretam uma vasta gama destas enzimas durante a penetração e colonização do tecido da planta (LARA-MÁRQUEZ, *et al.*, 2011; NAKAGAWA *et al.*, 2004).

A enzima lítica  $\beta$ -1,3 glucanase catalisa a reação da hidrólise das ligações  $\beta$ -D-glicosídicas da  $\beta$ -1,3 glucana. Atua sobre laminarina, paramylona (polissacarídeo de ocorrência natural) e pachyman (  $\beta$ -1,3-glucana insolúvel). A protease possui a capacidade de catalisar a reação de hidrólise de proteínas, atuando sobre elastina. As quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases podem degradar os componentes da parede celular de muitos fungos e também podem atuar liberando fragmentos da parede celular que induzem a resposta ativa do hospedeiro (FLEURI; SATO, 2005; SOUSA, 2008).

A pectina é um dos principais constituintes da parede celular primária e da lamela média das células vegetais. As enzimas pectina-liases e pectato-liases demonstram diferentes especificidades, enquanto pectina-liases degradam os polímeros de pectina diretamente por um mecanismo que resulta na formação de oligogalacturonídeos 4,5-insaturados, as pectato-liases, utilizando um mecanismo semelhante, utilizam ácido poligalacturônico como substrato e são dependentes de Ca<sup>2+</sup>; assim, ao atuar sobre a pectina, as pectato-liases requerem a ação prévia das enzimas desesterificadoras (PÉREZ-FUENTES; RAVANAL; EYZAGUIRRE, 2014).

Como pode-se observar na Figura 2.1, onde Vega e Kalkum (2011), caracterizam a composição da parede celular fúngica. A parede celular dos fungos contém uma membrana celular com várias proteínas, uma camada de mananaproteínas presente como mais externa, também a presença de uma camada de glucanas (principalmente  $\beta$ -glucanas) e uma camada protetora de quitina (amarela). Em geral, a protease lítica específica que degrada a camada externa de mananaproteínas e a  $\beta$ -1,3 glucanase lítica que degrada a camada interna de glucana (FLEURI; SATO, 2008).



**Figura 2.1** Componentes da parede celular fúngica. As proteases degradam a camada de mananaproteínas,  $\beta$ -1,3-glucanases atuam degradando a camada de  $\beta$ -glucanas e quitinase degradando a camada mais interna de quitina. Diferentes paredes celulares dos fungos contêm diferentes glucanos (VEGA; KALKUM, 2011).

### 2.3.3.1 Proteases

Conforme o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases são classificadas no grupo 3 das hidrolases e subgrupo 4, contudo, as proteases não ocupam-se tão facilmente no sistema geral de nomenclatura em consequência de sua enorme diversidade de ação e estrutura existente. Segundo ao seu local de ação em substratos protéicos, podem ser classificadas como endo- ou exoenzimas (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2017; JISHA *et al.*, 2013).

A protease (3.4.21.12) também denominada de  $\alpha$ -endopeptidase lítica, catalisa a reação de hidrólise de proteínas. Atua preferencialmente sobre

elastina e ligações peptídicas envolvendo Ala+ e Val+ de proteínas da parede celular (FLEURI; SATO, 2005; FLEURI, 2006; SOUSA, 2008).

As proteínas podem ser degradadas por microrganismos que utilizam os produtos da degradação como nutrientes para sua sobrevivência. Contudo, a degradação é estabelecida por proteinases (endopeptidases) que são secretadas por microrganismos, subsequente de hidrólise por exopeptidases nos locais extra ou intracelulares. Uma vasta gama de proteases são produzidas por microrganismos, de acordo com as espécies ou cepas produtoras (JISHA *et al.*, 2013).

Várias bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são grandes produtores de enzimas para a indústria e a pesquisa. Um exemplo, é o *Bacillus licheniformis* que possui a capacidade de crescer usando várias fontes de nutrientes, além do mais produzem e excretam várias enzimas hidrolíticas e produzem principalmente proteases alcalinas e neutras (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2017).

#### 2.3.3.2 $\beta$ -1,3-glucanases

As enzimas de hidrolisação de  $\beta$ -(1,3)-glucano podem ser divididas em exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, que liberam resíduos de glicose únicos do lado não redutor, e endo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, clivam dentro de uma cadeia de glucana de uma maneira mais aleatória. A  $\beta$ -1,3-glucanase possui um papel estrutural essencial na parede celular dos fungos, desempenhando um papel significativo nos eventos morfogenéticos durante a vida fúngica (MOUYNA *et al.*, 2016; MOUYNA; HARTL; LATGÉ, 2013).

A enzima lítica  $\beta$ -1,3 glucanase catalisa a reação da hidrólise das ligações  $\beta$ -D-glicosídicas da  $\beta$ -1,3 glucana. Atua sobre laminarina, paramylona (polissacarídeo de ocorrência natural) e pachymanana ( $\beta$ -1,3-glucana insolúvel) (FLEURI; SATO, 2005; SOUSA, 2008).

A atividade antifúngica de  $\beta$ -1,3-glucanases provem de sua ação catalítica na hidrólise do polímero de  $\beta$ -1,3-glucana, componente estrutural da parede celular de muitos fungos (BALBI-PEÑA, 2010).

### 2.3.3.3 Quitinases

As quitinases são classificadas nas famílias 18 e 19 da glicosil hidrolases baseada na conservação das sequências de aminoácidos. É composta de várias proteínas encontradas em uma ampla variedade de organismos, incluindo plantas, bactérias, fungos, insetos, protozoários e mamíferos (JUNGES, 2010).

Catalisa reações de hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina da quitina e de quitodextrinas. São classificadas em duas classes, as endoquitinases, que clivam a quitina em sítios aleatórios no interior do polímero liberando quito-oligossacarídeos, e as exoquitinases, que clivam a quitina a partir da sua extremidade não-redutora, liberando dímeros de N-acetilglicosamina (FLEURI, 2006; FLEURI; JUNGES, 2010; SATO, 2005; SOUSA, 2008).

Muitas quitinases já foram caracterizadas e são utilizadas na degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos. Como exemplo, diferentes espécies do gênero *Trichoderma* possuem quitinases que já foram descritas e que atuam diretamente sobre a parede celular de outros fungos (JUNGES, 2010).

Evolutivamente, a produção de quitinase desempenha um papel importante nos ciclos de vida de organismos contendo quitina, como fungos, insetos e crustáceos, nos quais está envolvida na remodelação ou muda da parede celular. No entanto, como os mamíferos não produzem quitina, a função fisiológica dessas quitinases e chilectinas permanece incerta, mas vários estudos sugerem que sua função pode estar na digestão de alimentos que contêm quitina e na defesa contra patógenos e parasitas que contêm quitina (VEGA; KALKUM, 2011). Nas plantas, as quitinase atuam na defesa contra fungos fitopatogênicos, resposta a estresse e no seu desenvolvimento (JUNGES, 2010).

### 2.3.3.4 Pectinases

As substâncias pécticas e celulosas são os carboidratos mais numerosos nas plantas. Pectinas, protopectinas e ácidos pécticos, estão presentes na parede celular e na lamela média, contribuindo com a firmeza e estrutura para os tecidos vegetais. Várias formas de substâncias pécticas se encontram presentes nas células vegetais, com isso, há varias formas de pectinases existentes (GUMMADI;

PANDA, 2003; KASHYAP *et al.*, 2001).

Quimicamente, são polissacarídeos de ácido coloidal complexo, com uma rede de resíduos de ácido galacturônico com ligações  $\alpha$ -1,4, onde as cadeias laterais da molécula de pectina consistem em L-ramnose, arabinose, galactose e xilose (KASHYAP *et al.*, 2001).

As pectinases atuam degradando substâncias pécticas para fins nutricionais sendo responsáveis pela patogênese, simbiose e decomposição das plantas (HOONDAL *et al.*, 2002). As pectinases podem ser classificadas em três classes: pectinaesterases, enzimas depolimerizantes (hidrolases, liases) e protopectinases, conforme os seguintes critérios de classificação: (a) se a pectina, ácido péctico ou oligo-D-galacturonato é o substrato favorito; (b) se as enzimas agem por eliminação trans ou por hidrólise; ou (c) se a clivagem exercida é aleatória ( as enzimas endo-, liquefazíveis ou despolimerizantes) ou 'final' ( enzimas exo- ou sacarificadoras) (HOONDAL *et al.*, 2002).

### 3 ARTIGO A: AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *BOTRYTIS CINEREA* EM MORANGO E *PENICILLIUM DIGITATUM* EM LARANJA

#### 3.1 Resumo

O mofo cinzento em morango, causado por *Botrytis cinerea* e o bolor verde dos citros, causado por *Penicillium digitatum* estão dentre as doenças pós-colheita mais importantes dessas culturas. O controle biológico utilizando leveduras antagonistas, tem-se tornado uma alternativa aos fungicidas sintéticos, pois é um método de controle mais seguro tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar se as cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA0760), *Pichia manshurica* (CCMA0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA0763) são capazes de controlar o crescimento de *P. digitatum* e *B. cinerea* em condições *in vitro* e o bolor verde e o mofo cinzento em condições *in vivo*. Em testes de laboratório foram investigados o antagonismo a *P. digitatum* e *B. cinerea* em placa, a atividade *killer* e a atividade de enzimas líticas extracelulares (quitinase,  $\beta$ -1,3- glucanase, pectinase, protease e gelatinase) das leveduras. Nos testes *in vivo*, frutos de laranja e morango foram inoculados com *P. digitatum* e *B. cinerea* e 2h após foram tratados com as suspensões de leveduras. Os frutos de citros foram mantidos por 10 dias e o de morangos por 5 dias a 25°C. Os dados de incidência e severidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas de pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Apenas a cepa de levedura *P. manshurica* (CCMA0762) apresentou efeito positivo ao fator *killer*. Os compostos voláteis de todas as cepas testadas apresentaram efeito significativo no crescimento micelial (CM) de *B. cinerea*. A cepa CCMA0763 se destacou em relação as outras cepas apresentando uma redução de 41,47% na porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%) para *B. cinerea*. Já para *P. digitatum* apenas a cepa CCMA0763 apresentou efeito significativo, com uma redução de 19,87% no ICM% em relação ao controle. Para os testes de antagonismo em placa, todas as cepas apresentaram efeito significativo no crescimento micelial de *B. cinerea*, contudo, a cepa CCMA0759, se destacou apresentando uma redução de 50,8% no ICM%. Para *P. digitatum* todas as cepas tiveram efeito significativo sobre o patógeno, no entanto, as cepas CCMA0762 e CCMA0759 se destacaram, apresentando uma redução de 24,52 e 23,24% no ICM%, respectivamente. A respeito da produção de enzimas extracelulares, apenas *P. manshurica* (CCMA0762) apresentou atividade proteolítica e somente a cepa *L. thermotolerans* (CCMA 0763) manifestou atividade pectinolítica. *P. manshurica* (CCMA0762) e *L. thermotolerans* (CCMA 0763) apresentaram atividade  $\beta$ -1,3-glucanase e baixa atividade de gelatinase. Nenhuma cepa hidrolisou quitinase. Nos testes *in vivo*, a % de incidência de mofo cinzento se mantiveram baixos até 48h após inoculação, contudo a partir de 72 h, apenas a levedura *P. caribbica* (CCMA0759) manteve uma menor incidência de mofo cinzento., nenhuma cepa testada apresentou efeito no controle do bolor verde em frutos de citros.

**Palavras-chave:** Antagonismo, bolor verde dos citros, *Hanseniaspora opuntiae*, *Lachancea thermotolerans*, mofo cinzento dos morangos, *Pichia caribbica*, *Pichia manshurica*

#### 3.2 ABSTRACT

Green mold of citrus, caused by *Penicillium digitatum* and gray mold in strawberry, caused by *Botrytis cinerea*, are among the most important post-harvest diseases of these crops. Biological control using antagonistic yeasts has become an alternative to synthetic fungicides, as it is a safer control method for both human health and the environment. The objective of this work was to investigate whether *Pichia caribbica* (CCMA0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA0760), *Pichia manshurica* (CCMA0762) and *Lachancea thermotolerans* (CCMA0763) yeast strains are able to restrain both *P. digitatum* and *B. cinerea* growths under *in vitro* conditions. In laboratory tests, antagonism to *P. digitatum* and *B. cinerea*, killer activity and activity of extracellular lytic enzymes (chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, pectinase, protease and gelatinase) of yeasts were investigated. Related to the *in vivo* experiments, orange and strawberry fruits were inoculated individually with *P. digitatum* and *B. cinerea*, respectively, and after 2 h, fruits were treated with yeast suspensions. Orange fruits were kept for 10 days whereas strawberries for five days at 25 C°. Data of incidence and severity were submitted to analysis of variance and Tukey test ( $p < 0,05$ ). *P. manshurica* (CCMA0762) was the only strain that was *killer* factor positive. Volatile compounds from all yeast strains inhibited *B. cinerea* mycelial growth. The highest effect was exerted by CCMA0763 strain with an inhibition mycelial growth (IMG) of 41,47%. CCMA0763 strain was the only one that had a significant effect on *P. digitatum* by volatiles, showing 19,87% of IMG %. In relation to the antagonism tests, all yeast strains showed significant effect on *B. cinerea* IMG. CCMA0759 strain exerted the highest reduction of mycelial growth (50,8%). All yeast strains displayed significant effect over *P. digitatum*. The highest effect was exerted by CCMA0762 and CCMA0759 with 24,52 and 23,24% of IMG, respectively. Regarding the production of extracellular enzymes, only *P. manshurica* (CCMA0762) showed proteolytic activity and only *L. thermotolerans* strain (CCMA 0763) showed pectinolytic activity. *P. manshurica* (CCMA0762) and *L. thermotolerans* (CCMA 0763) showed  $\beta$ -1,3-glucanase activity and low gelatinase activity. In *in vivo* tests, the gray mold incidence remained low until 48h after inoculation, however after 72 h, only the yeast *P. caribbica* (CCMA0759) maintained a lower incidence of gray mold. However, no tested strain had an effect on the control of green mold in oranges.

**Key words:** Antagonism, citrus green mold, gray mold of strawberry, *Hanseniaspora opuntiae*, *Lachancea thermotolerans*, *Pichia caribbica*, *Pichia manshurica*

### 3.3 Introdução

As perdas na pós-colheita de frutas e hortaliças podem atingir valores muito altos, representando mais de 25% da produção total nos países industrializados e mais de 50% nos países em desenvolvimento quando as condições de manuseio e armazenamento pós-colheita não forem ideais. Nos frutos, muitas dessas perdas são causadas pelo ataque de vários patógenos fúngicos tais como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium*, *Mucor*, *Monilia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, dentre outros gêneros (NUNES, 2012).

Durante décadas, fungicidas sintéticos foram utilizados para controlar doenças causadas por fungos. No entanto, o enrijecimento das políticas regulatórias mundiais e a demanda por reduzir sua aplicação, devido a efeitos prejudiciais ao meio ambiente e aos seres humanos e ao surgimento de populações de patógenos resistentes, levaram à busca de novas alternativas de controle (COELHO *et al.*, 2011; FEEREIRA-SAAB *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2014).

Em morangos, o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*, junto com a podridão de *Rhizopus*, são as doenças pós-colheita mais importantes da cultura. O fungo *B. cinerea*, pode atacar flores, frutos e folhas. A infecção pode acontecer ainda no estágio de floração, o fungo ficar inativo até os frutos alcançarem o ponto de amadurecimento para depois infectar e se desenvolver abundantemente, causando a deterioração dos frutos e esporulação abundante do patógeno (DONMEZ, *et al.*, 2011).

Dentre as doenças de pós-colheita dos citros, os bolores são economicamente as mais importantes, sendo causados por três espécies do gênero *Penicillium*, contudo as espécies mais comuns nas regiões produtoras são *P. italicum* e *P. digitatum*. Os fungos deste gênero acarretam danos, tanto em pomares, quando o fruto se encontra no final da maturação, quanto em pós-colheita (FEICHTENBERGER *et al.*, 2005).

O bolor verde, causado por *P. digitatum* causa podridão mole nos frutos cítricos que se iniciam por anasarcas na superfície da casca, que se desenvolvem rapidamente até tomar todos o fruto. O fungo desenvolve um micélio branco sobre o tecido afetado que posteriormente cobre-se por uma densa massa de esporos de cor esverdeada. *P. digitatum* produz várias toxinas que afetam a produção

de suco e a saúde humana (BASSANEZI *et al.*, 2016; BRUNETTO *et al.*, 2018; PALOU, 2014).

Existem vários estudos sobre o uso de agentes de biocontrole para controlar podridões de frutas causadas por *Penicillium* spp., muitos deles utilizando leveduras (ALOUJ *et al.*, 2015; CIRVILLERI *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-ESTRADA *et al.*, 2017; LAHLALI, SERRHINI, JIJAKLI, 2004; PANEBIANCO *et al.*, 2015; PLATANIA *et al.*, 2011; RESTUCCIA *et al.*, 2006; TAQARORT *et al.*, 2008). O uso de leveduras é vantajoso, pois são caracterizadas por alta capacidade inibitória, rápida colonização de ferimentos nos frutos, produção de compostos orgânicos voláteis, apresentam exigências nutricionais simples e são capazes de colonizar superfícies secas por longos períodos (PARAFATI *et al.*, 2016). Além disso, o papel das leveduras antagonistas na influência de marcadores do estresse oxidativo foram relatados como um importante mecanismo de ação que induz resistência do fruto durante a pós-colheita de muitos frutos (CHAN *et al.*, 2007; DROBY *et al.*, 2002; MACARISIN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011), incluindo frutos de tangerina (GUO *et al.*, 2014)

As leveduras possuem diferentes mecanismos de biocontrole, dentre os que se destacam: competição por espaço e nutrientes, parasitismo e produção de proteínas extracelulares, atividade *killer*, indução de resistência nos tecidos das frutas através de elicitores secretados pelos agentes de biocontrole (ORO *et al.*, 2017).

O objetivo geral deste trabalho foi determinar características bioquímicas das cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) e investigar se são capazes de controlar o crescimento de *P. digitatum* e *B. cinerea* em condições *in vitro* e o bolor verde e o mofo cinzento em condições *in vivo*.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Manutenção das Cepas de Leveduras e Isolados de Fungos Patogênicos

A manutenção das cepas de leveduras e dos isolados de fungos patogênicos foram realizados no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL. Utilizaram-se quatro cepas de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA

0760) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) provenientes da Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola - CCMA, situada no Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As leveduras foram mantidas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (15 g L<sup>-1</sup> de ágar, 20 g L<sup>-1</sup> de dextrose, 200 g L<sup>-1</sup> de batata) a 25°C e fotoperíodo de 12h.

O fungo *Penicillium digitatum* foi isolado da superfície de frutos de laranja e o fungo *Botrytis cinerea* foi isolado a partir da superfície de frutos de morango, ambos contendo sinais e sintomas típicos dessas doenças.

### 3.4.2 Ensaio *in vitro*

#### 3.4.2.1 Determinação da atividade *killer*

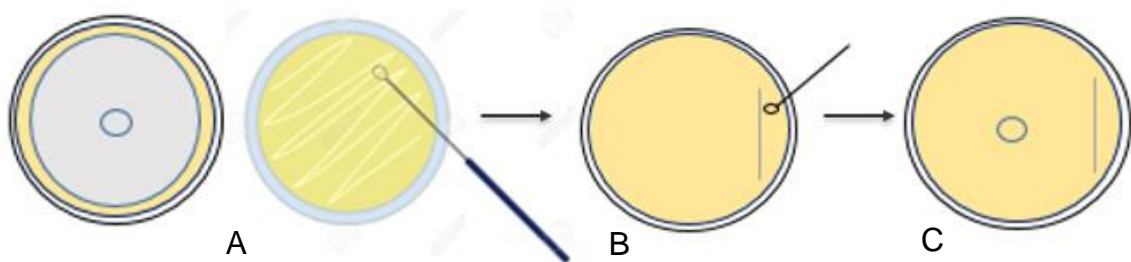
A atividade *killer* foi testada em triplicata em YEPD com 0,003% de azul de metileno e tamponada com tampão citrato 0,01M a pH 4,2 (LIMA *et al.*, 2012). As linhagens *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) e *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006), que são cepas sensíveis às micotoxinas mais conhecidas, foram cultivadas durante 24h a 28°C em YM ágar (levedura-malt-ágar) e depois suspendidas em água destilada estéril a 4x10<sup>5</sup> cél. mL<sup>-1</sup> e espalhadas na superfície do meio com swab. As cepas de leveduras a serem testadas para a produção da micotoxina foram cultivadas como descrito previamente e estriadas em meio previamente inoculado com as cepas sensíveis. As placas foram incubadas a 28°C e observadas diariamente por 3 dias. As cepas foram consideradas micotoxigênicas quando provocarem uma zona de inibição sem crescimento e zonas azuis adjacentes indicativas da morte celular da cepa sensível. As cepas NCYC 232 e NCYC 732 de *S. cerevisiae* foram empregados como controles positivos conhecidos por ter atividade micotoxigênica. As leveduras utilizadas como sensíveis e como possuindo o fator *killer* são provenientes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### 3.4.2.2 Determinação da atividade antagonista em placa

As leveduras antagonistas e os fungos fitopatogênicos foram

respectivamente cultivados em YEPD por 48-72h e em BDA por 7 dias a 25°C. Para avaliar a atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos, uma alçada de leveduras foi estriada paralelamente a borda da placa, conforme Figura 3.1.

Após incubação a 25°C por 48h, discos miceliais (6 mm de diâmetro) dos fungos foram adicionados nas placas a 3 cm de distância do inóculo da levedura. Uma placa controle apenas inoculada com os fungos também foi preparada (PARAFATI *et al.*, 2015). O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições.



**Figura 3.1.** Esquema de estriamento das leveduras e deposição do disco micelial para determinação da atividade antagônica em placas. (A) placas contendo fungo fitopatogênico e leveduras, (B) estriamento da levedura paralelamente a borda da placa, (C) placas contendo o disco micelial fúngico a 3 cm da levedura.

**Fonte:** o autor.

No final do período de incubação a 25°C a redução do crescimento micelial foi calculada em relação ao crescimento do controle utilizando a seguinte equação:

$$\text{ICM}(\%) = \frac{(\text{DTC} - \text{DTL})}{\text{DTC}} \times 100$$

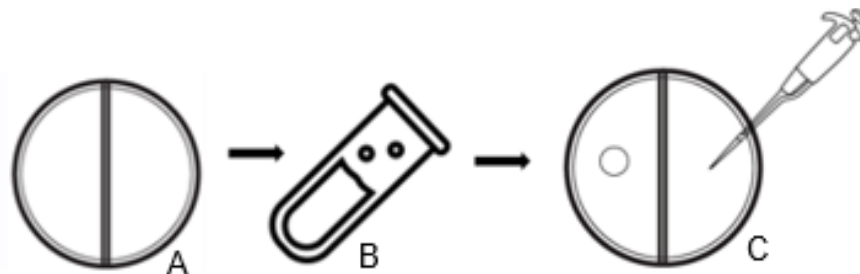
Onde, ICM (%) representa a porcentagem de inibição do crescimento micelial radial, DTC equivale ao diâmetro no tratamento controle e o DTL o diâmetro no tratamento com leveduras (GARCIA *et al.*, 2012). Para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{IVCM} = \sum \frac{(D - D_a)}{N}$$

Onde, D é o diâmetro médio atual da colônia,  $D_a$  o diâmetro médio da colônia no dia anterior e N o número de dias após incubação (OLIVEIRA, 1991). Os experimentos foram repetidos três vezes.

### 3.4.2.3 Determinação da produção de compostos voláteis

Os fungos *P. digitatum* e *B. cinerea* foram cultivados simultaneamente com as cepas de leveduras em placas bipartidas para impedir que exsudatos não voláteis produzidos pela levedura tenham contato com os fungos através do meio de cultura. Para isso, um disco micelial de 5 mm de diâmetro de *P. digitatum* ou *B. cinerea* foi depositado em um dos lados da placa contendo meio de cultura BDA, e do outro lado, 50  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de leveduras ( $3,0 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ) foi espalhada na superfície do meio com alça de Drigalsky, conforme Figura 3.2. As placas foram incubadas a  $25^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h, sendo avaliado diariamente o diâmetro da colônia fúngica.



**Figura 3.2.** Esquema de montagem das placas para a determinação da produção de compostos voláteis. (A) placas bipartidas, (B) Suspensão de leveduras  $3,0 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ , (C) deposição do disco micelial e aplicação da suspensão de leveduras em lados opostos da placa.

**Fonte:** o autor.

O crescimento dos fungos foi avaliado até que o tamanho da colônia fúngica nas placas controle (sem a presença da levedura) alcançou as bordas da placa (FERRAZ, 2014). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições. O experimento foi repetido 3 vezes.

### 3.4.2.4 Determinação qualitativa de enzimas líticas extracelulares

#### 3.4.2.4.1 Determinação qualitativa da atividade quitinase

Foi realizada em meio sólido com quitina coloidal (pH 7) acrescido de sais minerais seguindo o método relatado por Souza *et al.* (2009). Para a preparação da quitina coloidal 5g de pó de quitina foram adicionados lentamente a 60 ml de HCl concentrado e deixados à temperatura ambiente durante a noite, com agitação

vigorosa. A mistura foi adicionada a 200 mL de etanol 95% gelado e incubada durante a noite à temperatura ambiente, com agitação vigorosa. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 5000g durante 20 min a 4°C e transferido para um funil de vidro com papel de filtro (80 g/m). Lavou-se a quitina coloidal com água destilada estéril até a quitina coloidal se tornar neutra (pH 7,0). A quitina coloidal retida em papel de filtro foi removida, pesada e armazenada no escuro a 4°C. O meio mínimo continha (g L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (1,0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (0,2); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (1,6); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (0,2); NaCl, (0,1); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (0,01); CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, (0,02). O experimento foi realizado com meio mínimo contendo 1,5% (p/v) de ágar acrescido com 1,2% (p/v) de quitina coloidal. O pH final foi ajustado para 7,0 ± 0,5 e esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C. O experimento foi inteiramente casualizado com 5 repetições.

A atividade extracelular de quitinase foi detectada diariamente por 7 dias a 25 °C, pela presença de uma zona clara ao redor da zona de inóculo.

#### 3.4.2.4.2 Determinação qualitativa de β-1,3- glucanase

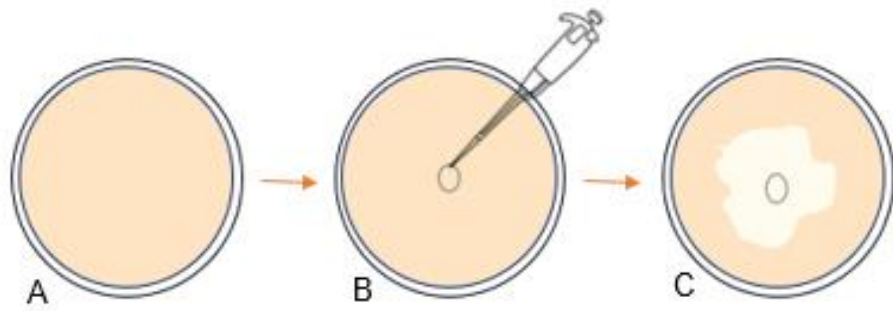
A atividade β-1,3-glucanase foi determinada em meio sólido contendo 5 g L<sup>-1</sup> de laminarina e 6,7 g L<sup>-1</sup> YNB (levedura nitrogênio base) (LUTZ *et al.*, 2013), o meio foi autoclavado por 15 min a 121°C. Após 72 h de incubação a 25 °C, as placas foram coradas com Vermelho Congo (0,6 g L<sup>-1</sup>) e deixadas a temperatura ambiente por 90 min. O corante não absorvido decantou e a hidrólise da glucana foi observada como uma zona amarelo-alaranjada ao redor das colônias.

#### 3.4.2.4.3 Determinação qualitativa da atividade pectinase

A atividade de pectinase foi determinada em meio sólido contendo 6,7 g L<sup>-1</sup> de YNB e 10 g L<sup>-1</sup> de pectina cítrica (BUZZINI e MARTINI, 2002), onde o meio foi autoclavado por 15 min a 121°C e vertidos em placas de petri. As placas foram incubadas durante 3-5 dias e depois inundadas com uma solução aquosa a 1% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (10 g L<sup>-1</sup>). Um halo claro em torno da colônia em comparação com meio opaco indicará degradação da pectina.

#### 3.4.2.4.4 Determinação qualitativa da atividade protease

A atividade de protease foi determinada em meio sólido contendo 10% de leite em pó desnatado, 2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% dextrose e 2% de ágar (GARDINI *et al.*, 2006), esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min e depois vertido em placas de Petri. Após o resfriamento, o meio foi inoculado superficialmente com o auxílio de uma pipeta eletrônica, 50µL de cada cepa de levedura oriundas de um cultivo overnight a 25° C, conforme Figura 3.3. As placas foram incubadas a 25°C e examinadas diariamente por 1 semana. O experimento foi realizado duas vezes. A atividade enzimática foi detectada quando verificado um halo claro ao redor da zona de inóculo.



**Figura 3.3.** Esquema de montagem das placas para a determinação da atividade proteolítica. (A) placas contendo meio de cultura com leite desnatado, (B) aplicação da suspensão de leveduras, (C) determinação da atividade protease com um halo claro ao redor da levedura.

**Fonte:** o autor.

#### 3.4.2.4.5 Determinação qualitativa da atividade de gelatinase

O teste de liquefação da gelatina foi realizado em meio preparado após dissolução de 100 g de gelatina e 5 g de glicose em 1 litro de água desmineralizada. O meio (9 mL) foi vertido em cada tubo, os quais foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Os tubos foram resfriados em posição vertical e inoculados com 50µL de um cultivo overnight a 25°C de cada levedura. Os tubos inoculados foram regularmente examinados durante 3 semanas para verificação da liquefação de gelatina (GARDINI *et al.*, 2006). Após a finalização do experimento, os tubos foram acondicionados por 5 minutos em geladeira, para que, a gelatina mantivesse seu estado sólido e assim realizar a análise do grau de liquefação. A liquefação do meio começa no topo do tubo e move-se para baixo, caracterizando

como não liquefação (ausência do meio liquefeito), liquefação fraca (apenas no topo do meio), liquefação forte ou muito forte (todo o meio liquefeito).

### 3.4.3 Controle de doenças pós- colheita em frutos de morango e laranja

#### 3.4.3.2 Morangos

Os morangos foram desinfetados por imersão em álcool etílico 70% por cerca de 30 segundos, lavados em água destilada estéril e transferidos para toalhas de papel para retirar o excesso de água na superfície do fruto. Foi feita uma lesão em cada fruto de morango, com o auxílio de uma agulha, e aplicado 20  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de hifas a uma concentração  $1 \times 10^5$  hifas  $\text{mL}^{-1}$ , a suspensão foi preparada com a raspagem do micélio de *B. cinerea* em água destilada autoclavada, e posterior trituração das hifas e contagem dos fragmentos de hifas em câmara de Neubauer para determinação da concentração. Os frutos foram tratados duas horas depois com as suspensões de leveduras ( $3,0 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ) (SANTOS *et al.*, 2016). O controle positivo foi composto por frutos tratados com água estéril. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 3 repetições. A unidade experimental foi constituída por 12 frutos. Os frutos foram colocados em bandejas plásticas as quais foram previamente desinfetadas com álcool etílico a 70% e incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12h, por 5 dias.

Foi avaliada a incidência de doença diariamente após a inoculação. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de normalidade e homocedasticidade da variância e as médias comparadas de pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.3.3 Citros

Os frutos foram lavados e desinfetados superficialmente com álcool 70% por 1 min e em hipoclorito de sódio a 0,2% (v/v) por 2 min e em seguida enxaguados com água destilada. Foram feitas lesões nos frutos com o auxílio de um perfurador, em dois pontos equidistantes no fruto (FORNER *et al.*, 2013) e aplicado

20  $\mu\text{L}$  de suspensão de conídios de *P. digitatum* ( $1 \times 10^6$  con.  $\text{mL}^{-1}$ ), que foi preparada a partir da raspagem do micélio de *P. digitatum* em água destilada autoclavada e contagem dos conídios em câmara de Neubauer para o ajuste da concentração. Duas horas depois foram aplicados 20  $\mu\text{L}$  das suspensões de leveduras ( $3,0 \times 10^6$  cél.  $\text{mL}^{-1}$ ). O controle positivo foram frutos tratados com água estéril e frutos sem nenhum tratamento. Após a inoculação e tratamento, os frutos foram colocados em bandejas plásticas envoltas com sacos plásticos transparentes previamente desinfetados com álcool etílico a 70%. As bandejas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12h por 10 dias. A severidade da doença foi avaliada diariamente após inoculação medindo o diâmetro médio de lesões com o auxílio de paquímetro, conforme a equação, % severidade: (diâmetro médio das lesões/altura média dos frutos) x 100. A incidência foi expressa como a porcentagem de frutos observados aos 7 dias após a inoculação (DAI), de acordo com a seguinte equação, % incidência: ( $N^\circ$  de frutos infectados/  $N^\circ$  total de frutos) x 100 (FRANCO; BETTIOL, 2000).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 3 repetições. A unidade experimental foi constituída por 12 frutos. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre o tamanho médio das lesões causadas por *Penicillium*, a área sob a curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Determinação da Atividade *killer*

A atividade *killer* foi investigada através da utilização de meio de cultura YEPD com azul de metileno, onde das 4 cepas testadas neste trabalho, somente a cepa *Pichia manshurica* (CCMA 0762), apresentou atividade *killer*, como pode-se observar na Tabela 3.1, contudo não pode-se evidenciar o halo azul de inibição de crescimento micelial, somente um halo de coloração amarelada o qual pode ser uma degradação parcial do fator *killer* (Figura 3.4 e 3.5).

**Tabela 3.1.** Caracterização da presença do fenótipo *killer* nas leveduras testadas. (+) positivo ao fenótipo *killer*; (-) negativo ao fenótipo *killer*.

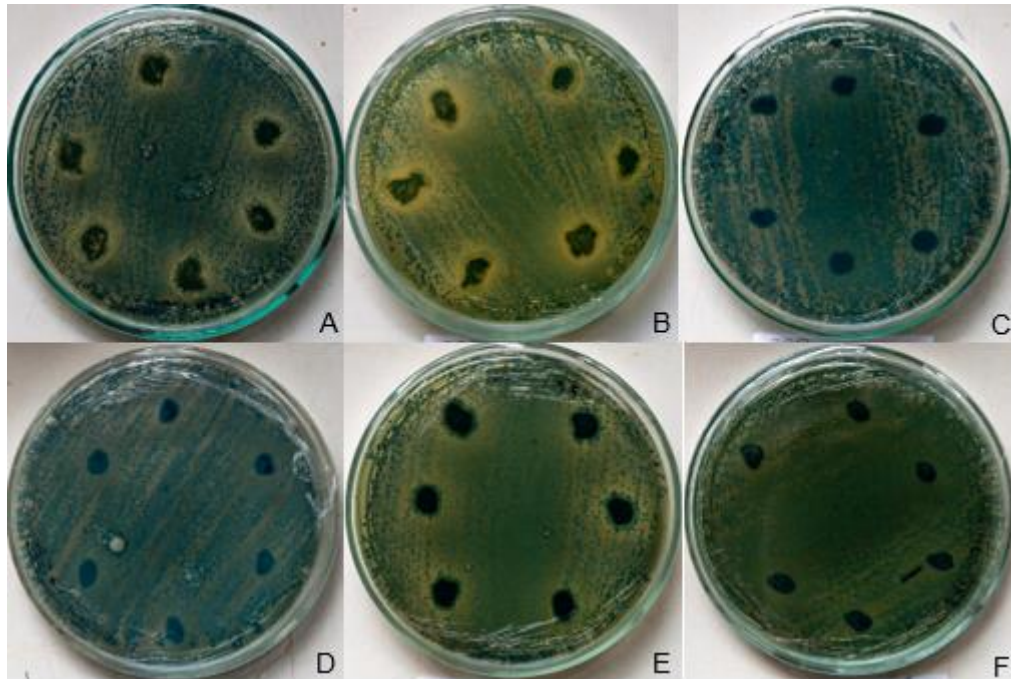
Leveduras	Controle sensível ao fenótipo <i>killer</i>	
	<i>Candida glabrata</i> Y-55 (NCYC 388)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC 1006)
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> NCYC 232 ( <i>killer</i> positivo)	+ <sup>a</sup>	+
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> NCYC 732 ( <i>killer</i> positivo)	+	+
<b><i>Pichia caribbica</i></b> (CCMA 0759)	-	-
<b><i>Hanseniaspora opuntiae</i></b> (CCMA 0760)	-	-
<b><i>Pichia manshurica</i></b> (CCMA 0762)	+	+
<b><i>Lachancea thermotolerans</i></b> (CCMA 0763)	-	-

<sup>a</sup>(+) positivo ao fenótipo *killer*; (-) negativo ao fenótipo *killer*.

Fonte: o autor.

Contudo, pode-se observar que as leveduras utilizadas como controle sensível, *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (Figura 3.4, A e B) e *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (Figura 3.5, A e B), que são sensíveis às micotoxinas mais conhecidas e as cepas NCYC 232 e NCYC 732 de *S. cerevisiae* que são empregados como

controles *killer* positivos, por ter atividade micotoxigênica conhecida, apresentaram o mesmo halo de coloração amarelada.

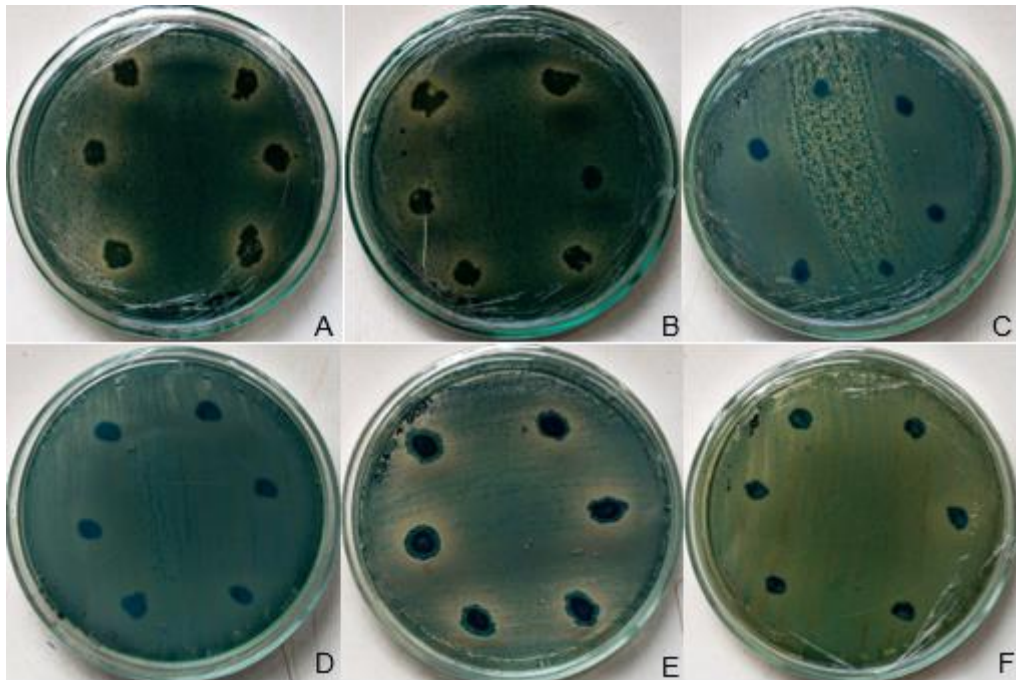


**Figura 3.4** Determinação da atividade *killer*. (A) Controle *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Saccharomyces cerevisiae* 232(+) (B) Controle *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Saccharomyces cerevisiae* 732 (+) (C) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (D) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (E) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (F) *Candida glabrata* Y-55 (NCYC 388) (-) vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

Lima *et al* (2012) verificaram que de 580 linhagens de leveduras estudadas, apenas 29 pertencentes a 5 espécies diferentes, *Kodamaea ohmeri*, *Wickerhamomyces anomallus*, *Pichia kluyveri*, *Candida aaseri* e *Meyerozyma guilliermondii*, produziram um halo de inibição sem crescimento celular e/ou um halo azul de morte celular. Nesse trabalho, foram consideradas leveduras antagonistas mas não cepas com atividade *killer* quando formavam um halo de inibição evidente, mas o halo azul de morte celular não era constatado.

Csoma *et al* (2010), em estudo sobre a diversidade biológica de *Saccharomyces* spp., provenientes de fermentação espontânea de vinhos, elucidaram que de 85 cepas, apenas uma cepa de *S. uvarum* e uma cepa de *S. cerevisiae* apresentaram fenótipo *killer*.



**Figura 3.5** Determinação da atividade *killer*. (A) Controle *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-) vs. *Saccharomyces cerevisiae* 232(+) (B) Controle *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-) vs. *Saccharomyces cerevisiae* 732 (+) (C) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-) vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (D) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-) vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (E) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-) vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (F) *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) (-) vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

Bajaj, Raina e Singh (2013), dentre 65 cepas de leveduras isoladas de solo, frutas, vegetais e comidas fermentadas, 12 apresentaram atividade *killer*, e dentre essas 12, a cepa *Pichia kudriavzevii* RY55 foi a que apresentou a máxima atividade *killer* após 72h de incubação, tornando-se um potencial agente de biocontrole.

Antunes e Aguiar (2012) em investigação ao fenótipo *killer*, observaram que as leveduras *Candida utilis*, *Dekkera bruxellensis*, *Sterigmatomyces halophilus*, *Stephanoascus ciferri*, *Pichia holstii* e *P. jadinii*, apresentaram atividade positiva ao fenótipo *killer*, fator este nunca descrito antes nestas espécies de leveduras. Estas cepas ocorrem em fermentações de vinho, tornando-as potenciais agentes de biocontrole.

Santos *et al* (2009) evidenciaram que *P. membranifaciens*, secreta uma enzima PMKT2 a qual atua inibindo uma gama de leveduras deteriorantes e fungos fitopatogênicos, principalmente *Brettanomyces bruxellensis* que se torna um

contaminante em fermentações de vinhos.

### 3.5.2 Determinação da Atividade Antagonista em Placa

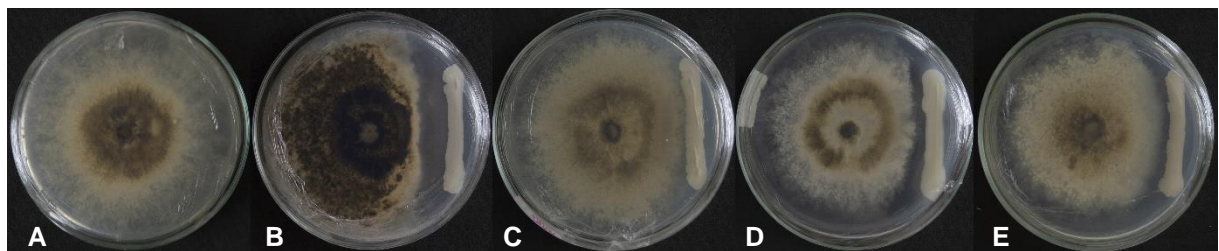
No teste de antagonismo em placa por compostos difusíveis no meio, por emprego do disco micelial fúngico a 3cm da cepa de levedura, observou-se que todas as cepas de leveduras testadas apresentaram efeito deletério do crescimento micelial de *B. cinerea*, conforme a Tabela 3.2 e Figura 3.6.

**Tabela 3.2.** Crescimento micelial no sexto dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) e halo de inibição de *Botrytis cinerea* (Bc) co-cultivado com *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Tratamentos	Cresc. micelial (cm) no 6º dia	IVCM (cm)	ICM (%)	Halo de inibição (cm)
Bc	3,36 a	0,90 a	0,00 c	0,00 c
Bc + CCMA 0759	1,65 c	0,48 c	50,8 a	1,04 a
Bc + CCMA 0760	2,68 b	0,76 ab	20,60 b	0,32 b
Bc + CCMA 0762	2,29 b	0,68 b	32,45 ab	0,65 ab
Bc + CCMA 0763	2,46 b	0,69 b	27,01 b	0,64 ab
<b>CV (%)</b>	13,5	12,60	35,42	40,0

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

**Fonte:** o autor.



**Figura 3.6.** Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* (Bc) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Bc), (B) Bc vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Bc vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Bc vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Bc vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial fúngico variou entre 50,8 e 20,6%, sendo *P. caribbica* (CCMA 0759) responsável pela maior porcentagem de inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*. Em relação a produção

dos halos de inibição, o diâmetro variou entre 1,04 e 0,32cm sendo *P. caribbica* responsável pelo maior halo de inibição evidenciado.

Santos, Sánchez e Marquina (2004) investigaram o potencial de 42 cepas de leveduras para o controle de *B. cinerea*. Verificaram que a cepa CYC1110 de *P. membranifaciens* apresentou a maior inibição de crescimento micelial de *B. cinerea*. Também relataram que quando o isolado CYC 20010 de *B. cinerea* foi cultivado com *P. membranifaciens* CYC1106 na mesma placa, formou-se uma zona de inibição de cerca de 32 mm ao redor da levedura.

A cepa P-2 de *Hanseniaspora uvarum* apresentou efeito inibição significativa do crescimento micelial de *B. cinerea* em placas de BDA, com 1,9 cm de diâmetro enquanto a placa controle apresentou cerca de 6,7 cm (LIU *et al.*, 2010).

A inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* por compostos difusíveis no meio, foi observado por Chen, Chen e Chou (2018), que relataram que as cepas de *Aureobasidium* sp. JYC1525, *Saccharomyces cerevisiae* JYC137 e *Candida stellimalicola* JYC2120 apresentaram a melhor capacidade antagônica por compostos difusíveis no meio, com cerca de 37, 27 e 25% de inibição do crescimento micelial, respectivamente.

Masih e Paul (2002), cultivaram *B. cinerea* isolados de bagas de uva em conjunto com a levedura *Pichia membranifaciens*, um halo de inibição do crescimento micelial foi desenvolvido ao redor do inóculo da levedura.

A tabela 3.3 e a Figura 3.7, apresentam os resultados do teste de antagonismo em placa por compostos difusíveis no meio realizados utilizando um disco micelial de *P. digitatum* frente a 4 cepas diferentes de leveduras, onde observou-se que todas as cepas de leveduras testadas apresentaram efeito antagônico no crescimento micelial de *P. digitatum*.

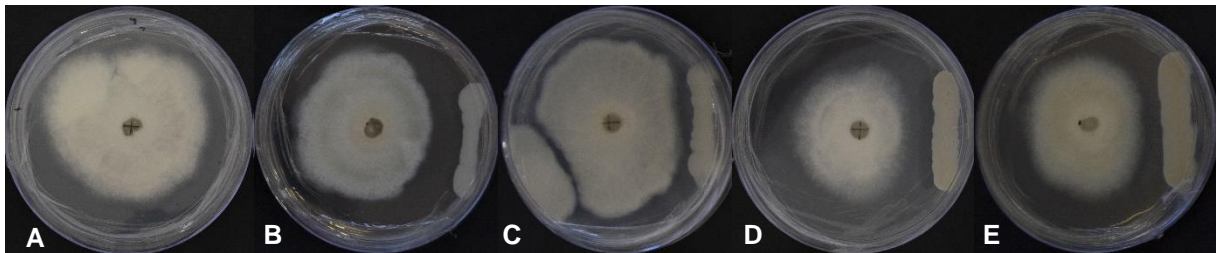
Resultados como a porcentagem de inibição de crescimento micelial ICM (%), variou entre 24,53 e 19,88%, considerando que a cepa CCMA 0762 de *P. manshurica* foi responsável pelo maior ICM % de *P. digitatum*. Observou-se também, que a quantificação do halo de inibição do crescimento micelial variou entre 0,73 e 0,46cm, onde a cepa CCMA 0759 de *P. caribbica* é responsável pela presença do maior halo de inibição de *P. digitatum*.

**Tabela 3.3.** Crescimento micelial no sétimo dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) e halo de inibição de *Penicillium digitatum* (Pd) co-cultivado com *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Tratamentos	Cresc. micelial (cm) no 7º dia	IVCM (cm)	ICM (%)	Halo de Inibição (cm)
Pd	3,44 a	0,72 a	0,00 b	0,00 b
Pd + CCMA 0759	2,62 b	0,57 b	23,24 a	0,73 a
Pd + CCMA 0760	2,74 b	0,58 b	19,88 a	0,61 a
Pd + CCMA 0762	2,58 b	0,58 b	24,52 a	0,64 a
Pd + CCMA 0763	2,62 b	0,55 b	22,93 a	0,46 a
CV (%)	8,40	8,53	39,72	35,81

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey;

Fonte: o autor.



**Figura 3.7.** Crescimento micelial de *Penicillium digitatum* (Pd) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Pd), (B) Pd vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Pd vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Pd vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Pd vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Fonte: o autor.

Perez *et al* (2017) em ensaios realizados para o controle de *P. digitatum* e *P. italicum*, utilizando 37 cepas de leveduras diferentes, verificaram que apenas a levedura *Pichia fermentans* inibiu *P. digitatum* e *P. italicum* em cerca de 40%. Já as 6 diferentes cepas de *Kazachstania exigua* expressaram inibição de *P. digitatum* igual ou superior a 40%.

Platania *et al* (2012), em testes realizados com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Wickerhamomyces anomalus* para o biocontrole de *P. digitatum*, verificaram que apenas as cepas de *W. anomalus* em meio acidificado, inibiram o crescimento micelial dos fungos, apresentando um grande halo de inibição.

Sukorini, Sangchote e Khewkhom (2013), verificaram em testes *in vitro* que uma suspensão de  $1 \times 10^8$  cel. mL<sup>-1</sup> de *Candida tropicalis* TISTR 5010 e outras espécies do gênero *Candida* e *Pichia membranifaciens* TISTR 5093, apresentaram

inibição do crescimento micelial de *P. digitatum* de 78% e 69,3%, respectivamente. Estes autores encontraram também que as cepas de *Candida utilis* TITR 5001 e *Candida tropicalis* TISTR 5010 eram promissoras para o controle de *P. digitatum*, pois, quando aplicadas em combinação, apresentavam inibição do crescimento micelial de cerca de 80%.

Sallam, Badawy e Ibrahim (2012) observaram que cepas de *Candida sake*, *P. guilliermondii* e *P. membranifaciens* inibiram o crescimento micelial de *P. digitatum* em cerca de 20, 25 e 15%, respectivamente, quando realizados experimentos em cultura dupla.

### 3.5.3 Determinação da Produção de Compostos Voláteis

Pode-se observar efeitos antagônicos dos voláteis de todas as cepas de leveduras testadas no crescimento micelial de *B. cinerea* (Tabela 3.4 e Figura 3.8).

As leveduras possuem capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis com atividade antifúngica, o que representa um mecanismo importante para o controle biológico de uma vasta gama de patógenos que acometem frutos em pós-colheita (PARAFATI *et al.*, 2017).

**Tabela 3.4.** Crescimento micelial no terceiro dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) *Botrytis cinerea* (Bc) co-cultivado com *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Tratamentos	Crescimento micelial (cm) no 3º dia	IVCM (cm)	ICM (%)
Bc	4,04 a	1,61 a	0,00 c
Bc + CCMA 0759	3,16 b	1,24 b	21,60 b
Bc + CCMA 0760	2,88 bc	0,96 c	28,60 ab
Bc + CCMA 0762	2,79 bc	0,79 cd	30,78 ab
Bc + CCMA 0763	2,37 c	0,60 d	41,47 a
<b>CV (%)</b>	9,94	12,0	29,8

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

**Fonte:** o autor.



**Figura 3.8.** Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* (Bc) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Bc), (B) Bc vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Bc vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Bc vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Bc vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

Os dados de índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) variaram entre 1,61 e 0,60cm, onde a cepa CCMA 0763 de *L. thermotolerans*, foi responsável pelo menor IVCM. Quando observado os dados de porcentagem de inibição de crescimento micelial (ICM%), nota-se que a variação de resultados ficou entre 41,47 e 21,60%, onde novamente a cepa CCMA 0763, apresentou a maior ICM% em relação ao crescimento de *B. cinerea*.

Os compostos orgânicos voláteis (volatiles organic compounds - VOCs) são sólidos e líquidos à base de carbono que entram na fase gasosa por vaporização a 0,01 kPa a uma temperatura de aproximadamente 20°C (PAGANS, FONT, SÁNCHEZ, 2006). Os VOCs fúngicos são derivados tanto do metabolismo primário quanto do secundário. Como podem se difundir pela atmosfera e pelo solo, os VOCs de fungos têm sido usados como parte das estratégias de controle biológico para impedir o crescimento de patógenos vegetais, estratégia ambientalmente correta e que reduz o uso de fungicidas em plantas cultivadas. Os VOCs são usados para evitar fungos de pós-colheita, processo que é chamado de "micofumigação" (MORATH, HUNG, BENNETT, 2012).

Parafati *et al* (2017) através de compostos orgânicos voláteis produzidos por *W. anomalus* BS91, *M. pulcherrima* MPR3, *A. pullulans* PI1 e *S. cerevisiae* BCA61, relatou que *W. anomalus* BS91 inibiu totalmente a incidência de mofo cinzento em pseudofrutos de morangos. *A. pullulans* PI1 apresentou cerca de 50%, 20% e 0,3cm de inibição de incidência, severidade e diâmetro da lesão, respectivamente.

Em experiências *in vitro*, os VOCs de *Muscodor albus* foram tóxicos para os patógenos do pêssego, *P. expansum*, *B. cinerea* e *Monilinia fructicola*, além

disso, os voláteis impediram a contaminação fúngica de pós-colheita de pêssegos com mais de 7 dias de armazenamento (MERCIER; JIMENEZ, 2004).

Os VOCs de *Oxyporus latemarginatus* EF069 reduziram a deterioração pós-colheita das maçãs causada por *B. cinerea* e podridão da raiz causada por *Rhizoctonia solani* (LEE *et al.*, 2009). Compostos orgânicos voláteis de estirpes de *Wickerhamomyces anomalus* e *S. cerevisiae* apresentaram valores de inibição do crescimento *in vitro* de *B. cinerea* de 99 e 71%, respectivamente a pH 4,5 (PARAFATI *et al.*, 2015).

Em testes realizados por Parafati *et al* (2017) os compostos orgânicos voláteis produzidos pelas cepas de leveduras *W. anomalus* BS91, *Metschnikowia pulcherrima* MPR3 e *Aerobasidium pullulans* PI1 reduziram o crescimento micelial de *B. cinerea* em 100, 68 e 84%, respectivamente, o de *P. digitatum* em 98, 66 e 24%, respectivamente, e o de *P. italicum* em 100, 65 e 44%, respectivamente.

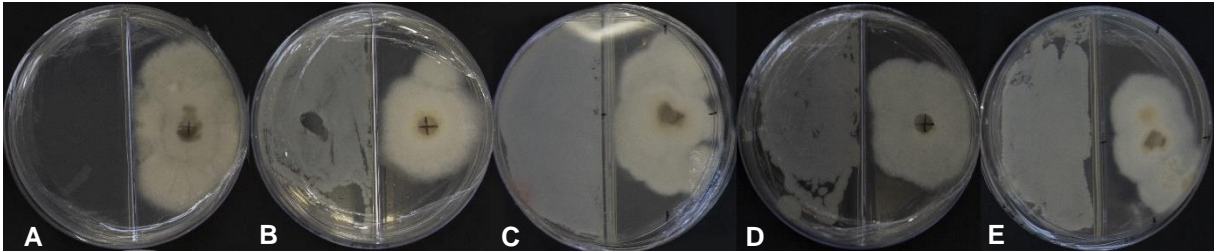
Os testes de compostos voláteis realizados com *P. digitatum*, observou-se que o índice de velocidade de crescimento micelial variou entre 1,12 e 0,80cm onde a cepa CCMA 0763 de *L. thermotolerans*, apresentou o menor índice de velocidade de crescimento micelial diferindo da testemunha e dos outros tratamentos. Quanto ao ICM (%), os dados diversificaram entre 0 e 19,87%, todas as cepas mostraram inibição de *P. digitatum*, conforme Tabela 3.5 e Figura 3.9, contudo, a cepa CCMA 0763 de *L. thermotolerans* apresentou a maior ICM%.

**Tabela 3.5.** Crescimento micelial no quinto dia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) *Penicillium digitatum* (Pd) co-cultivado com *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Tratamentos	Crescimento micelial (cm) no 5º Dia	IVCM (cm)	ICM (%)
Pd	4,42 a	1,12 a	0,00 c
Pd + CCMA 0759	4,03 ab	1,00 ab	8,57 ab
Pd + CCMA 0760	4,08 a	0,94 ab	9,66 ab
Pd + CCMA 0762	4,31 a	1,09 a	3,32 b
Pd + CCMA 0763	3,53 b	0,80 b	19,87 a
CV (%)	6,54	13,88	62,79

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

**Fonte:** o autor.



**Figura 3.9.** Crescimento micelial de *Penicillium digitatum* (Pd) co-cultivado com leveduras. (A) placa controle (Pd), (B) Pd vs. *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) Pd vs. *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760.0), (D) Pd vs. *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) Pd vs. *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

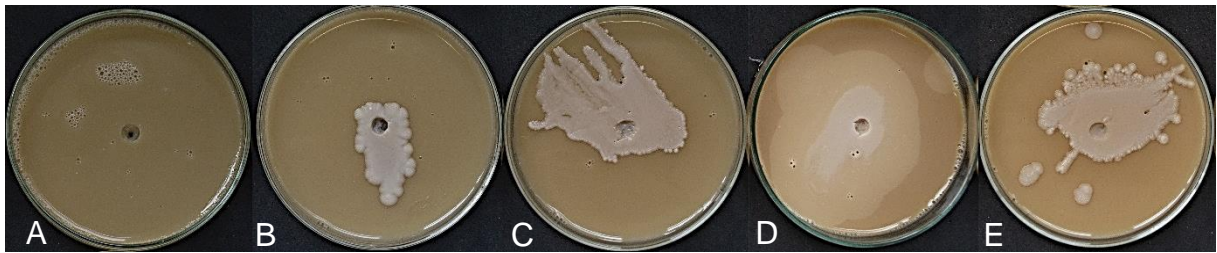
A produção de compostos voláteis foi observada em quase todas as 24 linhagens de leveduras testadas por Chen, Chen e Chou (2018), porém, *Galactomyces candidum* JYC1146, *Aureobasidium pullulans* JYC1278 e *A. pullulans* JYC1291 apresentaram a melhor capacidade de inibição por compostos voláteis sobre *B. cinerea* com 70, 34 e 24%, respectivamente.

Em ensaios de compostos orgânicos voláteis utilizando cepas de *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Saccharomyces cerevisiae*, no biocontrole de *B. cinerea*, Oro et al (2017), mostraram que as cepas utilizadas inibiram o crescimento micelial em 87, 56 e 63%, respectivamente. Contudo estas mesmas leveduras, apresentaram pouca ou nenhuma atividade no controle de *P. digitatum*, *Cladosporium* spp. e *Colletotrichum* spp.

#### 3.5.4 Atividade de Enzimas Líticas Extracelulares

Conforme pode-se observar a Figura 3.10, apresenta a atividade de protease através do meio de cultura contendo YPD com 10% de leite em pó desnatado, somente a cepa CCMA 0762 de *P. manshurica* (D) apresentou efeito positiva a protease, onde houve a presença de um halo claro ao redor da zona de inóculo, diferenciando da placa controle (A) e das placas contendo as outras cepas de leveduras testadas.

A protease positiva é importante para a lise da parede celular fúngica, pois atua diretamente na camada mais externa de mananaproteínas, degradando-a e permitindo que ocorra a degradação consecutiva das próximas camadas da parede celular fúngica (FLEURI;SATO, 2008; PÉREZ-FUENTES; RAVANAL; EYZAGUIRRE, 2014).



**Figura 3.10.** Teste de atividade de protease em meio YPD com 10% leite em pó desnatado cultivado com leveduras. (A) Controle, (B) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (D) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

A atividade de protease foi detectada por Chen, Chen e Chou (2018), através do aparecimento de zonas claras devido a degradação da caseína, nas cepas de leveduras de *Aureobasidium pullulans* JYC1061, JYC1278, JYC1291, JYC1521, JYC1524 e JYC2041.

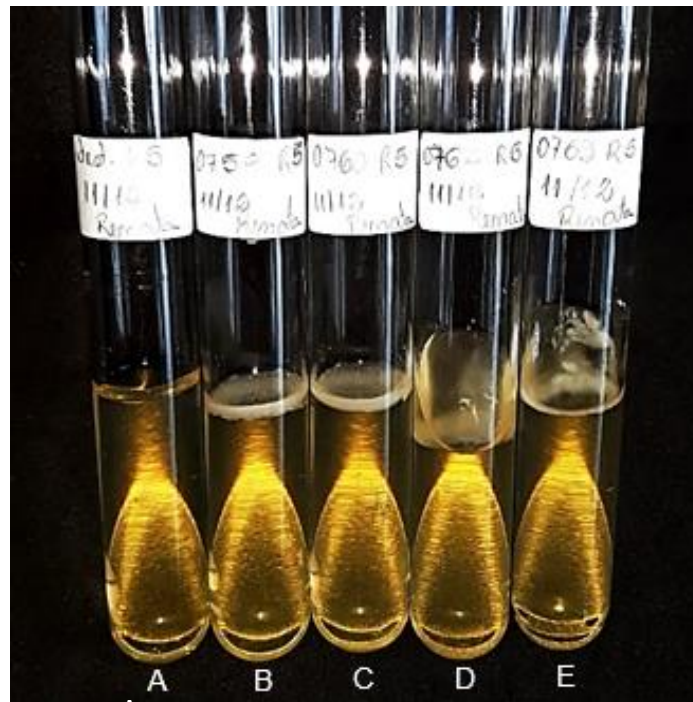
Gardini *et al* (2006), utilizando isolados de leveduras provenientes do amadurecimento do queijo Pecorino crotonese, identificou que cepas de *Yarrowia lipolytica* e duas cepas de *Debaryomyces hansenii*, foram capazes de hidrolisar as proteínas do leite desnatados e as cepas LM4 e LM5 de *Y. lipolytica*, apresentaram atividade de hidrolisar gelatina.

Para a atividade de liquefação de gelatina através do meio de cultura com dextrose e gelatina 10%, pode-se observar na Figura 3.11, que as cepas CCMA 0762 de *P. manshurica* e CCMA 0763 de *L. thermotolerans*, apresentaram uma liquefação fraca de gelatina, ocorrendo apenas no topo do meio. Assim como a protease, a gelatinase atua juntamente na degradação da camada mais externa de mananaproteína da parede celular fúngica.

Charoenchai *et al* (1997), caracterizaram leveduras presentes em vinho quanto a atividade protease e hidrólise de gelatina, constatando que, *Candida pulcherrima* 1000 e 2000, *Kloeckera apiculata* 401, 610 e FRR2164, *Pichia anomala* 703300 e 209, apresentaram resultados positivos para atividade de protease em placas de ágar skim milk. Todavia, nenhuma dessas leveduras foi capaz de hidrolisar gelatina e pectina.

As proteínas antifúngicas liberadas pelas leveduras têm atraído atenção devido ao seu potencial no controle de doenças causadas por fungos em plantas. Entre as proteínas antifúngicas com mecanismos de ação conhecidos, as glucanases estão sob investigação como um grupo promissor no fornecimento de

proteção contra doenças (PLATANIA *et al.*, 2012).



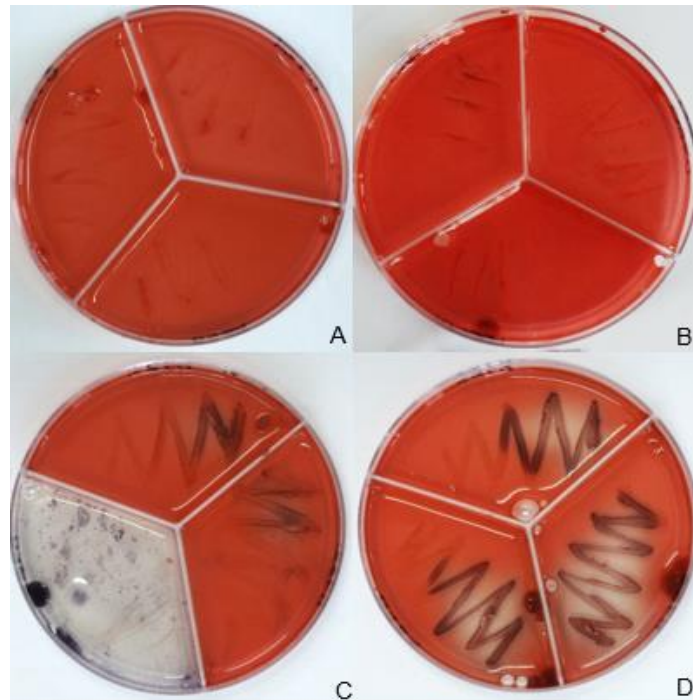
**Figura 3.11.** Teste de liquefação de gelatina em meio dextrose com gelatina 10% cultivado com leveduras. (A) Controle, (B) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (C) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (D) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (E) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

Buzzini e Martini (2002) indentificaram que algumas cepas de *Cryptococcus* spp., foram capazes de hidrolisar gelatina, e outras cepas de *Aureobasidium pullulans* e *Pseudozyma* spp., apresentaram capacidade de hidrolisar pectina.

As cepas CCMA 0762 de *P. manshurica* e CCMA 0763 de *L. thermotolerans* foram capazes de hidrolisar a laminarina apresentando atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em meio de cultura YNB suplementado com laminarina 5%, conforme pode-se observar na Figura 3.12, pois apresentaram uma zona amarelo-alaranjada ao redor das colônias, indicando a hidrolise da glucana.

A hidrolise da glucana é importante, pois estão associadas a quebra de ligações intra e inter poliméricas, onde as  $\beta$ -1,3-glucanases são responsáveis na degradação da camada interna de  $\beta$ -glucanas (FELURI; SATO, 2010).



**Figura 3.12.** Teste de atividade de de  $\beta$ -1,3-glucanase em meio YNB com 5% de laminarina cultivado com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

A aplicação das  $\beta$ -1,3-glucanases ou de microrganismos produtores dessa enzima se tornam importantes, pois desestimulam o crescimento de fungos fitopatogênicos diminuindo desta forma a deterioração de frutos causada pelos mesmos (BAUERMEISTER, *et al.*, 2010).

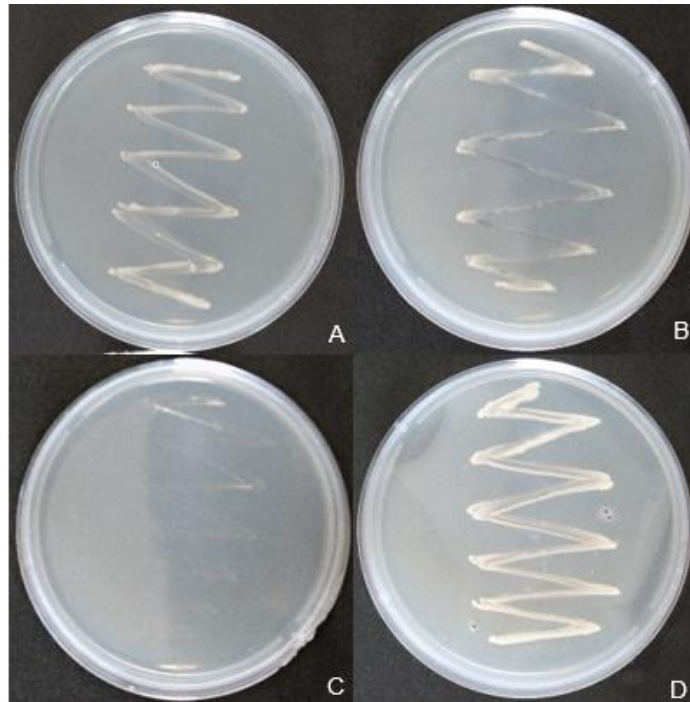
Xu e Tian (2008), evidenciaram que na presença de *Penicillium expansum*, a levedura *Pichia membranifaciens* induz a produção das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases, favorecendo o controle deste fitopatógeno.

Wang *et al* (2007) verificaram que *W. anomalus* YF07b isolado marinho, apresentava a toxina *Killer* e atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase. As cepas NCYC432, NCYC434 e NCYC432 de *Pichia anomala* também apresentaram atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, hidrolisando laminarina (İGZÜ, ALTINBAY, SERTKAYA, 2005; İGZÜ, ALTINBAY, ACUN, 2006).

Masih e Paul (2002) identificaram que *Pichia membranifaciens* quando cultivada em meio YNB suplementado com laminarina, a atividade de exo- e endo- $\beta$ -1,3-glucanases foram aumentando conforme o tempo, atingindo o nível máximo da atividade exo- após 24h de incubação a 25°C, enquanto que a endo-  $\beta$ -

1,3-glucoanase atingiu o nível máximo às 48h.

A atividade de pectinase foi evidenciada somente na cepa CCMA 0763 de *L. thermotolerans*, conforme Figura 3.13 (D), onde um halo claro em comparação ao meio opaco indicou a degradação da pectina.



**Figura 3.13.** Teste de atividade de pectinase em meio YNB com 1 % de pectina cultivado com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

A pectina se torna importante pois, é um dos principais constituintes da parede celular primária e da lamela média presente nas células vegetais (PÉREZ-FUENTES; RAVANAL; EYZAGUIRRE, 2014). A ação da pectinase faz com que a parede celular vegetal se torne mais amolecida favorecendo a infecção do fungo e o desenvolvimento da doença.

Uma diversidade de espécies de leveduras ocorrem associadas a frutos ou polpa de frutos, e que provavelmente algumas delas tenham desenvolvido a atividade pectinolíticas para potencializar seu crescimento, aumentando a sua sobrevivência, produzindo pectinases para degradar a polpa da fruta, a fim de assimilar os açúcares que ocorrem nas cadeias laterais de pectina (DA SILVA *et al.*, 2005).

Ensaio *in vitro* realizados por Parafati *et al* (2015) evidenciaram que as cepas de *A. pullulans* e *W. anomalus* possuem atividade  $\beta$ -1,3- glucanase, mas não expressaram atividade de quitinase em nenhuma das cepas estudadas. Contudo, a cepa de *A. pullulans*, também apresentou atividade pectinolíticas e proteolítica. Em ensaios *in vivo* seguintes, pode-se observar que a cepa de *M. pulcherrima*, que não apresentou nenhuma atividade de enzimática e *W. anomalus*, foram mais eficazes no controle da incidência de mofo cinzento em bagas de uvas, porém, a cepa de *A. pullulans*, que apresentou atividade positiva quanto a pectinase, não foi eficaz no controle da incidência de mofo cinzento apresentando resultados significativamente iguais ao controle.

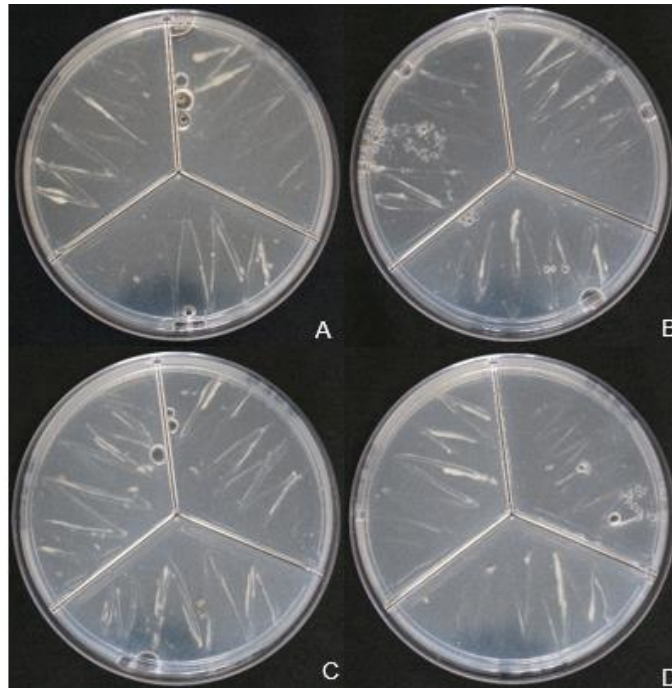
Alimardani-Theuil, Gainvors-Claisse e Duchiron (2011), relatam que a polpa do cacau é um meio rico para o desenvolvimento microbiano e destacam que as leveduras tendem a dominar a fase inicial da fermentação natural do cacau, estando envolvidas na fermentação alcoólica, mas que algumas cepas também possuem a capacidade de secretar pectinases, que degradam a parede das células da polpa, resultado em perda de líquido. Das 12 cepas de leveduras isoladas de polpa de cacau, *S. cerevisiae* var *chevalieri*, *Candida rugopelliculosa*, *Kluyveromyces marxianus* e *L. thermotolerans* foram capazes de secretar endopoligalacturonases.

Nenhuma das 42 estirpes de leveduras utilizadas, dentre elas, espécies de *Pichia* spp., *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidium unigutulatum*, *Filobasidiella neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Bullera dendrophila*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sterigmatomyces halophilus* e *Udeniomyces purniceus*, foram capazes de utilizar substratos relacionados à parede celular fúngica como  $\beta$ -1,3 glucana,  $\beta$  -1,6 glucana, quitina e quitosana como fontes de carbono (SANTOS, SÁNCHEZ E MARQUINA, 2004).

Bar-Shimon *et al* (2004) verificaram que a levedura *C. oleophila* produziu várias enzimas degradativas da parede celular de *P. digitatum*, dentre elas, exo- $\beta$ -1,3-glucanases, quitinase e proteases.

Strauss *et al* (2001) identificou que apenas nove cepas de leveduras, dentre *C. stellata*, *C. oleophila*, *C. pulcherrima*, *C. valida* e *Kloeckera. apiculata*, apresentaram capacidade de hidrolisar pectinase. No entanto, 10 cepas de *C. stellata*, *C. pulcherrima*, *K. apiculata* e uma cepa de *Debaryomyces hansenii*, apresentaram capacidade de hidrolisar protease.

Nos testes da atividade de quitinase por meio de cultura contendo meio mínimo com 1,2% de quitina (Figura 3.14), não houve a presença de uma zona clara ao redor da zona de inóculo, indicando que nenhuma das cepas testadas foi positiva a quitinase.



**Figura 3.14.** Teste de atividade de quitinase em meio mínimo com 1,2% de quitina cultivado com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

**Fonte:** o autor.

A parede celular dos fungos é composta por  $\beta$ -glucanas e quitina (BAUERMEISTER *et al.*, 2010). A quitinase atua diretamente na hidrólise da quitina degradando a parede celular fúngica, inibindo o desenvolvimento e/ou proporcionando a morte fúngica. Nas plantas, as quitinase atuam na defesa contra fungos fitopatogênicos, resposta a estresse e no seu desenvolvimento (JUNGES, 2010).

Chen, Chen e Chou (2018), evidenciaram que de todas as cepas testadas, 9 delas apresentaram atividade positiva para quitinase, *Aureobasidium pullulans* JYC1061, JYC1291, JYC1521, JYC1524, JYC2041, *Galactomyces candidum* JYC1146, *Aureobasidium thailandense* JYC1229, JYC1523, JYC1525.

Buzzini e Martini (2002) identificaram que apenas uma cepa de *A. pullulans*, 6 cepas de *Cryptococcus* spp. e uma cepa de *Rhodotulora mucilaginoso*, demonstram capacidade de hidrolisar quitina.

Liu *et al* (2013) relatam que a capacidade que as leveduras antagônicas possuem em se ligarem as hifas dos fitopatógenos e secretarem enzimas líticas, desempenha um papel importante no controle biológico. Por exemplo, a levedura antagônica *P. quilliermondii*, possui a capacidade de aderir firmemente as hifas de *B. cinerea* e secretar  $\beta$ -1,3- glucanase, degradando dessa forma as paredes celulares do patógeno (WISNIEWSKI *et al.*, 1991).

A tabela 3.6 apresentam-se os resultados obtidos nos testes de atividade de enzimas líticas extracelulares nas leveduras. Onde apenas duas das quatro cepas de leveduras testadas apresentaram efeito positivo para a atividade de enzimas líticas extracelulares. A cepa CCMA 0762 de *P. manshurica*, apresentou atividade para protease, gelatinase e  $\beta$ -1,3-glucanase. Já a cepa CCMA 0763 de *L. thermotolerans* apresentou efeito positivo para gelatinase,  $\beta$ -1,3-glucanase e pectinase.

**Tabela 3.6.** Atividade de enzimas líticas extracelulares em *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Cepas	Enzimas líticas extracelulares				
	Protease	Gelatinase	$\beta$ -1,3-glucanase	Pectinase	Quitinase
<b><i>Pichia caribbica</i></b> (CCMA 0759)	-	-	-	-	-
<b><i>Hanseniaspora opuntiae</i></b> (CCMA 0760)	-	-	-	-	-
<b><i>Pichia manshurica</i></b> (CCMA 0762)	+ <sup>a</sup>	+	+	-	-
<b><i>Lachancea thermotolerans</i></b> (CCMA 0763)	-	+	+	+	-

<sup>a</sup>(+) positivo para atividade de enzimas; (-) negativo para a atividade de enzimas.

Fonte: o autor

### 3.5.6 Eficácia das Células das Levedura no Controle *in vivo* de Mofo Cinzento em Morangos e de Bolor Verde em Citros

A eficiência das diferentes cepas de leveduras testadas para a redução do mofo cinzento em pseudofrutos de morango, é evidenciado na Figura 3.15A e B.

A

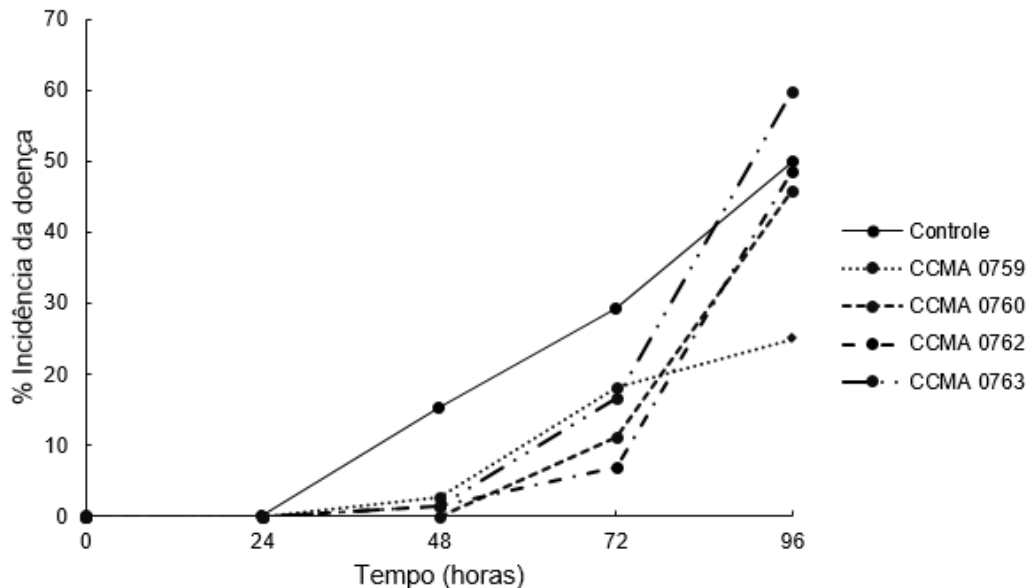
Tratamentos	Incidência (%)				AACPD
	24h	48h	72h <sup>a</sup>	96h	
Controle	0 <sup>ns</sup>	15,26 a	29,16 a	50,00 ab	23,15 a
CCMA 0759	0	2,77 b	18,05 b	25,00 b	6,48 b
CCMA 0760	0	0,00 b	11,11 ab	45,8 ab	11,34 b
CCMA 0762	0	1,38 b	6,94 ab	48,6 ab	10,87 b
CCMA 0763	0	1,38 b	16,67 ab	59,7 a	15,97 ab
CV (%)	-	142,14	61,61	40,36	50,49
Erro padrão	-	2,25	5,71	7,62	3,14

<sup>a</sup> Médias originais, dados transformados para análise por  $\sqrt{(x + 1)}$ .

Ns – não significativo. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: o autor.

B



**Figura 3.15.** (A) Incidência (%) às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da incidência de mofo cinzento (AACPD). (B) Curva de progresso de mofo cinzento (% incidência) em morangos inoculados com *Botrytis cinerea* e tratados com cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Pode-se observar que os valores da % de incidência do mofo cinzento foram significativamente mais baixos em pseudofrutos de morangos após 48h de inoculação com os quatro tipos de cepas de leveduras.

Na Figura 3.15 A, evidencia-se que as cepas de *P. caribbica* (CCMA 0759), *H. opuntiae* (CCMA 0760) e *P. manshurica* (CCMA 0762), apresentaram uma redução na AACPD em média de 58,7% em relação ao controle não tratado, podendo ser utilizadas em trabalhos futuros com outros testes para o controle de mofo cinzento.

Contudo, a partir de 72h apenas CCMA 0759 de *P. caribbica* manteve uma menor incidência da doença, tornando-se um potencial agente de controle biológico de mofo cinzento em morangos pós-colheita (Figura 3.15 B). Assim como na Figura 3.16, onde observa-se a incidência de *B. cinerea* sobre morangos, constatando a eficiência de *P. caribbica* CCMA 0759 (A) no controle do patógeno, diferenciando das outras cepas utilizadas quando comparadas ao controle (E).

Acredita-se que a ineficiência da cepa *L. thermotolerans* (CCMA 0763), na redução da incidência do mofo cinzento pode estar relacionado ao fato de apresentar atividade lítica extracelular positiva a pectinase, pois a pectina é constituinte principal da parede celular vegetal, e a degradação da pectina pela levedura pode ser um fator que tenha favorecido a infecção do patógeno na fruto.

Zhang *et al* (2013), testaram o efeito da combinação de *Rhodotorula mucilaginosa* isoladamente e/ou em combinação com ácido fítico no controle de mofo cinzento do morango e evidenciaram que, quando aplicado a levedura isoladamente a incidência da doença após 3 dias de inoculação foi de cerca de 50%, porém, melhores resultados foram encontrados quando realizada a combinação de *R. mucilaginosa* + 4  $\mu\text{mol/mL}$  de ácido fítico, quando a incidência da doença ficou em cerca de 20% em comparação ao 100% do tratamento controle.

Liu *et al* (2010) inoculando artificialmente *Hanseniaspora uvarum* P-2 em duas concentrações  $1 \times 10^8 \text{ cel/mL}^{-1}$  e  $1 \times 10^6 \text{ cel/mL}^{-1}$  em bagas de uva verificou que a concentração de  $1 \times 10^8 \text{ cel/mL}^{-1}$  inibiu completamente a incidência do mofo cinzento após 4 dias de incubação, e para a concentração de  $1 \times 10^6 \text{ cel/mL}^{-1}$  a incidência foi de 10% enquanto que as bagas controles apresentaram 88% de incidência da doença.



**Figura 3.16.** Incidência de *Botrytis cinerea* 72h após-inoculação sobre frutos de morangos tratados com leveduras. (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763), (E) Controle.

**Fonte:** o autor.

Experimentos com videiras demonstraram que quando inoculadas por *B. cinerea*, elas desenvolviam os sintomas e sinais característicos da doença levando à morte da planta. Contudo, quando as plantas eram inoculadas com *B. cinerea* e *Pichia membranifaciens*, as plantas se desenvolveram vigorosamente sem nenhum sintoma da doença (MASIH, PAUL, 2002).

Resultados foram encontrados por Zhang *et al* (2010), em estudo utilizando *Rhodotorula glutinis* isoladamente a qual reduziu significativamente em cerca de 25% a incidência da podridão causada por *Rhizopus stolonifer* e em 0,2 cm o diâmetro da lesão, respectivamente. Todavia, quando utilizado o tratamento combinado de *R. glutinis* + 100µg/mL de ácido salicílico, houve uma redução na incidência de 93,3% para 18,3% e no diâmetro da lesão da doença de 0,77 cm para 0,13 cm, respectivamente, quando comparado ao controle.

Como demonstrado na Figura 3.17 A e B, a incidência de bolor verde nos frutos tratados com as leveduras é estatisticamente igual aos frutos inoculados utilizados como controle, não apresentando diferenças significativas entre tratamentos.

Para a realização do experimento *in vivo*, utilizou-se apenas 3 cepas de leveduras, estas cepas foram classificadas com base nos testes *in vitro* anteriores, selecionando as leveduras que obtiveram os melhores resultados.

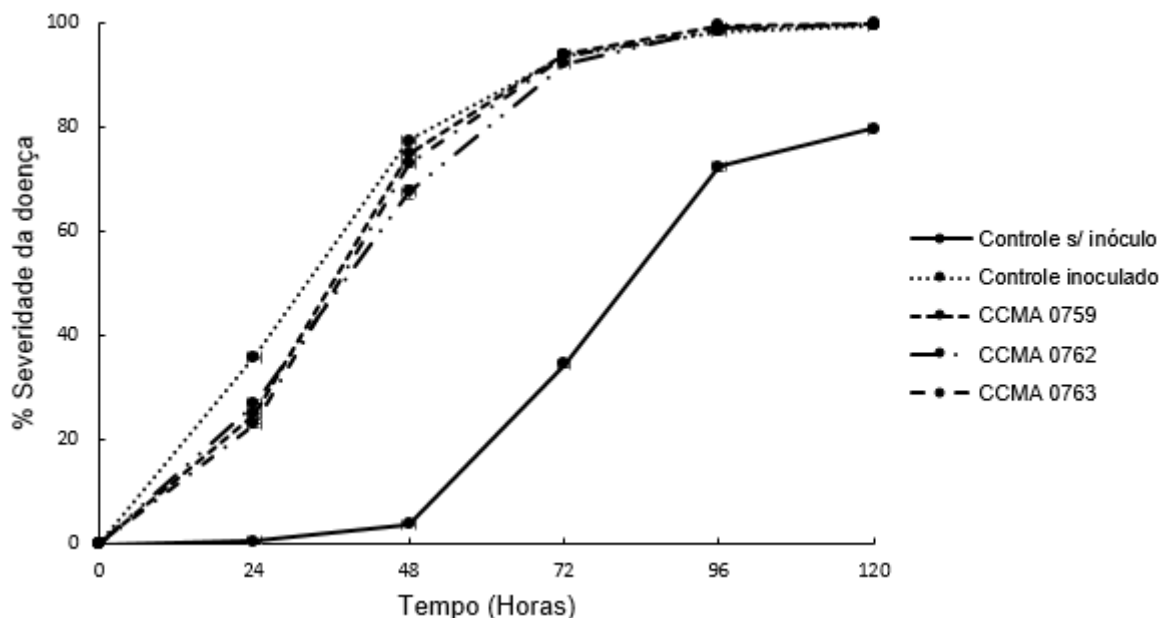
A

Tratamentos	Severidade (%)					AACPD
	24h	48h	72h	96h	120h	
Controle s/ inóculo	0,622 a	3,74 a	34,50 a	72,48 a	79,71 a	37,72 a
Controle inoculado	35,85 b	77,48 b	93,70 b	98,31 b	99,58 b	84,30 b
CCMA 0759	25,01 b	75,01 b	93,92 b	99,46 b	100,00 b	82,72 b
CCMA 0762	26,96 b	67,61 b	92,31 b	98,92 b	99,77 b	80,55 b
CCMA 0763	22,99 b	73,09 b	93,74 b	98,61 b	99,64 b	81,69 b
CV (%)	37,21	18,94	7,3	7,57	6,89	7,5
Erro padrão	3,38	4,59	2,43	2,89	2,69	

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

Fonte: o autor.

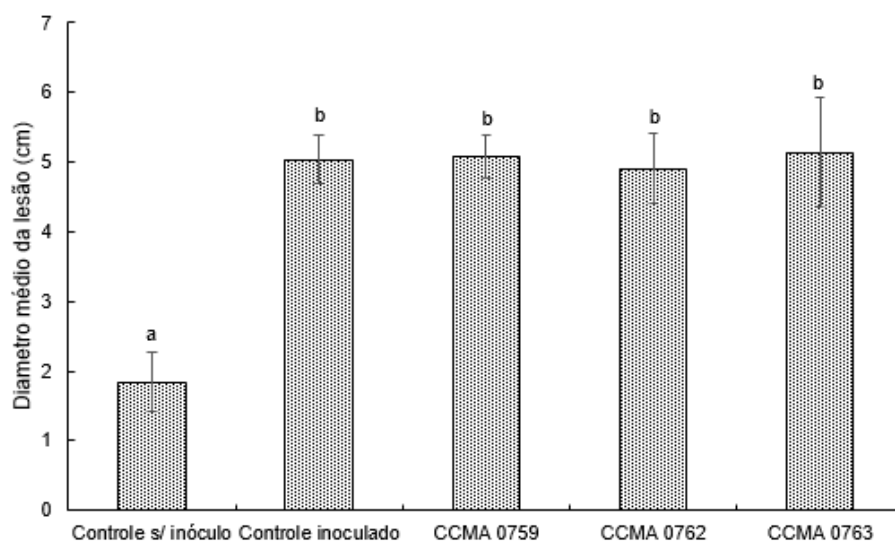
B



**Figura 3.17.** (A) Severidade (%) às 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação e área abaixo da curva de progresso (AACPD) do bolor verde em laranjas. (B) Curva de progresso da doença de bolor verde dos citros em laranjas inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados com cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

Fonte: o autor.

As Figura 3.18 e Figura 3.19, mostram os resultados obtidos a partir da mensuração do diâmetro das lesões de bolor verde em frutas de laranjas e a severidade da doença pós-inoculação, onde todos os frutos tratados com as cepas de leveduras e o controle inoculado com *P. digitatum* são estatisticamente iguais, diferindo somente do controle não inoculado, que mesmo sendo um controle sem inoculação, houve o desenvolvimento da doença, fato este que pode estar relacionado ao momento da montagem do experimento onde poderia haver esporos de *P. digitatum* presentes no ar.



**Figura 3.18.** Diâmetro médio das lesões de bolor verde dos citros em laranjas inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados com cepas de leveduras *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Pichia manshurica* (CCMA 0762), *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

\*As barras nas colunas representam o desvio padrão com base 6 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** o autor.

Sallam, Badawy e Ibrahim (2012) verificaram em testes realizados com inoculação artificial com *C. sake*, *P. guilliermondii* e *P. membranifaciens* que estas leveduras foram eficientes para o controle do bolor verde. No entanto, *P. guilliermondii* apresentou maior redução na severidade da doença, cerca de 25% do desenvolvimento do bolor verde quando comparado ao controle e as outras cepas de leveduras.

Zhou *et al* (2014) utilizaram *P. membranifaciens* na concentração de  $1 \times 10^8$  cel/mL<sup>-1</sup> para o biocontrole de bolor verde e azul de citros, verificando redução dos diâmetros das lesões em cerca de 3cm e >30% da incidência das doenças e em

um período de 4 dias. Contudo quando o período de armazenamento das frutas aumentou de 4 para 8 dias, a eficiência de controle das leveduras sobre os bolores diminuiu.



**Figura 3.19.** Severidade de bolor verde dos citros às 120h pós-inoculação em frutos de laranja inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados com cepas de leveduras (A) *Pichia caribbica* (CCMA 0759), (B) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), (C) *Pichia manshurica* (CCMA 0762), (D) *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763), (E) Controle.

**Fonte:** o autor.

No caso do presente experimento, a presença de doença em frutos não inoculados com *P. digitatum* (controle) pode ter acontecido pela presença de esporos no ar no momento da montagem dos experimentos.

Uma das hipóteses sobre a inexistência de controle do bolor verde pelas cepas de leveduras é o fato da concentração de levedura utilizada no presente experimento ter sido mais baixa do que a usada em outros trabalhos. Luo, Zeng e Ming, (2012), utilizaram uma concentração de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de *P. membranefaciens* no tratamento de frutos de citros para o controle de *P. digitatum* e *P. italicum* e observaram que a incidência da doença nos frutos tratados com

suspensão de células de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> foi cerca de 72 e 85% menor do que nos frutos controle no 6º e/ou 7º dia após inoculação com *P. digitatum* e *P. italicum*, respectivamente.

Dados relacionados ao controle de bolor verde por compostos orgânicos voláteis, demonstraram que *W. anomalus* BS91, obteve o melhor desempenho entre todas as leveduras testadas por Parafati *et al* (2017), onde reduziu significativamente a incidência (60%), severidade (20%) e o diâmetro da lesão (1,3 cm) de bolor verde em frutos de tangerina.

Mekbib, Regnier e Korsten (2011), avaliando a atividade das leveduras e a incidência da doença causada por *P. digitatum* pós-colheita, evidenciaram que as cepas de leveduras TiL 4-2 *C. sake*, *C. laurentii*: TiL 4-3 e MeJtW 10-2 reduziram em 95%, 65% e 85% a incidência de bolor verde em laranjas.

Liu *et al* (2017) identificou que a cepa FL02 de *Metschnikowia* sp. é capaz de inibir completamente o crescimento do bolor verde, em laranjas. As cepas de *C. oleophila* (FL14), *Metschnikowia* sp. (FL01) e de *C. fermentati* (JF34 e JF21) também apresentaram redução significativa do desenvolvimento do bolor verde em 70% ou mais.

Em seu trabalho, Taqarort *et al* (2008), determinaram que as estirpes das leveduras, *P. anomala* (YT73), *D. hansenii* (YT22) e *H. guilliermondii* (YT13) em concentrações de  $10^8$  cél. mL<sup>-1</sup> contra  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> de *P. digitatum*, reduziram significativamente o desenvolvimento da doença (mais de 60% de incidência da doença) nos frutos quando comparado ao controle.

Outra hipótese sobre a falta de controle da doença no presente trabalho pode estar na ordem de inoculação das leveduras e o patógeno. No trabalho de Luo, Zeng e Ming (2012) o tempo de inoculação entre *P. membranefaciens* e *P. digitatum* e *P. italicum* apresentou uma influência significativa na incidência da doença, pois quando trataram-se os frutos 48, 24, 8 e 4h antes da inoculação com o patógeno, houve uma incidência menor da doença no 4º dia de incubação, do que nos frutos inoculados com a levedura após o patógeno. Quando as leveduras foram aplicadas 48h antes, foi inibida totalmente a doença. No presente trabalho, o fato das leveduras terem sido aplicadas 2h após o patógeno, pode ter sido um dos motivos de não ocorrer a inibição do desenvolvimento da doença.

A cepa CCMA 0759 de *Pichia caribbica* apresentou o maior antagonismo em placa através de substâncias difusíveis no meio tanto para *B. cinerea*

quanto para *P. digitatum*, mas não apresentou atividade de enzimas extracelulares *in vitro*. Já no experimento com morango pós-colheita apresentou os melhores resultados de controle do mofo cinzento até 96h após a inoculação com *B. cinerea*. Isto sugere antagonismo através de mecanismos de antibiose e competição de nutrientes. No entanto, esta cepa não foi eficaz no controle de bolor verde em laranjas.

Por outro lado, a cepa de *L. thermotolerans* (CCMA 0763), que apresentou os melhores resultados nos ensaios de antagonismo por VOCs e de produção de glucanase e gelatinase não foi eficiente no controle das doenças nos experimentos *in vivo*. A produção de pectinase por parte desta cepa pode ser a responsável pelo baixo desempenho quando testada em frutas, pois a degradação da pectina da parede celular vegetal pode beneficiar a atividade de colonização do patógeno.

A cepa CCMA 0762 de *P. manshurica*, que apresentou resultados semelhantes à cepa CCMA 0763 na produção de glucanase e gelatinase, além do fator killer positivo e antagonismo em placa contra *P. digitatum*, não foi eficiente no controle do mofo cinzento em morango nem do bolor verde em laranjas.

### 3.6 Conclusões

- Somente a cepa *Pichia manshurica* (CCMA 0762) apresentou o fenótipo *killer*.
- A atividade de enzimas liticas extracelulares foi evidenciada nas cepas *Pichia manshurica* (CCMA 0762) (positiva para protease,  $\beta$ -1,3- glucanase e gelatinase) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) (positiva para pectinase,  $\beta$ -1,3- glucanase e gelatinase).
- Houve efeito antagônico de compostos orgânicos voláteis contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*, destacando-se a levedura *Lachanceae thermotolerans* (CCMA 0763).
- Para as substâncias difussíveis contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum* destaca-se as cepas de *Pichia caribbica* (CCMA 0759), e a cepa *Pichia manshurica* (CCMA 0762).
- Em ensaio *in vivo*, as cepas *Pichia caribbica* (CCMA 0759), *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760) e *Pichia manshurica* (CCMA 0762), apresentaram controle significativo do mofo cinzento em pseudofrutos de morango.

- A cepa *Pichia caribbica* (CCMA 0759) foi a que apresentou menores valores de incidência às 72 h pós-inoculação.
- Nenhuma das cepas de leveduras testadas apresentaram controle de bolor verde em laranjas pós-colheita.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUQAMAR, S.; MOUSTAFA, K.; TRAN, L-S. P.; Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 37, n. 2, p. 262-274, 2017.

AGRIOS, G.N. Fruit and general diseases caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). In: **Plant Pathology**. 5<sup>o</sup> ed. New York. Academic Press, p. 510-514. 2005.

ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: an attractive source of pectinases—from gene expression to potential applications: a review. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1525-1537, 2011.

ALVES, M.L.N. Avaliação do potencial de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Rhodospiridium* no controle biológico pós-colheita de bolores. 2007. 121p. Dissertação (Mestrado – Controle de qualidade e Toxicologia dos Alimentos). Universidade de Lisboa – Faculdade de Farmácia.

ALOUI, H.; LICCIARDELLO, F.; KHWALDIA, K.; HAMDI, M.; RESTUCCIA, C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal of Food Microbiology**. V. 200, p. 22-30. 2015.

ANTUNES L.E.C; VIGNOLO G.K; GONÇALVES M.A. Morango cresce em números mundiais. In: **Campo & Negócios**, Anuário HF p.90-77. 2016. Disponível em: [https://issuu.com/revistacampoenegocios/docs/anu\\_\\_rio\\_hortifr\\_\\_ti.compressed](https://issuu.com/revistacampoenegocios/docs/anu__rio_hortifr__ti.compressed). Acesso dia 05 jul 2018.

ANTUNES, L. E. C.; FAGHERAZZI, A. F.; VIGNOLO, G. K. Morangos tem produção crescente. In: **Campo & Lavoura**, Anuário HF, n.1, p.96-102, 2017. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1067379/1/LuisEduardo02.14.01.019.01.003HF2017.pdf>. Acesso dia 15 de Jul 2019.

ANTUNES, L.E.C.; PERES, N. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**. V. 13, n. 1-2, p. 156-161. 2013.

ANTUNES, J.; AGUIAR, C. Search for killer phenotypes with potential for biological control. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 1, p. 427-433, 2012.

BAJAJ, B. K.; RAINA, S.; SINGH, S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 8, p. 645-656, 2013.

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

BASSANEZI, R.B.; SILVA JR, G.J.; FEICHTENBERGER, E.; BELASQUE JR, J.; BEHLAU, F.; WULFF, N.A. Doenças dos Citros. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. 5<sup>o</sup> ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p. 271-306. 2016.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GIESE, E.C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.  $\beta$ -1, 3-Glucanases Fúngicas: Produção e Aplicações Biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010.

BENATO, E.A.; BELLETTI, T.C.; TERAQ, D.; FRANCO, D.A.S. Óleos essenciais e tratamento térmico no controle pós-colheita de bolor verde em laranja. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p.65-71, 2018.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Capítulo 3: Impacto das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças em plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente** p. 29-48. 2009.

BLUMER, S. A. G. **Enriquecimento com ferro em *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba, 2002. 53p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

BORGES, A.C.G.; COSTA, V.M.H.M. A evolução do agronegócio citrícola paulista e o perfil da intervenção do estado. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 9, n. 2, p. 101-124, 2005.

BRUNETTO, A. E.; DORNELES, K. R.; MULLER, C.; DALLAGNOL, L. J. Sais inorgânicos no controle em pós-colheita de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. em laranja. **Biotemas**, v. 31, n. 4, p. 65-69, 2018.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**,

v.93, n.6, p.1020-1025, 2002.

CALVETE, E.O.; MARIANI, F.; WESP, C.L.; NIENOW, A.A.; CASTILHOS, T.; CECCHETTI, D. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 2, p. 396-401, 2008.

CAI, Z.; YANG, R.; XIAO, H.; QIN, X.; SI, L. Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. **Postharvest Biology and Technology**. v. 100, p. 52-58. 2014.

CALVO, H.; MARCO, P.; BLANCO, D.; ORIA, R.; VENTURINI, M.E. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agente of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**. v. 63, p. 101-110. 2017.

CASTILLO, L.; PLAZA, V.; LARRONDO, L. F.; CANESSA, P. Recent Advances in the Study of the Plant Pathogenic Fungus *Botrytis cinerea* and its Interaction with the Environment. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 10, p. 976–989, 2017.

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

CHAMPAGNE, C. P.; SAVARD, T.; BEAULIEU, C. A potential *killer* yeast to control secondary fermentation in vegetables. **Journal Food Microbiology**. v. 1, n.1, p. 14-21. 2017.

CHAN, Z.; QUIN, G.; XU, X.; LI, B.; TIAN, S. . Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 5, p. 1677-1688, 2007.

CHAROENCHAI, C.; FLEET, G. H.; HENSCHKE, P. A.; TODD, B. E.N. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, n. 1, p. 2-8, 1997.

CHEN, P.; CHEN, R.; CHOU, J. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. **Mycobiology**, v. 46, n. 1, p. 33-46, 2018.

CIRVILLERI, G.; ZAKANY, N.; CAPECE, A.; ROMANO, P.; SIPCZKI, M. Potential

biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 11-12, p. 654-666, 2005.

COELHO, A.R.; HOFFMANN, F.L.; HIROOKA, E.Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.2, p. .337-358, 2003.

COELHO, A. R.; NÓBREGA, G. M. A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Evaluation of potential antagonism in yeasts, seeking biocontrol of spoilage by *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, Sup 1, p. 1879-1892, 2011.

CSOMA, H. *et al.* Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 239-248, 2010.

DA SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 9, p. 859-865, 2005.

DI FRANCESCO, A.; UGOLINI, L.; LAZZERI, L.; MARI, M. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, v. 81, p. 8-14, 2015.

DONMEZ, M. F.; ESITKEN, H.; YILDIZ, H.; ERCISLI, S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 758-763, 2011.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; PORAT, R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 393-399, 2002.

DRUVEFORS, U. Å. *Yeast biocontrol of grain spoilage moulds – Mode of action of Pichia anomala*. 2004. 44f. Doctoral thesis. Department of Microbiology. **Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala**. ISSN 1401-6249.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 421, 2012.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUES JR, J. Doenças dos Citros. In: In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. 4<sup>o</sup> ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p. 239-269. 2005.

FERREIRA, L.V. Conservação *in vitro* de morangueiro via crescimento lento e criopreservação. 2017. 143f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2017.

FERREIRA-SAAB, M.; FORMEY, D.; TORRES, M.; ARAGÓN, W.; PADILLA, E.A.; TROMAS, A.; SOHLENKAMP, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SERRANO, M. Compounds released by the biocontrol yeast *Hanseniaspora opuntiae* protect plants against *Corynespora cassiicola* and *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Microbiology**. v.9, p.1596. 2018.

FERRAZ, L.P. **Estudo dos mecanismos de ação de leveduras envolvidos no biocontrole de doenças de pós-colheita em citros**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias x, 91 p.114: il.; 28 cm. Jaboticabal, 2014.

FISCHER, I.H.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.3, p. 219-226. 2008.

FLEURI, L. F.  $\beta$ -1,3 glucanases, proteases e quitinases: produção, purificação e aplicação. 2006. 231f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2006.

FLEURI, L. F.; SATO, H.H. Produção de protoplastos e lise da parede celular de leveduras utilizando  $\beta$ -1, 3 glucanase. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 2, p.471-476. 2010.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H.  $\beta$ -1,3 glucanases e quitinases: Aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência Agrotec**. v. 32, n. 4, p. 1224-1231, 2008.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FONTANA, D. C.; KULCZYNSKI, S.M.; TREVISAN, R.; PINHEIRO, M.V.M.; DIEL, M.I.; PINHEIRO, M.O. Manejo de controle de patógenos durante o desenvolvimento e na pós-colheita de frutos de pessegueiro. **Cultura Agronômica: Revista de Ciências Agronômicas**, v. 27, n. 1, p. 124-140, 2018.

FORNER, C.; BETTIOL, W.; NASCIMENTO, L.M.; TERAPO, D. Controle em pós-colheita de *Penicillium digitatum* em laranja-pera com microrganismos e tratamento térmico. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 1, p. 023-031, 2013.

FRANCO, A.S.M. O suco de laranja brasileiro no mercado global. **Análise conjuntural**, v.38, n.11-12/nov./dez. 2016.

FRANCO, D. A. S; BETTIOL, W. **Controle de bolor verde em pós-colheita de citros com produtos alternativos**. Embrapa Meio Ambiente, Nº.10, p.1-4, 2000. ISSN 1414-6371.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n.1, p. 48-57, 2012.

GARDINI, F.; TOFALO, R.; BELLETI, N.; IUCCI, L.; SUZZI, G.; TORRIANI, S.; GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese Cheese. **Food microbiology**, v.23, n.7, p.641-648, 2006.

GONZÁLEZ-ESTRADA, R. R.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J.A.; BAUTISTA-ROSALES, P.U.; CALDERÓN-SANTOYO, M. Control of blue mold decay on Persian lime: Application of covalently cross-linked arabinoxylans bioactive coatings with antagonistic yeast entrapped. **LWT-Food Science and Technology**, v.85, p.187-196, 2017.

GOUVEA, A. **Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba: [s.n.]. v. xviii, 85f, 2007.

GRONOVER, C.S.; KASULKE, D.; TUDZYNSKI, P.; TUDZYNSKI, B. The Role of G Protein Alpha Subunits in the Infection Process of the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 11, p. 1293-1302, 2001.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial

pectinases—a review. **Process biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987-996, 2003.

GUO, J.; FANG, W.; LU, H.; ZHU, R.; LU, L.; ZHENG, X.; YU, T. Inhibition of green mold disease in mandarins by preventive applications of methyl jasmonate and antagonistic yeast *Cryptococcus laurentii*. **Postharvest biology and technology**, v. 88, p. 72-78, 2014.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, W. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002.

İZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; ACUN, T. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- $\beta$ -1, 3-glucanase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 669-676, 2006.

İZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; SERTKAYA, A. Enzymic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2200-2206, 2005.

İZGÜ, F.; ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the K5-Type yeast *killer* protein and its homology with an exo- $\beta$ -1,3-glucanase. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 68 n.3, p. 685–693, 2004.

JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 411-441, 2002.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KILANI-FEKI, O.; KHEDHER, S.B.; DAMMAK, M.; KAMOUN, A.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M.; TOUNSI, S. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological Control**. v. 95, p. 73-82, 2016.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts, a Taxonomic Study. 5<sup>o</sup> ed. v. 1, p. 3-5, 2011.

LAHLALI, R.; SERRHINI, M. N.; JIJAKLI, H. Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in Morocco. **comm. appl. biol. sci. Ghent University**, v. 69, n. 4, p. 601-609, 2004.

LARA-MÁRQUEZ, A. L.; ZAVALA-PÁRAMO, M. G.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CAMACHO, H. C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 5, p. 859-868, 2011.

LEE, S. O.; KIM, H. Y.; CHOI, G. J.; LEE, H. B.; JANG, K. S.; CHOI, Y. H.; KIM, J. C. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and Rhizoctonia root rot on moth orchid. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1213-1219, 2009.

LIMA, J.R.; GONÇALVES, L.R.B.; BRANDÃO, L.R.; ROSA, C.A.; VIANA, F.M.P. Isolation, identification and activity *in vitro* of killer yeast against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n.7, p. 590-599, 2012.

LIMA, J. R.; BRUNO, L. M.; SILVA, J. L. A.; CASIMIRO, A. R. S. Potencial de utilização de leveduras "killer" para produção de cachaça. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 4, p. 366-371, 2007.

LIU, Y.; WANG, W.; ZHOU, Y.; YAO, S.; DENG, L.; ZENG, K. Isolation, identification and *in vitro* screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. **Biological Control**, v. 110, p. 18-24, 2017

LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 2, p. 153-160, 2013.

LIU, H. M.; GUO, J. H.; CHENG, Y. J.; LUO, L.; LIU, P.; WANG, B. W. DENG, B. X.; LONG, C. A. Control of gray mold of grape by *Hanseniaspora uvarum* and its effects on postharvest quality parameters. **Annals of microbiology**, v. 60, n. 1, p. 31-35, 2010.

LOPES, J. M. S.; DÉO, T.F.G.; ANDRADE, B.J.M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância econômica do citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. v. 2, n. 2, p. 1-4, 2011.

LUO, Y.; ZENG, K.; MING, J. Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranifaciens* and induction of defense responses. **Scientia horticulturae**, v. 135, p. 120-127, 2012.

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

MACARISIN, D.; DROBY, S.; BAUCHAN, G.; WISNIEWSKI, M. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist–fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol?. **Postharvest Biology and Technology**, v. 58, n. 3, p. 194-202, 2010.

MACHADO, B.I. **Controle da podridão azeda em frutos cítricos através de métodos alternativos**. 2018. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural). Universidade Federal de São Carlos, Campus Araras, Araras. 2018.

MACHADO, J. Strawberry cultivars: Knowing to expand and reduce the environmental impacts. **Revista GEAMA**. v.2, n.2, p. 82-92. 2016.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLO, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa , v. 35, n. 1, p. 274-288, jun. 2012.

MARI, M.; DI FRANCESCO, A.; BERTOLINI, P. Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. **Stewart Postharvest Review**. v. 10, n. 1, p. 1-4, 2014.

MARI, M.; NERI, F.; SPADONI, A. Natural compounds: an alternative in postharvest disease control. **ACTA HORTIC**. v .1144. p.385-390. 2016.

MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; GARCÍA, J. M.; POZO, M. J. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 922, 2015.

MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of  $\beta$ -1, 3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. **Current microbiology**, v. 44, n. 6, p. 391-395, 2002.

MEDEIROS, F.H.V.; SILVA, J.C.P.; PASCHOLATI, S.F. Controle biológico de doenças em plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A.; **Manual de fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 5<sup>o</sup> ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p. 261-274. 2016.

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

MELLO MRF; SILVEIRA EB; VIANA IO; GUERRA ML; MARIANO RLR. 2011. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira** v.29, n.1, p. 78-83. 2011.

MENEL, K.; FATEN, K.; MOKTAR, H. Combining biocontrol agente and high oxygen atmosphere, to reduce postharvest decay of strawberries. **African Journal of Microbiology Research**. v.6, n. 24, pp. 5179-5187, 2012.

MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J. I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2004.

MERTELY, J.C.; OLIVEIRA, M.S.; PERES, N.A. *Botrytis* fruit rot or gray mold of Strawberry. **Technical Report**. University of Florida. pp.230. 2018.

MOLINA, A. M. R. **A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) no estado de Santa Catarina: sistemas de produção e riscos climáticos**. 2016. 195 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 73-83, 2012.

MOURA, V.S. **Caracterização bioquímica e funcional de toxina *killer* produzida por *Saccharomyces cerevisiae***. 2017. 34p. Dissertação( Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.Jaboticabal.2017.

MOUYNA, I.; AIMANIANDA, V.; HARTL, L.; PREVOST, M. C.; SISMEIRO, O.; DILLIES, M. A.; JAGLA, B.; LEGENDRE, R.; COPPEE, J. Y.; LATGÉ, J. P. GH16 and GH81 family  $\beta$ -(1, 3)-glucanases in *Aspergillus fumigatus* are essential for

conidial cell wall morphogenesis. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 9, p. 1285-1293, 2016.

MOUYNA, I.; HARTL, L.; LATGÉ, J-P.  $\beta$ -1, 3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 81, 2013.

NAKAGAWA, T.; NAGAOKA, T.; TANIGUCHI, S.; MIYAJI, T.; TOMIZUKA, N. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 383-387, 2004.

NUNES, C.A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal Plant Pathology**. v. 133, n. 1, p. 181-196. 2012.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras. 1991.

ORO, L.; FELIZIANI, E.; CIANI, M.; ROMANAZZI, G.; COMITINI, F. Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. **International journal of food microbiology**, v. 265, p. 18-22, 2018.

PAGANS, E.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. **Journal of hazardous materials**, v. 131, n. 1-3, p. 179-186, 2006.

PALOU, L. Chapter 2: *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* ( Green Mold, Blue Mold). In: BAUTISTA-BAÑOS. **Postharvest Decay: Control Strategies**. Elsevier. p. 46-86. 2014.

PANEBIANCO, S.; VITALE, A.; POLIZZI, G.; SCALA, F.; CIRVILLERI, G. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. **Biological Control**, v. 84, p. 19-27, 2015.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. **Food microbiology**, v. 63, p. 191-198, 2017.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, v. 47, p. 85–92, 2015.

PARISI, M.C.M.; COSTA, H.; BETTI, J.A.; TANAKA, M.A.S.; MAY-DE MIO, L.L. Doenças do Morangueiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. 5<sup>o</sup> ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p. 561-572. 2016.

PEREZ, M. F.; IBARRECHE, J. P.; ISAS, A. S.; SEPULVEDA, M.; RAMALLO, J.; DIB, J. R. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control**, v. 115, p. 135-140, 2017.

PÉREZ-FUENTES, C.; RAVANAL, M. C.; EYZAGUIRRE, J. Heterologous expression of a *Penicillium purpurogenum* pectin lyase in *Pihcia pastoris* and its characterization. **Fungal biology**, v. 118, n. 5-6, p. 507-515, 2014.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S. CIRVILLERI, G. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**. v. 30, n.1, p.219-255, 2011.

PRETORIUS, D.; VAN ROOYEN, J.; CLARKE, K.G. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. **New Biotechnonology** v. 32, n.2, p. 243-252. 2015.

RESTUCCIA, C.; GIUSINO, F.; LICCIADERLLO, F.; RANDAZZO, C.; CAGGIA, C.; MURATORE, G. Biological control of peach fungal pathogens by commercial products and indigenous yeasts. **Journal of food protection**, v. 69, n. 10, p. 2465-2470, 2006.

ROMANAZZI, G.; SMILANICK, J.L.; FELIZIANI, E.; DROBY, S. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. **Postharvest Biology and Technology**. v. 113, p. 69-76, 2016.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; VILLALOBOS, M.C.; CALLE, A.; SERRADILLA, M.J. CÓRDOBA, M.G.; HERNÁNDEZ, A. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**. 57, p 45-53, 2016.

SALLAM, M. A N.; BADAWY, I. F. M.; IBRAHIM, A. R. Biocontrol of green mold of orange using some yeasts strains and their effects on postharvest quality parameters. **International Journal of Plant Pathology**, v. 3, n. 1, p. 14-24, 2012.

SANTOS D.A.; OLIVEIRA. D.F.; TONIAL, I.B.; YAMAGUCHI, M.M.; COELHO, A.R. Controle biológico em morangos *in natura*. In: **Tópicos em ciência e tecnologia de alimentos: resultados de pesquisa acadêmicas**. São Paulo: Blucher, 2016. vol. 2. p.175-200. Disponível em: <<https://openaccess.blucher.com.br/article-details/control-biologico-em-morangos-in-natura-19922>>. Acesso em: 03.jul.2019

SANTOS, L.F. **Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* 191 e estudo da lise enzimática de leveduras**. 2000. 71p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas. São Paulo.

SANTOS, A.; MAURO, M. S.; BRAVO, E.; MARQUINA, D. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 624-634, 2009.

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

SHARMA, R. R., SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, 50, p. 205- 221, 2009.

SILVA, M. S. B. DOS S. E; RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIRA, L. DE J. M. G. DE; SILVA, E. K. C. E; PEREIRA, T. DOS S. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 511–517, 2014.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**.v. 64, p. 27-37. 2014.

SOARES, L.A.A.; BRITO, M.E.B.; FERNANDES, P.D.; LIMA, G.S.; SOARES FILHO, W.S.; OLIVEIRA, E.S. Crescimento de combinações copa - porta-enxerto de citros sob estresse hídrico em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.19, n.3, p.211-217, 2015.

SOUZA, C.P.; BURBANO-ROSETO, E.M.; ALMEIDA, B.C.; MARTINS, G.G.;

ALBERTINI, L.S.; RIVERA, I.N.G. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. **World Journal Microbiology**, v.25, n.11, p.2079-2082, 2009.

SOUSA, L.C. **Avaliação do desempenho de *Bacillus licheniformis* E-44 em diferentes condições de cultivo visando a obtenção de hidrolisado enzimático de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

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

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 1, p. 182-190, 2001.

SUKORINI, H.; SANGCHOTE, S.; KHEWKHOM, N. Control of postharvest green mold of citrus fruit with yeasts, medicinal plants, and their combination. **Postharvest biology and technology**, v. 79, p. 24-31, 2013.

TAQARORT, N.; ECHAIRI, A.; CHAUSSOD, R.; NOUAIM, R.; BOUBAKER, H.; BENAOUMAR, A. A.; BOUDYACH, E. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3031-3038, 2008.

UCHÔA, C.N. **Desenvolvimento de um sistema de apoio à decisão para a diagnose de doenças, pragas e distúrbios abióticos dos citros**. 2007, 44 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras. Lavras.

VAN KAN, J. A. L.; STASSEN, J. H. M.; MOSBACH, A.; A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 1, p. 75-89, 2017.

VEGA, K.; KALKUM, M. Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2011. doi:10.1155/2012/920459

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; PRIJI, P; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances In Enzyme Research**, v. 01, n. 03, p. 39-51, 2013. Scientific Research

Publishing, Inc., <http://dx.doi.org/10.4236/aer.2013.13005>.

VILANOVA, L.; WISNIEWSKI, M.; NORELLI, J.; VIÑAS, I.; TORRES, R.; USALL, J.; PHILLIPS, J.; DROBY, S.; TEIXIDÓ, N. Differential apple transcriptomic responses to *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection. In: **III International Symposium on Postharvest Pathology: Using Science to Increase Food Availability 1144**. 2015. p. 49-56.

XIE, Xi.; LIPKE, P. N. On the evolution of fungal and yeast cell walls. **Yeast**, v. 27, n. 8, p. 479-488, 2010.

XU, X. B.; TIAN, S. P. Reducing oxidative stress in sweet cherry fruit by *Pichia membranifaciens*: a possible mode of action against *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology*, New York, v. 105, p. 1170-1177, 2008.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561–580, 2007.

WANG, Y.; TANG, F.; XIA, J.; YU, T.; WANG, J.; AZHATI, R.; ZHENG, X. D. A combination of marine yeast and food additive enhances preventive effects on postharvest decay of jujubes (*Zizyphus jujuba*). **Food chemistry**, v. 125, n. 3, p. 835-840, 2011.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 245-258, 1991.

ZEIDAN, R.; UL-HASSAN, Z.; AL-THANI, R.; BALMAS, V.; JAOUA, S. Application of Low-fermenting yeast *Lachancea thermotolerans* for the control of toxigenic fungi *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum* and *Fusarium graminearum* and their mycotoxins. **Toxins**. 10, n. 6, p.242, 2018.

ZHANG, H.; YANG, Q.; LIN, H.; REN, X.; ZHAO, L.; HOU, H. Phytic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* against postharvest gray mold spoilage and natural spoilage of strawberries. **LWT-Food science and technology**, v. 52, n. 2, p. 110-115, 2013.

ZHANG, H.; MA, L.; TURNER, M.; XU, H.; ZHENG, X.; DONG, Y.; JIANG, S. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* against postharvest

Rhizopus rot of strawberries and the possible mechanisms involved. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 577-583, 2010.

ZHOU, Y.; MING, J.; DENG, L.; ZENG, K. Effect of *Pichia membranifaciens* in combination with salicylic acid on postharvest blue and green mold decay in citrus fruits. **Biological Control**. 74, p. 21-29, 2014.