



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Alternaria alternata* EM
TOMATES NO PÓS-COLHEITA: MECANISMOS, RESISTÊNCIA A ESTRESSES E
FORMULAÇÃO

ARIANE SILVA BOSQUEIRO

Araras
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Alternaria alternata* EM
TOMATES NO PÓS-COLHEITA: MECANISMOS, RESISTÊNCIA A ESTRESSES E
FORMULAÇÃO

ARIANE SILVA BOSQUEIRO

ORIENTADOR: PROFA. DRA. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2019

Silva Bosqueiro, Ariane

Leveduras como agentes de controle de *Alternaria alternata* em tomates no pós-colheita: mecanismos, resistência a estresses e formulação / Ariane Silva Bosqueiro. -- 2019.

96 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Márcia Maria Rosa Magri

Banca examinadora: Márcia Maria Rosa Magri, Silvana Perissatto Meneghin, Luriany Pompeo Ferraz

Bibliografia

1. Leveduras. 2. Controle biológico. 3. *Alternaria alternata* em tomates.
I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ariane Silva Bosqueiro, realizada em 27/03/2019:



Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri
UFSCar



Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin
UFSCar



Profa. Dra. Lúriany Pompeo Ferraz
Orgolabs

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por estar presente nesta caminhada, me ajudando em todos os sentidos e me dando toda a força necessária para sempre seguir em frente.

À minha família, minhas irmãs e meus pais, que sempre me apoiaram em todos os momentos. Agradeço por todo carinho, cuidado e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês eu não teria conseguido.

À minha orientadora, profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri, por todo ensinamento ao longo do tempo, por compartilhar seus conhecimentos e experiência. Pela confiança em meu trabalho e pela disponibilidade em todos os momentos em que precisei.

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados pela oportunidade e ensinamentos.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrária e Molecular (LAMAM) pela estrutura concedida ao desenvolvimento do projeto. Às professoras Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini e Dra. Silvana Perissatto Meneghin, e à técnica Lucinha pelo acolhimento e disponibilidade. À estagiária Caroline pela ajuda na realização dos testes finais. Aos amigos Elizabete, Isabella, José Neto e Ligianne pela amizade, companheirismo e apoio, fazendo com que a rotina ficasse mais leve.

Ao meu namorado Rodolfo, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos em que mais precisei. Por acreditar em meu potencial e incentivar-me a continuar mesmo diante de dificuldades. Pela companhia ao laboratório em vários fins de semana e por toda ajuda.

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

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE QUADROS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	04
REVISÃO DA LITERATURA.....	05
1 O gênero <i>Alternaria</i>	05
2 <i>Alternaria alternata</i> em tomates.....	06
3 Controle biológico.....	07
4 Leveduras no controle biológico em pós-colheita.....	09
5 Produção de enzimas hidrolíticas.....	10
6 Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs).....	11
7 Produção de biofilme.....	13
8 Resistência a estresses ambientais.....	13
9 Resistência a fungicidas.....	16
10 Formulações para micro-organismos agentes de controle biológico.....	16
LITERATURA CITADA.....	19
CAPÍTULO 1. Mecanismos de ação utilizados por <i>Torulaspora globosa</i> e <i>Trichosporon asahii</i> no controle de <i>Alternaria alternata</i>.....	28
1 Resumo.....	28
2 Introdução.....	29
3 Materiais e Métodos.....	30
3.1 Micro-organismos.....	30
3.2 Tomates para teste de produção de COVs.....	31
3.3 Produção de enzimas hidrolíticas.....	31
3.3.1 Quitinase.....	31
3.3.2 β -1,3-glucanase.....	32
3.4 Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) com ação antifúngica.....	32

3.5	Produção de biofilme.....	34
3.6	Análise estatística.....	34
4	Resultados e Discussão.....	35
4.1	Produção de enzimas hidrolíticas.....	35
4.2	Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) com ação antifúngica.....	37
4.3	Produção de biofilme.....	40
5	Conclusões.....	42
6	Literatura citada.....	43
CAPÍTULO 2. Resistência a estresses pelas leveduras <i>Torulaspota globosa</i> e <i>Trichosporon asahii</i>.....		47
1	Resumo.....	47
2	Introdução.....	48
3	Materiais e Métodos.....	49
3.1	Leveduras.....	49
3.2	Resistência das leveduras a estresses ambientais.....	50
3.2.1	Temperatura.....	50
3.2.2	Estresse osmótico.....	50
3.2.3	Estresse oxidativo.....	50
3.3	Resistência das leveduras a diferentes concentrações de fungicida a base de mancozebe.....	51
3.4	Análise estatística.....	51
4	Resultados e Discussão.....	51
4.1	Resistência das leveduras a estresses ambientais.....	51
4.1.1	Temperatura.....	51
4.1.2	Estresse osmótico.....	56
4.1.3	Estresse oxidativo.....	59
4.2	Resistência das leveduras a diferentes concentrações de fungicida a base de mancozebe.....	62
5	Conclusões.....	64
6	Literatura citada.....	65
CAPITULO 3. Avaliação de formulações na aderência das leveduras e no controle de <i>Alternaria alternata</i> em tomates.....		68

1	Resumo.....	68
2	Introdução.....	69
3	Materiais e Métodos.....	70
3.1	Micro-organismos.....	70
3.2	Tomates.....	71
3.3	Avaliação de formulações na aderência das leveduras na superfície de tomates.....	71
3.4	Avaliação do controle de <i>Alternaria alternata</i> em tomates por formulação contendo a levedura.....	72
3.5	Análise estatística.....	72
4	Resultados e Discussão.....	73
4.1	Avaliação de formulações na aderência das leveduras na superfície de tomates.....	73
4.2	Avaliação do controle de <i>Alternaria alternata</i> em tomates por formulação contendo a levedura.....	75
5	Conclusões.....	80
6	Literatura citada.....	80
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83

ÍNDICE DE QUADROS

Página

Capítulo 1

Quadro 1. Categorias para a descrição da podridão desenvolvida nas lesões quanto a presença de micélio e esporos.....	33
--	----

Capítulo 3

Quadro 1. Categorias para a descrição da podridão desenvolvida nas lesões quanto à presença de micélio e esporos.....	72
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Capítulo 1

Tabela 1. Formação de biofilme pelas linhagens das leveduras (5S55 e 3S44), medida pela absorvância das amostras coradas com cristal violeta.....	41
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Capítulo 1	
Figura 1. Montagem do teste de COVs. (A) Caixa representando uma replicata do tratamento. (B) Esquema lateral da caixa.....	33
Figura 2. Exemplo das categorias para presença de micélio e esporos nas lesões com podridão.....	34
Figura 3. Liberação de glicose ao longo do tempo, associada com a produção de β -1,3-glucanase pelas leveduras <i>T. globosa</i> (5S55) e <i>T. asahii</i> (3S44).....	36
Figura 4. Diâmetro da podridão causada por <i>A. alternata</i> em teste para verificar a produção de COVs em incubação durante 5 dias a 25 °C. Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas para análise de variância a 5% (ANOVA one-way). Barras indicam erro padrão da média.....	38
Figura 5. Podridão nos tomates em teste de produção de COVs provocadas por <i>A. alternata</i> após incubação durante 5 dias a 25 °C. Os tomates estão representando (A) tratamento controle, (B) tratamento com <i>T. globosa</i> (5S55) e (C) tratamento com <i>T. asahii</i> (3S44).....	38
Figura 6. Visão geral da replicata com tomates no teste de produção de COVs com podridão causada por <i>A. alternata</i> após incubação durante 5 dias a 25 °C. (A) Tratamento controle. (B) Tratamento com <i>T. globosa</i> (5S55). (C) Tratamento com <i>T. asahii</i> (3S44).....	39
Figura 7. Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de (A) micélio e (B) esporos.....	39
Figura 8. Formação de biofilme pelas leveduras após 48 horas de incubação sob agitação de 75 rpm. (A) Controle sem a presença das leveduras. (B) <i>T.</i>	

<i>globosa</i> (5S55). (C) <i>T. asahii</i> (3S44).....	41
---	----

Capítulo 2

Figura 1. Cultivo de <i>T. globosa</i> (linhagem 5S55) em temperaturas de 10, 20 e 30 °C. (A) Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. (B) Porcentagem de células mortas.....	52
--	----

Figura 2. Cultivo de <i>T. asahii</i> (linhagem 3S44) em temperaturas de 10, 20 e 30 °C. (A) Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. (B) Porcentagem de células mortas.....	54
---	----

Figura 3. Cultivo de <i>T. globosa</i> (linhagem 5S55) em meio BD suplementado com 0, 3, 6 e 9% de NaCl. (A) Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. (B) Porcentagem de células mortas.....	57
---	----

Figura 4. Cultivo de <i>T. asahii</i> (linhagem 3S44) em meio BD suplementado com 0, 3, 6 e 9% de NaCl. (A) Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. (B) Porcentagem de células mortas.....	58
--	----

Figura 5. Cultivo de <i>T. globosa</i> (linhagem 5S55) em meio BD suplementado com 0, 10, 20, 30 e 40 mM de H ₂ O ₂ . (A) Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. (B) Porcentagem de células mortas.....	60
--	----

Figura 6. Cultivo de <i>T. asahii</i> (linhagem 3S44) em meio BD suplementado com 0, 10, 20, 30 e 40 mM de H ₂ O ₂ . (A) Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. (B) Porcentagem de células mortas.....	61
---	----

Figura 7. Placas com adição de diferentes concentrações do fungicida Manzate WG [®] (mg/mL) em meio YEPD após 48 horas de incubação a 30 °C...	63
--	----

Capítulo 3

- Figura 1.** Número de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate), em formulação com amido de milho ou gelatina a 2%, recuperadas da superfície do tomate após incubação a 30 °C durante 48 horas. **(A)** Formulação com *T. globosa* (5S55) e com **(B)** *T. asahii* (3S44). Tratamentos com letras diferentes são significativamente diferentes a 5% pelo teste de Tukey. Barras indicam erro padrão da média..... 74
- Figura 2.** Diâmetro da podridão causada por *A. alternata*, em frutos tratados com formulação de amido de milho a 2%, incubados durante 7 dias a 25 °C. Tratamentos com letras diferentes são significativamente diferentes a 5% pelo teste Skott-knott. Barras indicam erro padrão da média..... 77
- Figura 3.** Podridão em lesões nos tomates revestidos com formulação de amido de milho a 2%, provocadas por *A. alternata* após incubação durante 7 dias a 25 °C. Os tomates estão representando **(A)** tratamento controle, **(B)** tratamento com *T. globosa* (5S55) e **(C)** tratamento com *T. asahii* (3S44)..... 77
- Figura 4.** Visão geral da replicata de tomates revestidos com formulação de amido de milho a 2%, provocadas por *A. alternata* após incubação durante 7 dias a 25 °C. **(A)** Tratamento controle. **(B)** Tratamento com *T. globosa* (5S55). **(C)** Tratamento com *T. asahii* (3S44)..... 78
- Figura 5.** Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de **(A)** micélio e **(B)** esporos..... 78

LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Alternaria alternata* EM TOMATES NO PÓS-COLHEITA: MECANISMOS, RESISTÊNCIA A ESTRESSES E FORMULAÇÃO

Autor: ARIANE SILVA BOSQUEIRO

Orientador: Profa. Dra MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

RESUMO

O fungo *Alternaria alternata* causa podridão em diversas culturas no pós-colheita, limitando a comercialização e causando prejuízo a toda cadeia produtiva agrícola. A utilização de agentes de controle biológico apresenta-se como uma alternativa, sendo as leveduras um grupo com características que as tornam adequadas para esse uso. Compreender os mecanismos de ação utilizados pelas leveduras, sua resistência a diferentes estresses e encontrar formulações que garantam sua viabilidade e uma boa atividade de controle do fungo fitopatogênico, são aspectos importantes a serem esclarecidos nesse tipo de abordagem. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar os mecanismos de ação das leveduras *Torulaspora globosa* (linhagem 5S55) e *Trichosporon asahii* (linhagem 3S44) envolvidos na atividade de controle biológico, a resistência dessas leveduras sob diferentes fontes de estresse e sua eficiência em formulações no controle do fungo *Alternaria alternata* em tomate. Para isso, as duas linhagens foram testadas em relação aos mecanismos de ação: produção de enzimas hidrolíticas (quitinase e β -1,3-glucanase), compostos orgânicos voláteis (COVs) em teste *in vivo* e formação de biofilme. O cultivo das linhagens foi realizado sob condições estressantes, incluindo diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C), estresse osmótico (0, 3, 6 e 9% de NaCl), estresse oxidativo (0, 10, 20, 30 e 40 mM de H₂O₂) e resistência ao fungicida Manzate WG[®] a base de mancozebe (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL). Formulações contendo amido de milho e gelatina a 2% foram avaliadas para aderência das leveduras na superfície do fruto e, posteriormente, a formulação com amido foi avaliada em tomates para controle de *A. alternata*. Como resultado, as linhagens apresentaram resultados apenas na produção da enzima β -1,3-glucanase, sendo que *T. asahii* (3S44) também apresentou atividade para a formação de biofilme no teste *in vitro*. *T. asahii* (3S44) se mostrou mais resistente que *T. globosa* (5S55) em todos os testes de estresse, sendo que o estresse oxidativo foi o que mais afetou a viabilidade de ambas as linhagens. Além disso, nenhuma delas conseguiu resistir à concentração mínima de fungicida a base de mancozebe. A formulação que mostrou melhores resultado na fixação das células na superfície do tomate foi a com amido de milho. Quando esta foi utilizada no controle de *A. alternata*, ocorreu uma inibição de 15,7 e 42,5% do fungo com *T. globosa* (5S55) e *T. asahii* (3S44), respectivamente. Diante de tais resultados, é possível afirmar que *T. asahii* (linhagem 3S44) apresentou, de modo geral, melhores resultados em relação a *T. globosa* (linhagem 5S55) e que as ambas possuem potencial para o controle biológico.

Palavras-chave: controle biológico, enzimas hidrolíticas, produção de COVs, biofilme, estresses ambientais, formulação.

YEASTS AS *Alternaria alternata* CONTROL AGENTS ON TOMATOES POST-HARVEST: MECHANISMS, RESISTANCE TO STRESSES AND FORMULATION

Author: ARIANE SILVA BOSQUEIRO

Adviser: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

ABSTRACT

The fungus *Alternaria alternata* causes rot in several post-harvest crops, limiting commercialization and causing damage to the entire agricultural production chain. The use of biological control agents has been an alternative and the yeasts have characteristics that make them suitable for this use. Understanding the mechanisms of action used by these yeasts, their resistance to different stresses and finding formulations that guarantee their viability and a good control activity of phytopathogenic fungus, are important aspects to be clarified in this type of approach. The objectives of the present work were to evaluate the mechanisms of action of the yeasts *Torulospora globosa* (strain 5S55) and *Trichosporon asahii* (strain 3S44) involved in the biological control activity, the resistance of these yeasts under different stress sources and their efficiency in formulations in the control fungus *Alternaria alternata* in tomato. For this, the two strains were tested for the mechanisms of action: production of hydrolytic enzymes (chitinase and β -1,3-glucanase), volatile organic compounds (VOCs) *in vivo* test and biofilm formation. Strains culture was evaluated under stress conditions, including different temperatures (10, 20 and 30 °C), osmotic stress (0, 3, 6 and 9% NaCl), oxidative stress (0, 10, 20, 30 and 40 mM H₂O₂) and resistance to mancozeb-based fungicide Manzate WG[®] (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 and 0,5 mg/mL). Formulations containing corn starch and gelatin at 2% were evaluated for adhesion of the yeasts on the fruit surface and, later, the formulation with starch was evaluated in tomatoes to control *A. alternata*. As a result, the strains presented results only in the production of the enzyme β -1,3-glucanase, and *T. asahii* (3S44), also presented activity for the formation of biofilm in the *in vitro* test. *T. asahii* (3S44) showed to be more resistant than *T. globosa* (5S55) in all tests, being that the condition that most affected the viability of both strains was oxidative stress. In addition, none could withstand the minimum concentration of mancozeb-based fungicide. The formulation that showed the best result in the fixation of the cells on the tomato surface was with corn starch. When this was used in the control of *A. alternata*, it showed 15,7 and 42,5% inhibition with *T. globosa* (5S55) and *T. asahii* (3S44), respectively. In view of such results, it is possible to state that *T. asahii* (strain 3S44) presented, in general, better results in relation to *T. globosa* (strain 5S55) and that both have potential for biological control.

Key words: biological control, hydrolytic enzymes, VOCs production, biofilm, environmental stresses, formulation.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de tomate, com produção de 4,4 milhões de toneladas em 2017, sendo a região sudeste a maior produtora, com aproximadamente 2 milhões de toneladas (IBGE, 2018). Por possuírem a pele frágil, os frutos de tomate podem ser facilmente infectados por fungos (NOSER et al., 2011). Um exemplo é *Alternaria alternata*, fungo que frequentemente causa grandes perdas pós-colheita nessa cultura e produz micotoxinas que são uma ameaça à saúde humana (HEISLER et al., 1980; REDDY et al., 2000).

As perdas no pós-colheita de frutas e vegetais podem representar grande parte da produção total quando o manuseio e as condições de armazenamento não são ótimas, chegando a mais de 25% nos países industrializados e mais de 50% nos países em desenvolvimento (NUNES, 2012). Vários estresses bióticos e abióticos podem contribuir para o desenvolvimento de uma doença pós-colheita, incluindo maturação, colheita e lesões mecânicas (DUKARE et al., 2018).

A aplicação de fungicidas sintéticos tem sido a estratégia tradicional para o manejo dessas doenças, porém questões de segurança ambiental têm tornado seu uso uma grande preocupação (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009; SUI et al., 2015). Além disso, há uma forte demanda dos consumidores para que os alimentos sejam livres de produtos químicos que possam ser potencialmente prejudiciais à saúde (LIU et al., 2013). Portanto, existe uma tendência global para a busca de abordagens alternativas mais seguras e ecologicamente corretas para controlar doenças pós-colheita (DUKARE et al., 2018). Entre essas estratégias, o controle biológico

baseado no uso de micro-organismos tem sido o mais estudado (SPADARO; DROBY, 2016). Leveduras têm se destacado como agentes de controle biológico no pós-colheita. Isso se deve, porque possuem alta tolerância às condições ambientais estressantes antes e após a colheita (DROBY et al., 2016). Além disso, não produzem esporos alergênicos ou micotoxinas e possuem exigências nutricionais simples (SPADARO; DROBY, 2016).

No geral, os micro-organismos agentes de controle biológico possuem uma série de atributos que frequentemente são utilizados em conjunto e podem ser responsáveis pelo o sucesso no controle do desenvolvimento da doença (JAMALIZADEH et al., 2011). Entender esses atributos, ou seja, os mecanismos de ação utilizados pelos agentes de controle biológico é um pré-requisito para o desenvolvimento e registro de produtos (DROBY et al., 2016).

Outro aspecto importante para uso do controle biológico é o desenvolvimento de uma formulação que permita sua aplicação na prática. É a partir dela que é garantido o fornecimento bem sucedido do micro-organismo, com prolongamento do seu prazo de validade e garantia de estabilidade e eficácia em condições comerciais (KINAY; YILDS, 2008). Para ter sucesso, a formulação deve manter a pureza, estabilidade genética, viabilidade celular, capacidade de colonização em superfícies de frutos e os mecanismos de ação do micro-organismo antagonista (DROBY et al., 2009).

Para o desenvolvimento de um produto biológico, além do conhecimento dos diferentes mecanismos de ação utilizados pelo micro-organismo, conhecer sua capacidade de resistência a estresses ambientais também é um atributo essencial, pois variadas condições em pomares e embalagens podem afetar sua viabilidade e eficácia, incluindo variação de temperatura, estresse osmótico e estresse oxidativo (LIU et al., 2013; SUI et al., 2015).

Em trabalho anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, as leveduras *T. asahii* (linhagem 3S44) (Projeto FAPESP n. 2016/02541-7 – dados não publicados) e *T. globosa* (linhagem 5S55) apresentaram bons resultados no controle de *A. alternata* e utilizaram diferentes mecanismos frente ao patógeno, como por exemplo, a produção de compostos orgânicos voláteis que inibiram o fungo em teste *in vitro*. Determinar os padrões de resistência dessas leveduras a diversos fatores que podem prejudicar sua viabilidade e eficiência, bem como seus mecanismos de ação, pode contribuir para maior compreensão do seu potencial como agentes de controle

biológico de *A. alternata*. Além disso, o desenvolvimento de uma formulação, aliada a tais conhecimentos, contribuirá para o estabelecimento de práticas sustentáveis de controle de doenças na agricultura convencional.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar os mecanismos de ação de *Torulaspora globosa* (linhagem 5S55) e *Trichosporon asahii* (linhagem 3S44) envolvidos na atividade de controle biológico, a resistência dessas leveduras sob diferentes fontes de estresse e sua eficiência em formulações no controle do fungo *Alternaria alternata* em tomate pós-colheita.

2. Objetivos específicos

- Avaliar a produção de enzimas hidrolíticas (quitinase e β -1,3-glucanase), compostos orgânicos voláteis (COVs) e formação de biofilme pelas leveduras como mecanismos de ação no controle biológico;
- Avaliar a resistência das leveduras a estresses ambientais (temperatura, estresse osmótico e estresse oxidativo);
- Avaliar a resistência das leveduras a diferentes concentrações do fungicida Manzate WG[®] a base de mancozebe;
- Avaliar a adesão das leveduras na superfície de tomates, utilizando-se formulações com amido de milho e gelatina a 2%;
- Avaliar a formulação com melhor resultado em teste *in vivo* em tomates, no controle do fungo *A. alternata*.

REVISÃO DA LITERATURA

1. O gênero *Alternaria*

Alternaria é um gênero fúngico ubíquo que inclui espécies sapróbicas, endofíticas e patogênicas, encontrando-se associado a uma ampla variedade de substratos, incluindo sementes, plantas, produtos agrícolas, animais, solo e atmosfera (WOUDENBERG et al., 2013). Espécies de *Alternaria* que são patógenas de plantas causam grandes perdas em uma ampla gama de culturas, sendo que várias são importantes patógenos no pós-colheita (THOMMA, 2003, WOUDENBERG et al., 2013). Entre as espécies patógenas estão inclusas: *Alternaria alternata* e *Alternaria solani* (tomate), *Alternaria brassicicola* (repolho), *Alternaria tenuissima* e *Alternaria porri* (cebola), *Alternaria radicina* (cenoura) (LOGRIECO; MORETTI; SOLFRIZZO, 2009). Na infecção por *Alternaria*, os tecidos vegetais enfraquecidos, devido a estresses, senescência ou fermentos, são mais suscetíveis do que os tecidos saudáveis (THOMMA, 2003).

A diversidade morfológica dentro de *Alternaria* é grande e antes da incorporação de técnicas moleculares, a classificação de suas espécies era baseada em características morfológicas sob condições de cultivo padronizadas, principalmente quanto aos aspectos de colônias e conídios e padrões de ramificação das cadeias conidiais (PATRIARCA, 2016).

Os conidióforos da maioria das espécies de *Alternaria* produzem esporos assexuados (conídios) medindo entre 160 e 200 µm de comprimento, pigmentados e multicelulares, produzidos em correntes ou em formas de ramificação, caracterizados por serem mais largos perto da base e afunilados gradualmente até

um bico alongado (MAMGAIN; ROYCHOWDHURY; TAH, 2013). As principais formas de transporte desses patógenos são sementes infectadas com esporos ou micélio em seu revestimento. A disseminação dos esporos pode ocorrer pelo vento, água, ferramentas e animais (MAMGAIN; ROYCHOWDHURY; TAH, 2013).

Durante os vários estágios da patogênese, alguns desses fungos podem produzir diferentes micotoxinas tóxicas para os seres humanos e animais que as consomem (BARKAI-GOLAN; PASTER, 2008). *Alternaria* spp. pode produzir uma ampla variedade de metabólitos pertencentes a três grupos estruturais diferentes: (i) os derivados de dibenzopirona, sendo elas alternariol (AOH), alternariol monometil-éter (AME) e altenueno (ALT); (ii) as altertoxinas derivadas de perileno (ATX-I e II) e (iii) o derivado do ácido tetrâmico, ácido tenuazônico (AT) (POSE et al., 2010). Nesse sentido, é importante uma identificação correta das espécies e o estabelecimento do risco toxicológico relacionado à contaminação de produtos agrícolas por *Alternaria* (LOGRIECO; MORETTI; SOLFRIZZO, 2009).

2. *Alternaria alternata* em tomates

A espécie *Alternaria alternata* é a mais comum registrada em culturas agrícolas (BARKAI-GOLAN; PASTER, 2008). É relatada como causadora de doenças pós-colheita em diversas culturas, incluindo manga (PRUSKY et al., 2006), maçã (SARAVANAKUMAR et al., 2008), caqui (KOBILER et al., 2011), pêssego (THOMIDIS; MICHAILEDIS; KARAYIANNIS, 2007), berinjela e pimentão (FALLIK et al., 1994), tomate (REDDY et al., 2000), entre outras.

Esse fungo entra no fruto através de feridas ou aberturas naturais, onde permanece quiescente até que o mesmo amadureça (TRONCOSO-ROJAS; TIZNADO-HERNÁNDEZ, 2014). Devido a essa característica, uma infecção pós-colheita pode ocorrer antes, durante ou após a colheita, incluindo o momento de manuseio, transporte, armazenamento e condições de comercialização, ou após a compra pelo consumidor (COATES; JOHNSON, 1997; TRONCOSO-ROJAS; TIZNADO-HERNÁNDEZ, 2014). Nesse sentido, é de grande importância evitar que o fruto seja ferido em qualquer momento durante ou após seu cultivo.

Das culturas atacadas por *A. alternata*, o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) destaca-se como uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo, produzida em pelo menos 144 países (DOAN et al., 2016). O Brasil também tem se destacado em sua produção, segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of

the United Nations), em 2016 teve uma produção de aproximadamente 4,2 milhões de toneladas, ficando em nono lugar no ranking mundial.

Outro problema preocupante de *A. alternata* além da podridão em frutas e vegetais é a produção de micotoxinas. Elas vêm sendo frequentemente relatadas em tomates e seus produtos derivados (TERMINIELLO et al., 2006; OSTRY, 2008; NOSER et al., 2011; ZHAO et al., 2015). Os principais tipos produzidos por *A. alternata* são AT (ácido tenuazônico), AOH (alternariol), AME (alternariol monometil-éter) e ATX-I (altertoxinas) (BARKAI-GOLAN; PASTER, 2008; POSE et al., 2010).

Diversos fungicidas são utilizados antes e depois da colheita como tratamento para prevenir o desenvolvimento de *A. alternata* (TRONCOSO-ROJAS; TIZNADO-HERNÁNDEZ, 2014). Essa costuma ser a forma mais comum de controle, porém, atualmente tem sido dada atenção para outros métodos mais econômicos, seguros e menos prejudiciais a natureza (MAMGAIN; ROYCHOWDHURY; TAH, 2013).

3. Controle biológico

Atualmente, estratégias naturais são preferidas para o controle de fungos em frutas ou vegetais, uma vez que o uso indiscriminado de fungicidas sintéticos leva ao desenvolvimento de cepas resistentes de patógenos, requerendo doses mais elevadas desses produtos, com o conseqüente aumento de resíduos tóxicos nos alimentos (PATRIARCA, 2016).

Os resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais frescos são uma das principais preocupações das agências reguladoras e dos consumidores (LIU et al., 2013). Um estudo realizado em 2007 analisou o resíduo de agrotóxicos em 724 amostras de 46 frutas e vegetais, de oito países da América do Sul. Foi verificado que em 8,4% delas haviam resíduos acima do limite máximo permitido, sendo que dos 83 diferentes agrotóxicos detectados, o fungicida tiabendazol foi encontrado com maior frequência (29%) (HJORTH et al., 2011). Outro estudo, realizado no Brasil entre os anos de 2001 a 2010, com 13556 amostras de 22 culturas, mostrou que em 48,3% delas foram encontrados resíduos de agrotóxicos, sendo que 2,7% possuíam limites acima do permitido. Além disso, quase metade das amostras analisadas apresentaram múltiplos resíduos (até dez), incluindo frutos de tomate (JARDIM; CALDAS, 2012). Sendo assim, a redução ou eliminação do uso pré e pós-colheita de fungicidas sintéticos, através do desenvolvimento de estratégias de

gerenciamento alternativas, continua sendo uma alta prioridade de pesquisa (LIU et al., 2013).

O controle biológico com a utilização de micro-organismos benéficos surgiu como alternativa aos métodos convencionais de controle de perdas em pós-colheita (MONTESINOS et al., 2015). O gerenciamento de doenças pós-colheita empregando agentes microbianos demonstrou ser a estratégia mais adequada para substituir os produtos químicos que estão sendo proibidos ou recomendados para uso limitado (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009). A utilização de micro-organismos antagonistas como leveduras, fungos e bactérias é bastante promissora e vêm ganhando popularidade, pois possui um baixo impacto ambiental, quer isoladamente, ou como parte de uma gestão de proteção integrada para reduzir a aplicação de fungicidas sintéticos (WISNIEWSKI; WILSON, 1992; DROBY et al., 2009; PARAFATI et al., 2015).

Um dos primeiros trabalhos reportados com o uso de micro-organismos antagonistas utilizou isolados de *Trichoderma* para controle de podridão em morango, causada por *Botrytis cinerea* e *Mucor mucedo* (TRONSMO; DENIS, 1977). Atualmente esse tipo de pesquisa vem aumentando e muitos trabalhos têm sido realizados para controle de fitopatógenos utilizando bactérias (MA et al., 2015; WALLACE; HIRKALA; NELSON, 2017), leveduras (HU et al., 2015; LI et al., 2017) e fungos (VALENZUELA et al., 2015; YOU et al., 2016) como agentes de controle biológico.

As diversas pesquisas feitas para controle biológico têm estimulado atividades comerciais para trazer produtos ao mercado. Linhagens de micro-organismos antagonistas são, ou foram no passado (alguns não são mais fabricados), os ingredientes ativos de produtos biofungicidas comerciais registrados para controle pós-colheita em vários países, incluindo, *Cryptococcus albidus* (Yieldplus), *Bacillus subtilis* B426 (Avogreen), *Bacillus subtilis* QST713 (Serenade), *Metschnikowia fructicola* 277 (Shemer), *Pseudomonas syringae* ESC10 (Biosave), *Candida oleophila* I-182 (Aspire), *Candida oleophila* O (Nexy) e *Aureobasidium pullulans* DSM14941 (BoniProtect) (MONTESINOS et al., 2015).

Para o desenvolvimento de um produto comercial bem-sucedido no pós-colheita é necessário: a) aprimorar a eficácia do controle sob condições comerciais; b) desenvolver métodos econômicos de formulação; c) manter a viabilidade celular e eficácia do controle no produto; d) identificar antagonistas que exibam atividade

contra vários patógenos diferentes; e) compreender como o meio ambiente afeta as interações entre o hospedeiro, o patógeno e o agente de biocontrole (LIU et al., 2013). Essas etapas ilustram o longo caminho necessário para se chegar a uma formulação comercial de um micro-organismo antagonista.

4. Leveduras no controle biológico em pós-colheita

Entre os micro-organismos usados como agente de controle biológico contra fitopatógenos pós-colheita, um número relativamente alto de leveduras tem sido relatado, isto se deve à sua característica de tolerar condições ambientais extremas, que as tornam efetivas em produtos agrícolas frescos (SPADARO; DROBY, 2016).

Leveduras que estão naturalmente presentes em superfícies de frutos representam a maioria das utilizadas para manejar doenças pós-colheita. No entanto, os antagonistas também têm sido isolados de outras fontes, como filosfera, raízes, solo e água do mar (LIU et al., 2013). *Debaryomyces hansenii* e *Aureobasidium pullulans*, ambas isoladas da superfície de limão, tiveram efetiva atividade antagonista contra podridão de *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* em citros (WILSON; CHALUTZ, 1989). *Rhodosporidium paludigenum*, isolada do mar da China, apresentou atividade potencial de biocontrole contra *Alternaria alternata* em tomate cereja (WANG et al., 2008). *Kloeckera apiculata* (linhagem 34-9), isolada de raízes cítricas, foi relatada como efetiva no controle de *Penicillium italicum* e *Botrytis cinerea* em citros e em uvas, respectivamente (LONG; WU; DENG, 2005). *Rhodotorula glutinis* (linhagem Y-44), isolada de folhas de tomate, foi relatada no controle do fungo *B. cinerea* em folhas e frutos de tomate (KALOGIANNIS et al., 2006).

Uma vantagem de se usar leveduras para controle biológico é que elas são tolerantes a condições ambientais extremas que prevalecem antes e depois da colheita, como por exemplo, ampla faixa de umidade relativa, flutuações de pH, baixas e altas temperaturas, dessecação, baixos níveis de oxigênio, radiação UV, além de serem tolerantes ao microambiente de frutas (alta concentração de açúcar, alta pressão osmótica e baixo pH) (SPADARO; DROBY, 2016). Além disso, não produzem esporos alergênicos ou micotoxinas (DRUVEFORS et al., 2002) e possuem uma forte capacidade de competir com outros micro-organismos para a colonização de nichos (MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

No controle de doenças pós-colheita, leveduras podem usar diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, competição por nutrientes (ZHANG et al., 2011), indução de resistência nos hospedeiros (DROBY et al., 2002), secreção de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular do fungo (BAR-SHIMON et al., 2004), formação de biofilme (GIOBBE et al., 2007) e produção de compostos voláteis (HUANG et al., 2011). A competição por nutrientes (por exemplo, carboidratos, nitrogênio, oxigênio) e espaço tem sido considerada o principal modo de ação de leveduras antagonistas contra patógenos fúngicos pós-colheita (SPADARO; DROBY, 2016).

5. Produção de enzimas hidrolíticas

A parede celular atua como uma barreira inicial que está em contato com ambientes hostis encontrados pelo fungo e, quando removida ou enfraquecida, pode causar a morte desse micro-organismo (LATGÉ, 2007). Essa função protetora da parede é devido à composição de sua estrutura que contém polissacarídeos, como quitina e glucano, em associação com proteínas, que fornecem integridade e resistência mecânica aos fungos (DUKARE et al., 2018). A quitina se apresenta disposta em camadas ordenadas regularmente e o β -1,3-glucano, principal tipo de glucano encontrado na parede como material de preenchimento, é disposto de maneira amorfa (SPADARO; DROBY, 2016).

A rigidez da parede celular protege as hifas fúngicas e é considerada a principal barreira contra a lise microbiana (MASIH; PAUL, 2002). Por esse motivo, a parede celular tem sido considerada um alvo para agentes antifúngicos, devido a sua importância para a sobrevivência do fungo (BOWMAN; FREE, 2006). Para que sua decomposição ocorra são necessárias diferentes enzimas, especialmente β -1,3-glucanase e quitinase, mas também proteases, que estão direta ou indiretamente envolvidas no mecanismo de leveduras no controle de patógenos pós-colheita (SPADARO; DROBY, 2016).

A quitina é um biopolímero sintetizado por vários organismos vivos, sendo considerado o mais abundante depois da celulose (RINAUDO, 2006). Além da composição em paredes fúngicas, pode ser encontrado em insetos, invertebrados marinhos e algas, o que faz dela um recurso renovável (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). É um homopolímero linear, insolúvel, composto de subunidades do açúcar N-acetilglucosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo

β -1,4 (SPADARO; DROBY, 2016), sendo tipicamente menos abundante do que as porções de glicoproteína ou glucano da parede celular (BOWMAN; FREE, 2006). Sua hidrólise ocorre por meio das enzimas quitinases que quebram a ligação glicosídica β -1,4 de N-acetilglucosamina presente na sua estrutura, produzindo mono e oligômeros (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015).

A parede celular fúngica também possui glucano em sua composição, sendo seu principal polissacarídeo estrutural, constituindo aproximadamente 50-60% de seu peso seco (SPADARO; DROBY, 2016; BOWMAN; FREE, 2006). O glucano é composto de resíduos repetidos de glicose que são conectados em cadeias através de uma variedade de ligações químicas (BOWMAN; FREE, 2006). Dentro desse grupo, o β -1,3-glucano é o principal constituinte estrutural, onde outros componentes da parede celular são covalentemente ligados, fornecendo à parede celular integridade mecânica e força (SPADARO; DROBY, 2016).

As glucanases podem hidrolisar os glucanos por dois mecanismos possíveis: (1) exo- β -1,3-glucanase que hidrolisa os β -glucanos clivando sequencialmente os resíduos de glicose da extremidade não redutora, e (2) endo- β -1,3-glucanase que cliva as ligações β em locais aleatórios ao longo da cadeia polissacarídica, liberando oligossacarídeos menores e glicose (SPADARO; DROBY, 2016).

Há diversos trabalhos que relatam a produção das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase por antagonistas microbianos como, por exemplo, o realizado por Lopes et al. (2015), que avaliou seis isolados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para controle de *Colletotrichum acutatum* em citros pré-colheita, e concluiu que a produção dessas enzimas pelas leveduras pode ser um dos mecanismos utilizados no controle do fungo. Zhang et al. (2011) também constataram que a produção de tais enzimas é um dos possíveis mecanismos de ação utilizado pela levedura *Pichia guilliermondii* para controle de *Botrytis cinerea* em maçãs.

6. Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs)

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) possuem baixo peso molecular e podem vaporizar e entrar na fase gasosa em temperaturas e pressões atmosféricas normais (HUNG; LEE; BENNETT, 2015). Além das plantas, micro-organismos também podem produzi-los como parte de seu metabolismo (MARI; BAUTISTA-BAÑOS; SIVAKUMAR, 2016). Entre esses micro-organismos se encontram os fungos, que são capazes de produzir COVs antifúngicos com potencial de serem

usados como biofumigantes e agentes de biocontrole de doenças pós-colheita (SPADARO; DROBY, 2016).

COVs produzidos por micro-organismos com ação antimicrobiana têm sido introduzidos como uma boa alternativa de controle biológico, por não terem contato com o alimento, tendo como consequência menos manipulação das mercadorias (NUNES, 2012). Há diversos trabalhos na literatura que relatam a produção desses compostos por leveduras no controle de fungos fitopatógenos em culturas pós-colheita. Um exemplo, é o trabalho realizado por Huang et al. (2011), em que morangos apresentaram diminuição da incidência e severidade de podridão causada por *Botrytis cinerea*, pela exposição aos compostos voláteis produzidos pela levedura *Candida intermedia*. O trabalho realizado por Arrarte et al. (2017) também apresentou bons resultados com os COVs produzidos pela levedura *Candida sake* no controle de *Penicillium expansum* em maçãs.

Nos fungos, o número e a quantidade de COVs produzidos por uma espécie variam. Esta mistura de fase gasosa pode conter ácidos, álcoois, aldeídos, aromáticos, ésteres, heterociclos, cetonas, terpenos, tióis, etc., variando com a temperatura, substrato e condições ambientais (HUNG; LEE; BENNETT, 2015). No trabalho de Fialho et al. (2010), o efeito inibitório da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, causador da mancha preta em citros, foi devido a produção de uma mistura com diferentes COVs, sendo eles, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, álcool fenilético, pertencentes ao grupo dos álcoois e octanoato de etila e acetato de etila, pertencentes ao grupo dos ésteres. Já Bruce et al. (2003), mostraram em seu trabalho a importância do substrato na produção de COVs. As leveduras *Williopsis mrakii* (Y500), *Saccharomyces cerevisiae* (Y1001) e *Debaryomyces* sp. (Y1036) apresentaram melhor inibição dos fungos *Ophiostoma piliferum*, *Sclerophoma pithyophila*, *Ophiostoma piceae*, *Aureobasidium pullulans* e *Botrydiplodium theobromae* que atacam madeira, quando foram cultivadas em meio ágar tripton de soja 3%, comparado com meio malte 2% ou meio ágar pobre em nutriente com a relação carbono:nitrogênio semelhante à madeira.

Os micro-organismos que produzem COVs têm potencial para serem usados diretamente na biofumigação ou para o uso de seus ativos de forma independente, representando uma abordagem alternativa para o controle de doenças pós-colheita, especialmente em mercadorias que serão armazenadas em contêineres fechados

(ARRARTE et al., 2017). A integração de uma ou mais estratégias diferentes para atingir níveis maiores no controle de doenças e a inclusão de compostos orgânicos voláteis derivados de micro-organismos podem contribuir para o sucesso do tratamento de doenças pós-colheita (MARI; BAUTISTA-BAÑOS; SIVAKUMAR, 2016).

7. Produção de biofilme

Biofilmes podem ser definidos como comunidades de micro-organismos que estão ligados a uma superfície e encapsulados em uma matriz polimérica (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; PETROVA; SAUER, 2016). Os micro-organismos tendem a formar tais matrizes quando estão aderidos em superfícies (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992). A formação de biofilme permite que eles sobrevivam em ambientes hostis, com fisiologia e comportamento significativamente diferentes de suas formas planctônicas (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Além de ser responsável pela adesão, a matriz é um material extracelular que também é responsável pela coesão no biofilme, consistindo na conglomeração de diferentes tipos de biopolímeros conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (SPE). As SPE imobilizam as células do biofilme e as mantêm em estreita proximidade, permitindo assim interações intensas, incluindo a comunicação célula-célula e a formação de micro consórcios sinérgicos (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

No caso das leveduras, a adesão é conferida por proteínas especializadas na superfície celular, chamadas "adesinas" ou "floculinas", que se ligam a aminoácidos específicos ou resíduos de açúcar na superfície de outras células ou promovem a ligação a superfícies abióticas (VERSTREPEN; KLIS, 2006). A atividade de controle de fungos pós-colheita por leveduras pode apresentar melhor resultado quando as mesmas se encontram na forma de biofilme (CHI et al., 2015).

8. Resistência a estresses ambientais

A capacidade de leveduras para o controle de patógenos fúngicos está grandemente relacionada à sua viabilidade (CHEN et al., 2015). Porém, quando são utilizadas para manejar doenças pós-colheita encontram uma variedade de condições estressantes, incluindo temperaturas extremas, baixa umidade, estresse

oxidativo, falta de nutrientes e pH adverso, que podem afetar sua eficácia (LIU et al., 2013). A baixa tolerância a condições ambientais flutuantes reflete em dificuldades para o desenvolvimento de um produto formulado estável (PALAZZINI et al., 2009). Dessa forma, resistir a esses estresses ambientais é de grande importância para que uma levedura antagonista possa ter sucesso em sua atividade de controle biológico.

O estresse pelo frio é uma adversidade comum, à qual leveduras usadas para gerenciar doenças pós-colheita são expostas (HU et al., 2015). Tais condições são frequentemente enfrentadas quando legumes e frutas são armazenados em câmaras frigoríficas, com o objetivo de prolongar a sua vida comercial (SUI et al., 2015).

As hortaliças, por exemplo, apresentam uma menor vida útil quando estão sob temperaturas mais elevadas, uma vez que ocorre um aumento na velocidade de suas reações bioquímicas e o aceleração na reprodução e desenvolvimento de micro-organismos, gerando uma deterioração maior do que quando estão sob armazenamento refrigerado, o que ressalta a necessidade dessa prática (LUENGO et al., 2007). No caso do tomate, as temperaturas ideais para seu armazenamento estão em torno de 13 °C para frutos verdes, 10 °C os parcialmente maduros e 8 °C para os maduros (BRACKMANN et al., 2007).

A capacidade de colonizar e se desenvolver em um hospedeiro sob baixas temperaturas é uma característica importante em leveduras que serão utilizadas para controle biológico em pós-colheita. Testes são necessários para avaliar sua tolerância a tais condições. Um exemplo de trabalho nesse sentido é o realizado por Spadaro et al. (2013). Os autores avaliaram a eficácia de três leveduras antagonistas contra *Penicillium expansum* em maçãs armazenadas a baixas temperaturas (1 ± 1 °C) e observaram que mesmo sob tal condição de estresse, elas conseguiram manter sua atividade de controle, reduzindo significativamente o diâmetro da lesão do fungo, sendo que uma das linhagens apresentou desempenho similar à ação dos fungicidas imazalil e pirimetanil. Além desse, é possível encontrar outros trabalhos que realizaram testes similares (ROBIGLIO et al., 2011; LUTZ et al., 2013).

Outro tipo de estresse que micro-organismos antagonistas podem estar sujeitos quando aplicados no pós-colheita é o estresse osmótico, caracterizado pela baixa atividade de água (*aw*). O nível de estresse hídrico encontrado por micro-organismos em ambientes naturais é um parâmetro físico importante que influencia

em sua capacidade de crescimento e de competir com sucesso por um determinado habitat (PALAZZINI et al., 2009). Assim, o uso de antagonistas microbianos com maior tolerância ao estresse osmótico é importante para manter a viabilidade necessária para a atividade de controle (IPPOLITO et al., 2005). Testes para avaliar a resistência de leveduras a situações de estresse osmótico vêm sendo realizados em diversos trabalhos de controle biológico pós-colheita (ABADIAS et al., 2000; FREDLUND et al., 2002; WANG et al., 2010).

Um terceiro tipo de estresse a que leveduras antagonistas estão sujeitas é o oxidativo, que constitui um dos maiores desafios para a atividade destas no controle de doenças pré e pós-colheita (ZHANG et al., 2017). Ele está intimamente associado a um aumento no nível de EROs (espécies reativas de oxigênio), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que têm efeitos negativos sobre as células e tecidos (CASTORIA et al., 2003; CHEN et al., 2015).

Normalmente, os níveis de EROS no interior da célula são mantidos baixos por mecanismos de proteção que usam isoenzimas compartimentadas de catalase, superóxido dismutase ou peroxidase. Em alguns casos, especialmente sob condições de estresse, essa ação protetora é anulada pela explosão oxidativa, caracterizada pela produção rápida e transitória de altos níveis de EROs (BOLWELL; WOJTASZEK, 1997). Um exemplo é a produção desses compostos em plantas como resposta inicial a micro-organismos patogênicos e não patogênicos (MACARISIN et al., 2010; SPADARO; DROBY, 2016). Assim, além dos patógenos, as leveduras antagônicas também podem agir como um indutor de EROs no tecido do hospedeiro (ZHANG et al., 2017). Além do ataque por micro-organismos, feridas no tecido vegetal também estão associadas com aumento da atividade de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (CASTORIA et al., 2003).

Diversos trabalhos têm sido realizados para verificar a influência do estresse oxidativo na atividade de biocontrole de leveduras com potencial de atuação no controle de doenças pós-colheita (LIU et al., 2012; CHEN et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Castoria et al. (2003) investigaram a relação entre a eficiência de leveduras antagônicas como agentes de controle biológico pós-colheita e a resistência ao estresse oxidativo e sugeriram que a capacidade de uma levedura tolerar os altos níveis de EROs, produzidas em macieiras em resposta a ferimentos, pode ser uma característica essencial de um agente de controle biológico eficaz.

9. Resistência a fungicidas

Nem sempre leveduras antagonistas serão utilizadas de forma exclusiva no controle do fungo, tendo muitas vezes que interagir com fungicidas que também poderão ser aplicados de forma complementar no controle de podridões. Assim, o uso comercial bem-sucedido de agentes de biocontrole depende de sua compatibilidade com práticas de pós-colheita, sendo o uso de fungicidas uma delas (QIN; TIAN, 2004). Para essa situação é importante que os antagonistas apresentem resistência aos fungicidas utilizados para que consigam manter sua viabilidade e atividade de controle.

Trabalhos têm relatado a resistência de leveduras agentes de controle biológico a fungicidas, como, por exemplo, o realizado por Perez et al. (2017). Os autores relataram que as linhagens de leveduras *Clavispora lusitaniae* (linhagem 146) e *Pichia fermentans* (linhagem 27) apresentaram resistência aos fungicidas imazalil e tiabendazol. Como conclusão, sugeriram que estas podem ser utilizadas em combinação com os fungicidas no controle de *Penicillium digitatum* em limão, o que possibilitaria uma redução nas doses dos mesmos e nos impactos no ambiente e na saúde humana.

Micro-organismos sozinhos nem sempre fornecem um controle comercialmente aceitável de podridões em frutas, porém sua atividade pode ser aumentada pela integração do controle biológico com outros métodos, como o uso de baixas doses de fungicidas (QIN; TIAN, 2004). Um argumento para o uso em conjunto de fungicidas em baixas concentrações (isto é, 10% da taxa rotulada ou menos) e micro-organismos antagonistas, é que o controle da doença, semelhante àquele obtido pela ação do fungicida sozinho, pode ser obtido com uma redução significativa no uso do mesmo, gerando menores níveis de resíduos e menor impacto sobre o meio ambiente (BUCK, 2004). Alguns trabalhos mostraram bons resultados no uso de leveduras antagonistas combinadas com fungicidas, na maioria das vezes com controle da podridão superior ao uso destes dois métodos isoladamente (CHAND-GOYAL; SPOTTS, 1996; BUCK, 2004).

10. Formulações para micro-organismos agentes de controle biológico

Em geral, a implementação no mercado de produtos de controle biológico pós-colheita tem sido limitada devido a vários fatores, entre eles, o desempenho inconsistente destes sob condições comerciais (DROBY et al., 2016). O sucesso de

um produto para controle biológico é obtido quando este funciona efetivamente em tais condições, apresentando controle consistente da doença alvo (DROBY et al., 2009).

As formulações podem influenciar a sobrevivência e atividade de agentes de controle biológico em superfícies de frutas e em feridas (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). Geralmente, um produto formulado consiste em um micro-organismo antagonico (o ingrediente ativo), um material inerte que serve como veículo e adjuvantes, como nutrientes e/ou compostos que aumentam a sobrevivência das células antagonistas ou ajudam a protegê-las de estresses encontrados no meio ambiente (baixas e altas temperaturas, dessecação, estresse osmótico, radiação UV) (DROBY et al., 2016).

Diversas estratégias têm sido empregadas para melhorar o comportamento dos agentes de controle biológico em condições práticas. Uma das alternativas é a incorporação de agentes ativos, como por exemplo, micro-organismos antagonistas em revestimentos comestíveis (FLORES-LÓPEZ et al., 2016). Os revestimentos comestíveis podem ser definidos como uma fina camada de material que cobre a superfície do alimento e pode ser consumido como parte do produto (VARGAS et al., 2008). Esses revestimentos podem atuar como protetores durante as fases de preparação, conservação e aplicação de produtos à base de micro-organismos, mantendo a viabilidade destes e promovendo sua eficácia no controle biológico (MARÍN et al., 2016).

A maioria dos revestimentos comestíveis tem como componentes polissacarídeos e proteínas (VARGAS et al., 2008; FLORES-LÓPEZ et al., 2016). Os principais polissacarídeos que podem ser incluídos nas formulações de revestimentos comestíveis são amidos e seus derivados, derivados de celulose, alginato, carragenina, quitosana, pectina e várias gomas (VARGAS et al., 2008). No caso das proteínas, podem ser utilizadas aquelas de origem animal, como a caseína, proteína do soro de leite, colágeno, gelatina e queratina, e as de origem vegetal, como a proteína de soja, o glúten de trigo, a proteína de amendoim, a zeína de milho e a proteína da semente de algodão (DHALL, 2013; FLORES-LÓPEZ et al., 2016).

O aumento da eficácia de agentes de controle biológico aplicados em combinação com revestimentos comestíveis foi relatado em trabalhos que utilizaram leveduras (EL-GHAOUTH et al., 2000; MARÍN et al., 2016; KHARCHOUFI et al.,

2018). Assim, uma formulação constituída pela combinação de micro-organismos com atividade antagonista e revestimentos comestíveis pode ser uma boa estratégia para a preservação das culturas, uma vez que contribui para a atividade do micro-organismo, permitindo sua sobrevivência e fixação na superfície do fruto ou vegetal (MARÍN et al., 2016).

LITERATURA CITADA

ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I.; MAGAN, N. Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 1009-1017, 2000.

ARRARTE, E.; GARMENDIA, G.; ROSSINI, C.; WISNIEWSKI, M.; VERO, S. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. **Biological Control**, v. 109, p. 14-20, 2017.

BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 147-159, 2008.

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.

BOLWELL, G. P.; WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 51, n. 6, p. 347-366, 1997.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRACKMANN, A.; STEFFENS, C. A.; ANDRIOLO, J. L.; PINTO, J. A. V. Armazenamento de tomate cultivar “Cronus” em função do estágio de maturação e da temperatura. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1295-1300, 2007.

BRUCE, A.; STEWART, D.; VERRALL, S.; WHEATLEY, R. E. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 101-108, 2003.

BUCK, J. W. Combinations of fungicides with phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 196-202, 2004.

CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; DE CURTIS, F.; DE CICCIO, V. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. **Phytopathology**, v. 93, n. 5, p. 564-572, 2003.

CHAND-GOYAL, T.; SPOTTS, R. A. Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. **Biological Control**, v. 6, n. 2, p. 253-259, 1996.

CHEN, J.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. Mechanism of H₂O₂-induced oxidative stress regulating viability and biocontrol ability of *Rhodotorula glutinis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 152-158, 2015.

CHI, M.; LI, G.; LIU, Y.; LIU, G.; LI, M.; ZHANG, X.; SUN, Z.; SUI, Y.; LIU, J. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113-119, 2015.

COATES, L.; JOHNSON, G. Postharvest diseases of fruit and vegetables. In: BROWN, J. F.; OGLE, H. J. (Ed.). **Plant Pathogens and Plant Diseases**. Armidale: Rockvale Publications, 1997. Cap. 33. p. 533-547.

DHALL, R. K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 435-450, 2013.

DOAN, H. K.; PEREZ, K.; DAVIS, R. M.; SLAUGHTER, D. C. Survey of molds in California processing tomatoes. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 11, p. M2785-M2792, 2016.

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.

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

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; TEIXIDÓ, N.; SPADARO, D.; JIJAKLI, M. H. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 22-29, 2016.

DRUVEFORS, U.; JONSSON, N.; BOYSEN, M. E.; SCHNURER, J. Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under

different oxygen and carbon dioxide regimens. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 389-394, 2002.

DUKARE, A. S.; PAUL, S.; NAMBI, V. E.; GUPTA, R. K.; SINGH, R.; SHARMA, K.; VISHWAKARMA, R. K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-16, 2018.

EL-GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; BROWN, G. E.; IPPOLITO, A.; WISNIEWSKI, M.; WILSON, C. L. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. **Plant Disease**, v. 84, n. 3, p. 243-248, 2000.

FALLIK, E.; AHARONI, Y.; GRINBERG, S.; COPEL, A.; KLEIN, J. D. Postharvest hydrogen peroxide treatment inhibits decay in eggplant and sweet red pepper. **Crop Protection**, v. 13, n. 6, p. 451-454, 1994.

FAO. Faostat – Statistic Database. Disponível em:
<<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 30 de junho de 2018.

FIALHO, M. B.; TOFFANO, L.; PEDROSO, M. P.; AUGUSTO, F.; PASCHOLATI, S. F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 925-932, 2010.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FLORES-LÓPEZ, M. L.; CERQUEIRA, M. A.; DE RODRÍGUEZ, D. J.; VICENTE, A. A. Perspectives on utilization of edible coatings and nano-laminate coatings for extension of postharvest storage of fruits and vegetables. **Food Engineering Reviews**, v. 8, n. 3, p. 292-305, 2016.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M. E.; LINGSTEN, K. J.; SCHNÜRER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 395-402, 2002.

GIOBBE, S.; MARCEDDU, S.; SCHERM, B.; ZARA, G.; MAZZARELLO, V. L.; BUDRONI, M.; MIGHELI, Q. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 8, p. 1389-1398, 2007.

HEISLER, E. G.; SICILIANO, J.; STINSON, E. E.; OSMAN, S. F.; BILLS, D. D. High-performance liquid chromatographic determination of major mycotoxins produced by *Alternaria* molds. **Journal of Chromatography A**, v. 194, n. 1, p. 89-94, 1980.

HJORTH, K.; JOHANSEN, K.; HOLEN, B.; ANDERSSON, A.; CHRISTENSEN, H.B.; SIIVINEN, K.; TOOME, M. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America – A Nordic project. **Food Control**, v. 22, n. 11, p. 1701-1706, 2011.

HU, H.; YAN, F.; WILSON, C.; SHEN, Q.; ZHENG, X. The ability of a cold-adapted *Rhodotorula mucilaginosa* strain from Tibet to control blue mold in pear fruit. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 6, p. 1391-1404, 2015.

HUANG, R.; LI, G. K.; ZHANG, J.; YANG, L.; CHE, H. J.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 859-869, 2011.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3395-3405, 2015.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>>. Acesso em: 30 de junho de 2018.

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; PENTIMONE, I.; NIGRO, F. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre-and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, n. 3, p. 245-252, 2005.

JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H. R.; AMINIAN, H.; ALIZADEH, A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **EPPO Bulletin**, v. 41, n. 1, p. 65-71, 2011.

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

JARDIM, A. N. O; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

KALOGIANNIS, S.; TJAMOS, S. E.; STERGIU, A.; ANTONIOU, P. P.; ZIOGAS, B. N.; TJAMOS, E. C. Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, n. 1, p. 69-76, 2006.

KHARCHOUFI, S.; PARAFATI, L.; LICCIARDELLO, F.; MURATORE, G.; HAMD, M.; CIRVILLERI, G.; RESTUCCIA, C.. Edible coatings incorporating pomegranate peel extract and biocontrol yeast to reduce *Penicillium digitatum* postharvest decay of oranges. **Food Microbiology**, v. 74, p. 107-112, 2018.

KINAY, P.; YILDIZ, M. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. **Biological Control**, v. 45, n. 3, p. 433-440, 2008.

KOBILER, I.; AKERMAN, M.; HUBERMAN, L.; PRUSKY, D. Integration of pre-and postharvest treatments for the control of black spot caused by *Alternaria alternata* in stored persimmon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, n. 2, p. 166-171, 2011.

LATGÉ, J. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007.

LI, Q.; LI, C.; LI, P.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; ZHENG, X.; YANG, Q.; APALIYA, M. T.; BOATENG, N. A. S.; SUN, Y. The biocontrol effect of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 against postharvest diseases in table grapes caused by *Aspergillus niger* and the possible mechanisms involved. **Biological Control**, v. 113, p. 18-25, 2017.

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

LIU, J.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; NORELLI, J.; HERSHKOVITZ, V.; TIAN, S.; FARRELL, R. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 578-590, 2012.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; SOLFRIZZO, M. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 2, p. 129-140, 2009.

LONG, C.; WU, Z.; DENG, B. Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 1-2, p. 197-201, 2005.

LOPES, M. R.; KLEIN, M. N.; FERRAZ, L. P.; DA SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. **Microbiological Research**, v. 175, p. 93-99, 2015.

LUENGO, R. F. A.; HENZ, G. P.; MORETTI, C. L.; CALBO, A. G. Pós-colheita de hortaliças – Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007. 100p.

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.

MA, X.; WANG, X.; CHENG, J.; NIE, X.; YU, X.; ZHAO, Y.; WANG, W. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Biological Control**, v. 90, p. 34-41, 2015.

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.

MAMGAIN, A.; ROYCHOWDHURY, R.; TAH, J. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. **Research Journal of Biology**, v. 1, p. 1-9, 2013.

MARI, M.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; SIVAKUMAR, D. Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 70-81, 2016.

MARÍN, A.; CHÁFER, M.; ATARÉS, M.; CHIRALT, A.; TORRES, R.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N. Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. **Biological Control**, v. 96, p. 108-119, 2016.

MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of β -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.

MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEN, G. Biofilm formation in the industry: a review. **Food Reviews International**, v. 8, n. 4, p. 573-603, 1992.

MONTESINOS, E.; FRANCÉS, J.; BADOSA, E.; BONATERRA, A. Post harvest control. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). **Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture**. Springer, 2015. p. 193-202.

MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 588-611, 2015.

NOSER, J.; SCHNEIDER, P.; ROTHER, M.; SCHMUTZ, H. Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. **Mycotoxin Research**, v. 27, n. 4, p. 265-271, 2011.

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

OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-188, 2008.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

PALAZZINI, J. M.; RAMIREZ, M. L.; ALBERIONE, E. J.; TORRES, A. M.; CHULZE, S. N. Osmotic stress adaptation, compatible solutes accumulation and biocontrol efficacy of two potential biocontrol agents on *Fusarium* head blight in wheat. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 370-376, 2009.

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

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 473-483, 2000.

PATRIARCA, A. *Alternaria* in food products. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 1-9, 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.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 30, p. 67-78, 2016.

POSE, G.; PATRIARCA, A.; KYANKO, V.; PARDO, A.; PINTO, V. F. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 348-353, 2010.

PRUSKY, D.; KOBILER, I.; AKERMAN, M.; MIYARA, I. Effect of acidic solutions and acidic prochloraz on the control of postharvest decay caused by *Alternaria alternata* in mango and persimmon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, n. 2, p. 134-141, 2006.

QIN, G. Z.; TIAN, S. P. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low dosage of fungicides under different storage conditions. **Plant Disease**, v. 88, n. 5, p. 497-501, 2004.

REDDY, M. V. B.; ANGERS, P.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Chitosan effects on blackmold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 6, p. 742-747, 2000.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROBIGLIO, A.; SOSA, M. C.; LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 211-216, 2011.

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

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

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

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.

SPADARO, D.; LORE, A.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 75, p. 1-8, 2013.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: production, purification, and application. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 30-38, 2015.

SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, J. Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 9, p. 2968-2975, 2015.

TERMINIELLO, L.; PATRIARCA, A.; POSE, G.; PINTO, V. F. Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. **Mycotoxin Research**, v. 22, n. 4, p. 236 - 240, 2006.

THOMIDIS, T.; MICHAILIDES, T. J.; KARAYIANNIS, I. Fruit core rot of the peach cultivar 'Fayette' caused by *Alternaria alternata* in Greece. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 47, n. 12, p. 1476-1479, 2007.

THOMMA, B. P. H. J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 4, p. 225-236, 2003.

TRONCOSO-ROJAS, R.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. E. *Alternaria alternata* (Black rot, Black spot). In: BAUTISTA-BAÑOS, S. (Ed.). **Postharvest Decay: control strategies**. Academic Press, 2014. Cap 5. p. 147-187.

TRONSMO, A.; DENNIS, C. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 83, n. 1, p. 449-455, 1977.

VALENZUELA, N. L.; ANGEL, D. N.; ORTIZ, D. T.; ROSAS, R. A.; GARCÍA, C. F. O.; SANTOS, M. O. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biological Control**, v. 91, p. 88-93, 2015.

VARGAS, M.; PASTOR, C.; CHIRALT, A.; MCCLEMENTS, D.; GÓNZALEZ-MARTINEZ, C. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 6, p. 496-511, 2008.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.

WALLACE, R. L.; HIRKALA, D. L.; NELSON, L. M. Postharvest biological control of blue mold of apple by *Pseudomonas fluorescens* during commercial storage and

potential modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. 133, p. 1-11, 2017.

WANG, Y.; BAO, Y.; SHEN, D.; FENG W.; YU, T.; ZHANG, J.; ZHENG, X. D. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 234-239, 2008.

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

WILSON, C. L.; CHALUTZ, E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. **Scientia Horticulturae**, v. 40, n. 2, p. 105-112, 1989.

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

WOUDENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROUS, P. W. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 171-212, 2013.

YOU, J.; ZHANG, J.; WU, M.; YANG, L.; CHEN, W.; LI, G. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. **Biological Control**, v. 101, p. 31-38, 2016.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, v. 57, n. 3, p. 193-201, 2011.

ZHANG, Z.; CHEN, J.; LI, B.; HE, C.; CHEN, Y.; TIAN, S. Influence of oxidative stress on biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against blue mold on peach fruit. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2017.

ZHAO, K.; SHAO, B.; YANG, D.; LI, F. Natural occurrence of four *Alternaria* mycotoxins in tomato-and citrus-based foods in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 343-348, 2015.

CAPÍTULO 1. Mecanismos de ação utilizados por *Torulaspota globosa* e *Trichosporon asahii* no controle de *Alternaria alternata*

1. Resumo

Entender as estratégias que micro-organismos agentes de controle biológico utilizam no controle do fungo patógeno é de grande importância para a formulação de um produto. Um antagonista pode utilizar diversos mecanismos em conjunto para sua atividade de controle. O objetivo deste trabalho foi identificar os possíveis mecanismos de ação das leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44) em sua atuação como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata*. As duas linhagens foram avaliadas para a produção de enzimas hidrolíticas, sendo elas quitinase e β -1,3-glucanase, produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) com ação no controle de *A. alternata* em teste *in vivo* e produção de biofilme. Como resultado, as duas linhagens não produziram quitinase, mas apresentaram atividade positiva para β -1,3-glucanase, alcançando uma produção de 0,31 e 0,48 g de glicose/g de peso seco da levedura, para 5S55 e 3S44, respectivamente. Em relação à produção de COVs, as leveduras não mostraram nenhuma atividade de inibição de *A. alternata*, não diferindo estatisticamente do grupo controle em relação ao diâmetro da podridão. Embora não tenham apresentado controle no diâmetro, o tratamento com as leveduras mostrou menor desenvolvimento de micélio na podridão. Em relação ao biofilme, somente 3S44 apresentou produção. Diante dos resultados, é possível afirmar que ambas as leveduras foram capazes de produzir β -1,3-glucanase, e *T. asahii* (3S44) também foi

capaz de formar biofilme, mecanismos de ação que podem contribuir no controle de *A. alternata*.

2. Introdução

Agentes de controle biológico podem agir por meio de diferentes estratégias de antagonismo, dependendo do patógeno, do hospedeiro e do ambiente (DI FRANCESCO; MARTINI; MARI, 2016), podendo utilizar mais de um mecanismo para o controle do fitopatógeno (JAMALIZADEH et al., 2011). Uma boa compreensão dos mecanismos de ação utilizados por esses agentes é essencial para desenvolvimento de formulações e métodos de aplicação (SPADARO; GULINO, 2004), além de contribuir também no desenvolvimento de procedimentos adicionais para melhores resultados ou na seleção de linhagens mais desejáveis e eficazes (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009).

O parasitismo é um dos possíveis mecanismos utilizados na atividade de biocontrole e compreende a habilidade do micro-organismo antagônico de se ligar com as hifas de patógenos fúngicos para produzir enzimas extracelulares líticas de parede celular (DUKARE et al., 2018). A parede celular fúngica é constituída por glicoproteínas e polissacarídeos, principalmente glucano e quitina, que são amplamente interligados para formar uma rede complexa, constituindo a base estrutural da mesma (BOWMAN; FREE, 2006). Assim, para a quebra dessa estrutura são necessárias diferentes enzimas, especialmente β -1,3-glucanases e quitinases (ZHANG et al., 2011). A degradação enzimática de hifas de patógenos fúngicos resulta em deformidades celulares, incluindo danos citológicos, lise e distorção em micélios, permeabilidade alterada da membrana celular e vazamento de conteúdo citoplasmático (DUKARE et al., 2018). Há diversos trabalhos que relatam que a produção dessas enzimas por leveduras pode ser um dos possíveis mecanismos de ação usados no controle de fungos fitopatógenos (CASTORIA et al., 1997; LOPES et al., 2015; FERRAZ et al., 2016).

A produção de biofilme é outro tipo de mecanismo que pode ser usado pelo antagonista microbiano em sua atividade de biocontrole. Sua produção envolve um processo no qual os micro-organismos formam uma comunidade embebida em uma matriz complexa, o que lhes permite aumentar a resistência a estresses e melhorar a adesão em superfícies (VERO et al., 2013). Sua estrutura forma uma barreira

mecânica entre a superfície da ferida ou do fruto e o patógeno, que protege o hospedeiro (DI FRANCESCO; MARTINI; MARI, 2016).

Antagonistas microbianos também podem produzir uma ampla gama de substâncias antifúngicas, que podem ser voláteis ou solúveis em água (JAMALIZADEH et al., 2011). As de natureza volátil podem ser potencialmente empregadas com sucesso como tratamentos gasosos no controle de fungos fitopatogênicos em um processo definido como "biofumigação" (MARI; BAUTISTA-BAÑOS; SIVAKUMAR, 2016). Os COVs (compostos orgânicos voláteis), como são conhecidos, são caracterizados por possuírem baixo peso molecular, alta pressão de vapor e baixa solubilidade em água e sua produção pode ser um dos mecanismos utilizados por micro-organismos agentes de controle biológico (JAMALIZADEH et al., 2011).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar os possíveis mecanismos de ação das leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44) em sua atuação como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Micro-organismos

Foram avaliados 2 isolados de levedura identificados como *Trichosporon asahii* (linhagem 3S44) e *Torulaspota globosa* (linhagem 5S55), obtidos de rizosfera de milho e de cana-de-açúcar (variedade RB867515), respectivamente, em área do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos *campus* Araras-SP (latitude: 22° 21' 25" S e longitude: 47° 23' 03" W, altitude de 629 m). Essas linhagens foram selecionadas, dentre mais de 300 isolados, como eficientes no controle de fungos, incluindo *Alternaria alternata*, em ensaios preliminares *in vitro* (dados não publicados). Foram identificadas por meio de sequenciamento da região D1/D2 – 28S do rDNA com o uso dos primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As linhagens foram mantidas em meio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose; composição: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose; 2% ágar) em tubo de ensaio com meio inclinado com glicerol 0,5 % para sua conservação até o início dos testes.

O fungo *Alternaria alternata* foi isolado de lesões na superfície de tomates com sintomas de podridão e, posteriormente, testado em relação à sua patogenicidade através da inoculação de esporos em tomates saudáveis. Foi mantido em BDA (Batata Dextrose Ágar; 39g/L de meio comercial). Os esporos utilizados nos experimentos foram removidos de culturas em fase de esporulação, após 14 dias de cultivo. A remoção foi realizada com a raspagem dos esporos com alça de platina estéril, e estes foram suspensos em solução de água destilada com 0,05% (v/v) Tween 20, de acordo com Zhao et al. (2008), com modificações. O ajuste de concentração foi realizado em câmara de Neubauer a 1×10^5 esporos/mL.

3.2. Tomates para teste de produção de COVs

Os tomates (*Solanum lycopersicum* L.) utilizados nos ensaios foram obtidos de uma produção orgânica no município de Cordeirópolis/SP apresentando maturidade comercial com tamanhos uniformes e livres de lesões e podridões. Para o experimento, foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e álcool 70%, sendo posteriormente lavados com água destilada estéril. Após desinfecção, foram artificialmente feridos (3 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade), sendo removida a porção de tecido.

3.3. Produção de enzimas hidrolíticas

3.3.1. Quitinase

A quitina coloidal foi utilizada como substrato nesse ensaio e foi preparada de acordo com Liu et al. (2014). A atividade de quitinase foi determinada pela medição da liberação N-acetilglucosamina utilizando o método de ADNS de acordo com Nally et al. (2015). As leveduras foram inoculadas (100 μ L a 1×10^8 células/mL) em tubo falcons de 50 mL contendo 15 mL de YNB – (Yeast nitrogen base - 6,7 g/L), tampão de acetato de sódio 0,1 M em pH 5,5 adicionado de quitina coloidal (10 g/L). A concentração correta da quitina coloidal foi determinada por secagem de amostra a 60 °C, até atingir o peso constante, de acordo com Cattelan (1999). Os tubos foram incubados a 160 rpm e 25 °C durante 60 horas. A cada 12 horas, amostras de 500 μ L foram retiradas e centrifugadas 7000 rpm por 6 minutos. 250 μ L do sobrenadante livre de células foi misturado com 250 μ L de tampão de acetato de sódio 0,1 M suplementado com 10g/L de quitina coloidal (pH 5,5) e a mistura foi incubada em

banho-maria a 37 °C durante 1 hora. Após incubação, as amostras foram suplementadas com 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) e imersas em água a 100°C durante 10 minutos. N-acetilglucosamina foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm usando uma curva padrão. O experimento foi realizado em triplicata e o controle foi realizado sem a presença das leveduras.

3.3.2. β-1,3-glucanase

O ensaio foi realizado de acordo com Nally et al. (2015), com modificações. Para a realização da atividade de β-1,3-glucanase foi utilizado laminarina como substrato indutor. As leveduras foram inoculadas (100 µL a 1×10^8 células/mL) em tubos falcon de 50 mL contendo 15 mL de YNB (6,7 g/L), tampão de acetato de sódio a 0,1 M, pH 5,5 e 2 g/L de laminarina. Os tubos foram incubados a 160 rpm a 25 °C durante 60 horas. A cada 12 horas, amostras de 500 µL foram retiradas, centrifugadas 7000 rpm por 6 minutos. 250 µL do sobrenadante livre de células foi misturado com 250 µL de tampão de acetato de sódio 0,1 M suplementado com 2 g/L de laminarina com pH 5,5 e a mistura foi incubada em banho-maria a 45 °C por 30 minutos. Após incubação, as amostras foram suplementadas com 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) e imersas em água a 100°C durante 10 minutos. A glicose foi quantificada a 540 nm usando curva padrão. Foi representada em g/L, de acordo com Ferraz et al. (2016). No último tempo (60 horas), foi definido o peso seco das leveduras em g/L. O experimento foi realizado em triplicata e o controle foi realizado sem a presença das leveduras.

3.4. Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) com ação antifúngica

O teste para avaliar a produção de COVS pelas leveduras *T. asahii* (3S44) e *T. globosa* (5S55) foi realizado de acordo com Parafati et al. (2015) com modificações. Placas de YEPD com as leveduras foram preparadas com 100 µL de uma suspensão com concentração de 1×10^8 células/mL e incubadas a 25 °C por 24 horas. Os tomates foram desinfetados e preparados como descrito no item 3.2 com 3 lesões em cada. Estas foram inoculadas com 20 µL de suspensão de *A. alternata* na concentração de 1×10^5 esporos/mL. Os tomates inoculados com o fungo e as placas com a leveduras (sem a tampa) foram colocados em uma caixa plástica de dimensões 36 x 26,5 x 10 cm (volume de aproximadamente 9,5 litros), sem que

tivessem contato (Figura 1). Foram adicionadas duas camadas de gaze estéril, embebidas em 25 mL de água estéril cada, colocadas na parte inferior, para hidratar e prevenir o ressecamento do ambiente. A caixa foi fechada e incubada por 5 dias a 25 °C. O teste foi realizado em triplicata, com 10 tomates e 6 placas por replicata, exceto para o controle que possuía apenas os frutos. Após o período de incubação foi determinado o diâmetro da podridão em cada lesão. Características como a presença de micélio e esporos nas lesões com podridão também foram avaliadas, conforme categorias (Quadro 1) representadas em porcentagem de lesões acometidas. As categorias estão exemplificadas na figura 2.

Quadro 1. Categorias para a descrição da podridão desenvolvida nas lesões quanto à presença de micélio e esporos

ESTRUTURA	CATEGORIAS	DESCRIÇÃO
Micélio	0	Micélio não visível
	1	Pequena a média quantidade de micélio
	2	Grande quantidade de micélio
Esporos	0	Esporos não visíveis
	1	Pequena a média quantidade de esporos
	2	Grande quantidade de esporos

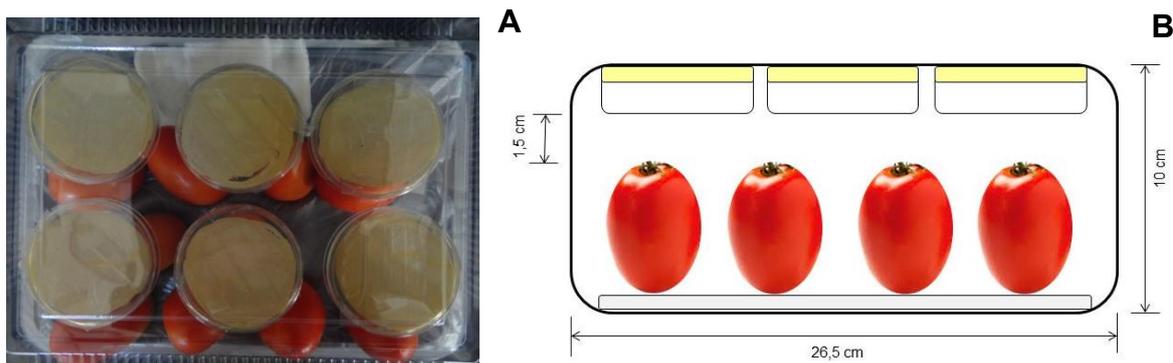


Figura 1. Montagem do teste de COVs. **(A)** Caixa representando uma replicata do tratamento. **(B)** Esquema lateral da caixa.

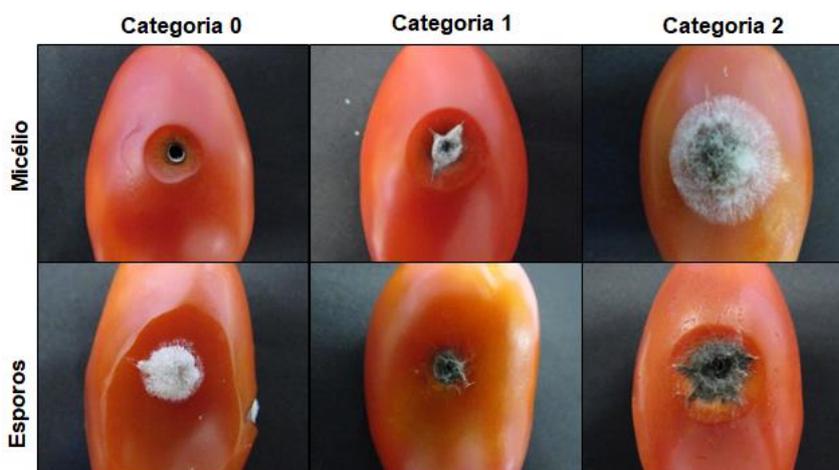


Figura 2. Exemplo das categorias para presença de micélio e esporos nas lesões com podridão.

3.5. Produção de biofilme

A capacidade de formação de biofilme pelas linhagens de leveduras antagonistas foi avaliada de acordo com Vero et al. (2013) e Ruzicka et al. (2007), com modificações. As leveduras foram cultivadas durante 24h a 25 °C em meio YEPD e depois ajustadas na concentração de 1×10^8 células/mL para preparo do inóculo. Microtubos (volume de 2 mL) contendo 900 μ L de meio YEPD foram inoculados com 100 μ L do da suspensão de leveduras e incubados durante 48 horas com agitação de 75 rpm. O controle foi preparado apenas com meio YEPD. Após a incubação, os microtubos foram esvaziados, lavados com água destilada por 3 vezes e secos ao ar em temperatura ambiente. A camada de biofilme aderente foi corada com solução aquosa de cristal violeta a 1% (p/v) durante 20 minutos e os microtubos foram enxaguados com água destilada por 3 vezes e secos ao ar. O corante ligado foi eluído de cada microtubo com 1 mL de etanol 95%. A absorbância foi medida a 620 nm. A formação de biofilme foi considerada positiva nos poços onde a absorbância foi maior que a média do controle negativo mais três vezes o seu erro padrão. Cada tratamento foi realizado com seis repetições e o teste foi realizado duas vezes.

3.6. Análise estatística

A análise nparLD foi realizada para o teste de produção de enzimas hidrolíticas (item 3.3) utilizando o modelo "F1-LD-F1". Foram utilizadas análises

Wald-type ($p < 0,05$), seguidas de comparações pareadas entre curvas com modelo disponível no pacote nparLD (NOGUCHI et al., 2012).

Os dados obtidos nos testes de produção de COVs (item 3.4) e produção de biofilme (item 3.5) foram avaliados via ANOVA one-way. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade dos dados foram verificados pelos testes de Shapiro-wilk e Bartlett, respectivamente. A transformação logarítmica $\log(x)$ dos dados foi aplicada para atender aos pressupostos no teste de produção de biofilme. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% utilizando-se o software R v.3.3.3 (R CORE TEAM, 2017).

4. Resultados e Discussão

4.1. Produção de enzimas hidrolíticas

As enzimas foram mensuradas pela quantidade liberada de açúcar reduzido. Ao longo de 60 horas de cultivo, as duas leveduras não foram capazes de produzir a enzima quitinase, já que não houve quantificação de N-acetilglucosamina. Já em relação à enzima β -1,3-glucanase, ao final do período de incubação, a quantificação de glicose foi de 0,13 g/L com 0,41 g/L de peso seco de células para a levedura *T. globosa* (5S55), enquanto que para *T. asahii* (3S44) a quantificação de glicose foi de 0,15 g/L, com peso seco de células de 0,31 g/L. Fazendo uma relação dessas duas medidas a linhagem 5S55 apresentou produção de 0,31 g de glicose/g de peso seco da levedura, enquanto que a 3S44 produziu 0,48 g de glicose/g de peso seco. As curvas referentes a liberação de glicose por parte das duas leveduras ao longo do tempo, foram estatisticamente diferentes, indicando uma produção significativamente maior de β -1,3-glucanase por 3S44 (Figura 3). O controle não apresentou nenhuma produção, assim como esperado.

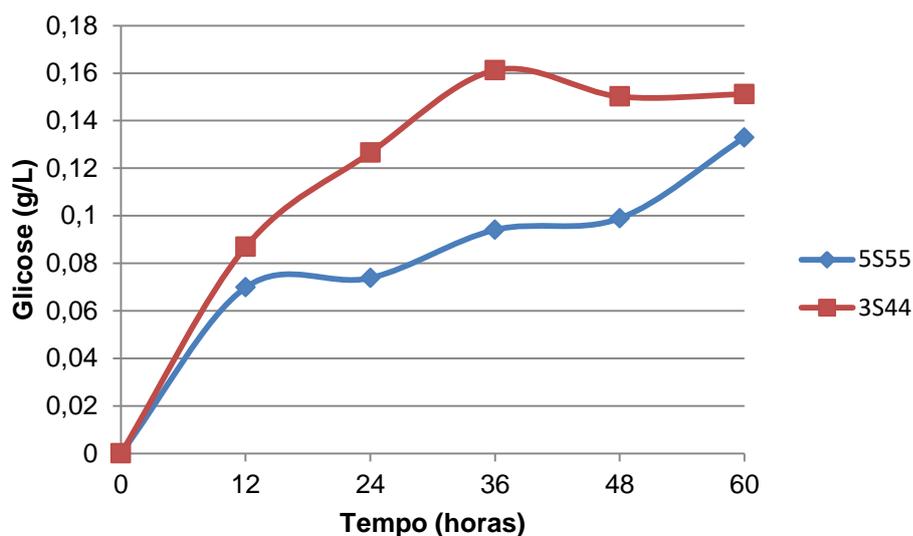


Figura 3. Liberação de glicose ao longo do tempo, associada com a produção de β -1,3-glucanase pelas leveduras *T. globosa* (5S55) e *T. asahii* (3S44).

A produção de enzimas hidrolíticas por micro-organismos antagonistas é um dos mecanismos utilizados no controle do fitopatógeno, atuando na degradação de sua parede celular. Ferraz et al. (2016) testaram leveduras a fim de entender seus modos de ação para controle do fungo *Geotrichum citri-aurantii*, e a produção dessas enzimas foi um dos principais mecanismos envolvidos na atividade de biocontrole das leveduras. Das oito leveduras testadas, seis produziram quitinase e apenas duas produziram β -1,3-glucanase em 24 horas de incubação, sendo elas, *Rhodotorula minuta* e *Saccharomyces cerevisiae* com produção de 0,004 g/L e 0,039 g/L de glicose, respectivamente. Comparando os resultados deste trabalho com o do artigo, após 24 horas de incubação as linhagens 5S55 e 3S44 produziram 0,074 g/L e 0,13 g/L de glicose, respectivamente, apresentando uma produção de β -1,3-glucanase maior. Enquanto o presente trabalho utilizou laminarina como substrato, Ferraz et al. (2016) utilizaram a parede celular do fungo. Diversos trabalhos têm relatado melhores resultados na produção de enzimas hidrolíticas quando utilizam a parede celular do fungo ao invés de outras fontes de carbono como substrato (JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998; MASIH; PAUL, 2002; MONTEIRO; ULHOA, 2006; SARAVANAKUMAR et al., 2009).

Com resultado diferente deste trabalho, Rosa et al. (2010) testaram a levedura *Torulaspora globosa* (1S112) que não apresentou atividade para quitinase e β -1,3-glucanase. Essa diferença nos resultados pode estar relacionada ao fato das

linhagens serem diferentes. Nally et al. (2015) testaram diversas linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e só uma parte foi capaz de produzir tais enzimas.

As enzimas hidrolíticas podem comprometer a estrutura da parede celular, com deformações morfológicas. Masih e Paul (2002) relataram que o micélio do fungo *Botrytis cinerea* quando cultivado em placas com a levedura *Pichia membranifaciens* apresentou danos extensos em sua parede celular com ruptura completa e fragmentação dos filamentos de hifas, atribuindo estes efeitos possivelmente à produção e ação da enzima β -1,3-glucanase. Em trabalho realizado anteriormente com a linhagem 3S44 pela equipe de nosso laboratório, quando *A. alternata* foi cultivado em placa junto com a levedura, o mesmo apresentou deformações em suas hifas (BOSQUEIRO, 2016). Uma das causas para tais deformações pode estar relacionada à produção da enzima β -1,3-glucanase relatada no presente trabalho.

4.2. Produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) com ação antifúngica

Os diâmetros das lesões nos tratamentos com *T. asahii* (3S44) e *T. globosa* (5S55) foram muito próximos ao do tratamento controle e não diferiram estatisticamente do mesmo. Enquanto o diâmetro deste último foi 1,96 cm, para 3S44 e 5S55 esse valor foi de 1,92 e 1,90 cm, respectivamente (Figuras 4, 5 e 6). Embora a medida do diâmetro tenha variado pouco entre os tratamentos, na presença das leveduras as lesões com podridão passaram a apresentar um micélio menos acentuado, ou seja, houve crescimento no número de lesões na categoria 1, caracterizada por uma pequena a média quantidade de micélio, em comparação com o controle que apresentou maior parte de suas lesões na categoria 2, caracterizada pela presença de grande quantidade de micélio (Figura 7A). Além disso, também houve aumento de lesões na categoria 0, ou seja, que não apresentaram micélio visível. Dessa forma, é possível afirmar que a diminuição de lesões na categoria 2 com a presença das leveduras, está relacionada à um menor desenvolvimento micelial em comparação com o controle.

A presença de esporos ficou mais amena no tratamento com a linhagem 3S44, que passou a ter mais lesões na categoria 1, caracterizada por pequena a média quantidade de esporos, comparado ao controle que apresentou maior

quantidade de lesões na categoria 2, caracterizada pela presença de grande quantidade de esporos. A linhagem 5S55 ao contrário, teve um aumento no número de lesões na categoria 2 em comparação ao controle, apresentando crescimento na quantidade de esporos (Figura 7B).

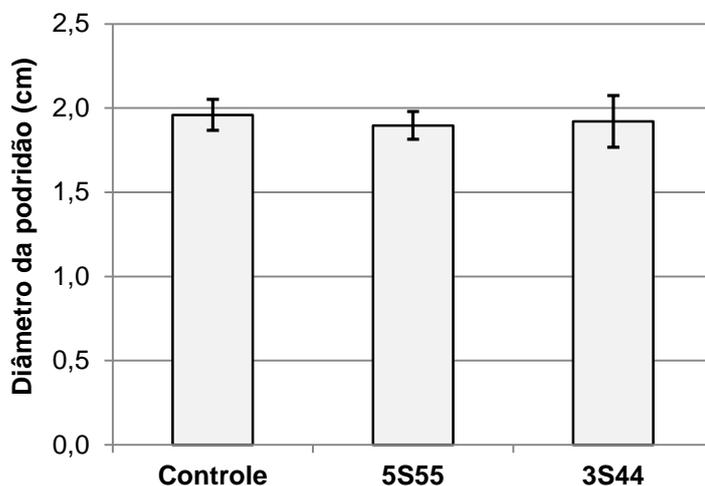


Figura 4. Diâmetro da podridão causada por *A. alternata* em teste para verificar a produção de COVs em incubação durante 5 dias a 25 °C. Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas para análise de variância a 5% (ANOVA one-way). Barras indicam erro padrão da média.

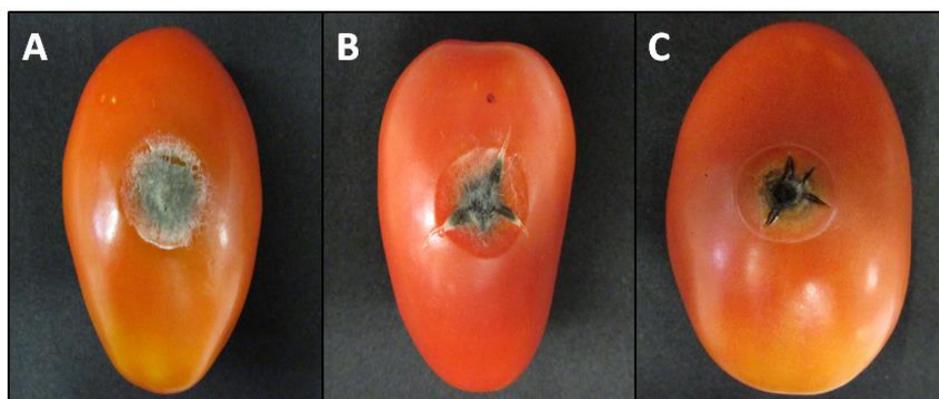


Figura 5. Podridão nos tomates em teste de produção de COVs provocadas por *A. alternata* após incubação durante 5 dias a 25 °C. Os tomates estão representando **(A)** tratamento controle, **(B)** tratamento com *T. globosa* (5S55) e **(C)** tratamento com *T. asahii* (3S44).



Figura 6. Visão geral da replicata com tomates no teste de produção de COVs com podridão causada por *A. alternata* após incubação durante 5 dias a 25 °C. **(A)** Tratamento controle. **(B)** Tratamento com *T. globosa* (5S55). **(C)** Tratamento com *T. asahii* (3S44).

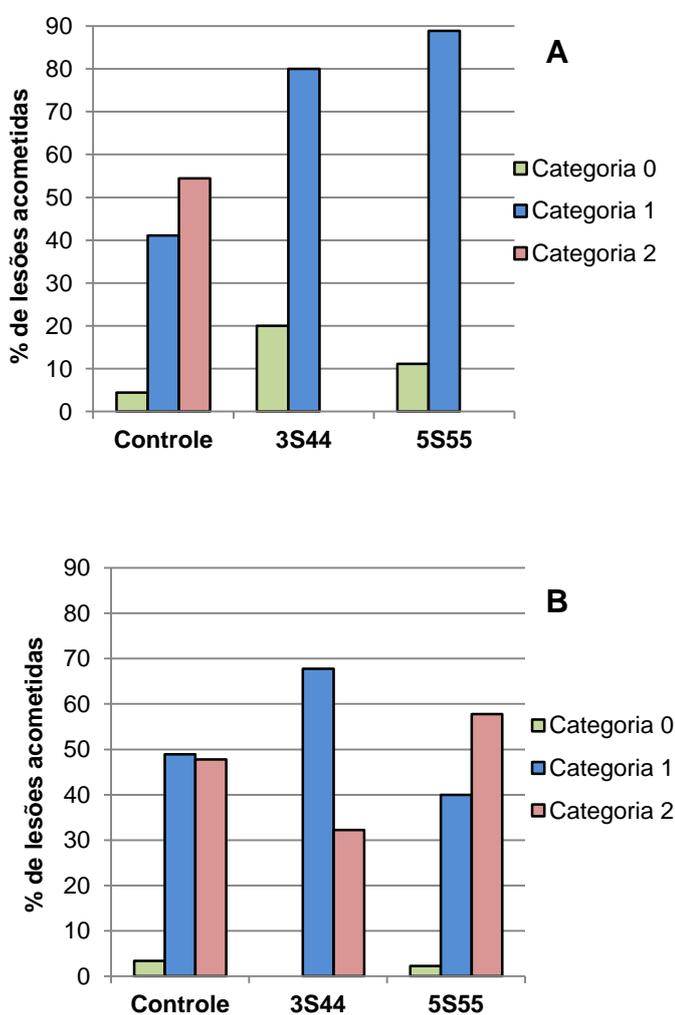


Figura 7. Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de **(A)** micélio e **(B)** esporos.

A produção de COVS por leveduras tem sido relatada no controle de fungos fitopatógenos (HUANG et al., 2011; DI FRANCESCO et al., 2015; TOFFANO; FIALHO; PASCHOLATI, 2017). No presente trabalho, não houve controle do fungo *A. alternata* pela ação desses compostos. Em contraste com tal resultado, em teste *in vitro* realizado anteriormente, utilizando-se placas sobrepostas, a levedura *T. asahii* (3S44) inibiu 30,2% da área micelial de *A. alternata* (BOSQUEIRO, 2016), enquanto que *T. globosa* (5S55) inibiu 94,24% (BIZARRIA JÚNIOR, 2016).

O resultado apresentado nesse trabalho para produção de COVs *in vivo* e a discrepância com o resultado apresentado no teste *in vitro* pode ter ligação com os volumes dos recipientes usados. Enquanto que no presente trabalho a caixa utilizada continha 9,5 litros, as placas de petri sobrepostas possuíam aproximadamente 0,19 litro. Esse pequeno volume pode ter favorecido a atuação dos compostos voláteis produzidos pelas leveduras, permitindo que ficassem mais concentrados e tivessem maior proximidade e contato com o fungo. Além disso, a quantidade de placas utilizadas no teste *in vivo* pode ter sido baixa em relação ao volume do recipiente utilizado. No trabalho de Chen, Chen e Chou (2018) foi realizado teste *in vivo* de COVs com quatro (ou duas) placas contendo 100 μL de suspensão celular (1×10^7 células/mL) da levedura a ser testada e cinco morangos, onde 100 μL de uma suspensão de *B. cinerea* (1×10^7 conídios/mL) foi espalhada em cada um deles. Como resultado, a atividade de controle do fungo foi menor quando as placas foram reduzidas de quatro para duas. A levedura *Galactomyces candidum*, que com quatro placas inibiu completamente a severidade da doença (categoria 0), com duas placas esta alcançou a categoria 5, em uma escala que variava de 0 a 8. No nosso caso, foram utilizados 6 placas com 100 μL de suspensão de leveduras com 1×10^8 células/mL, ou seja, um número pequeno para 10 tomates, se comparado com o artigo anterior, podendo ser uns dos motivos da não inibição do fungo *A. alternata in vivo*.

4.3. Produção de biofilme

O valor mínimo para a formação de biofilme foi calculado em $A_{620} = 0,04$. Os dados indicam que *T. asahii* (3S44) (Figura 8C) apresentou formação de biofilme nas condições analisadas, diferindo estatisticamente do controle, enquanto que *T. globosa* (linhagem 5S55) (Figura 8B) permaneceu estatisticamente igual ao controle (Figura 8A), com valor de absorvância próximo ao valor mínimo (Tabela 1). Níveis

crescentes de absorvância e a coloração violeta mantida no microtubo após a eluição com álcool, refletem a capacidade do isolado de formar biofilme (Figura 8).

Tabela 1. Formação de biofilme pelas linhagens das leveduras (5S55 e 3S44), medida pela absorvância das amostras coradas com cristal violeta.

Tratamento	A ⁶²⁰ (Média + Erro padrão)
Controle	0,031 ± 0,003 ^a
<i>T. globosa</i> (5S55)	0,043 ± 0,007 ^a
<i>T. asahii</i> (3S44)	0,421 ± 0,061 ^b

Tratamentos com letras diferentes são significativamente diferentes a 5% pelo teste de Tukey.

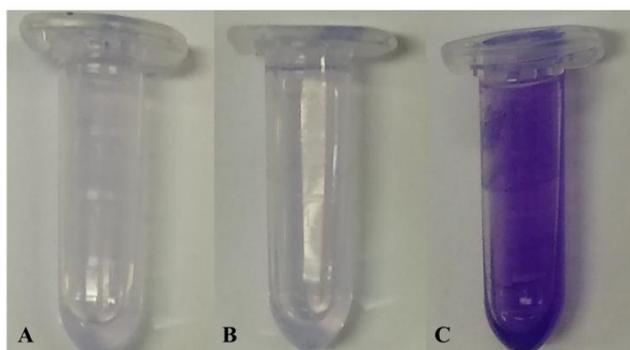


Figura 8. Formação de biofilme pelas leveduras após 48 horas de incubação sob agitação de 75 rpm. **(A)** Controle sem a presença das leveduras. **(B)** *T. globosa* (5S55). **(C)** *T. asahii* (3S44).

A formação de biofilme pode ser um mecanismo de ação utilizado por leveduras antagonistas de grande importância para eficiência no controle do fungo patógeno quando são aplicadas sobre os frutos. Chi et al. (2015) avaliaram a eficácia da levedura antagonista *Pichia kudriavzevii*, nas formas de células únicas e de biofilme, no controle pós-colheita do bolor cinzento (*Botrytis cinerea*) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), em peras. Os resultados indicaram que na forma do biofilme, a levedura obteve melhor eficácia de controle se comparada à forma de levedura única para ambas as doenças, com base na incidência da doença e diâmetro da lesão. Além disso, a levedura apresentou maior resistência ao

estresse oxidativo na forma de biofilme, condição importante para que permaneçam viáveis em atividade antagonista no pós-colheita.

Embora a formação de biofilme tenha sido relatada como um importante modo de ação em controle biológico, também pode ter um efeito negativo sobre a saúde do fruto. No trabalho de Giobbe et al. (2007), os autores relataram a formação de biofilme por *Pichia fermentans* (linhagem 726) na superfície de maçãs e pêssegos. A levedura foi capaz de inibir efetivamente a infecção causada por *Monilinia fructicola* em maçãs, mas quando administrada em pêssegos, suas células no biofilme apresentaram crescimento na forma de pseudo-hifas com atividade patogênica. Um estudo posterior com essa mesma linhagem indicou que o dimorfismo de suas células é caracterizado por mudanças na expressão gênica, provavelmente influenciado pela cultura na qual a levedura está crescendo (FIORI et al., 2012).

A linhagem de *T. asahii* (linhagem 3S44), avaliada nesse trabalho, apresenta crescimento em forma de pseudo-hifa, assim como a *P. fermentans* (linhagem 726) relatada no trabalho acima. Porém, testes anteriores (dados não publicados), realizados com sua aplicação em tomates feridos juntamente com esporos de *A. alternata*, mostraram uma atividade de controle da podridão de alternaria (podridão negra) e não de patogenicidade. Dessa forma, mesmo que uma levedura antagonista apresente bons resultados no controle de um fungo patógeno em testes *in vitro*, esse resultado pode não ser positivo sobre o fruto, evidenciando a necessidade dos testes *in vivo*. Além disso, uma análise de risco completa do micro-organismo antagonista é necessária para evitar resultados imprevisíveis que podem impactar negativamente o seu uso seguro como agente de controle biológico no pós-colheita (FIORI et al., 2012).

5. Conclusões

Dos mecanismos de ação testados para a linhagem *T. globosa* (5S55), os resultados foram positivos apenas para produção de β -1,3-glucanase. Para *T. asahii* (3S44), além da produção da enzima, a linhagem também foi capaz de produzir biofilme. Os mecanismos relatados podem estar contribuindo, juntamente com outros ainda desconhecidos, para o controle de *A. alternata*. Em relação à produção de COVs, não foi observado controle eficiente do fungo em lesões nos tomates, porém, ocorreu diminuição no desenvolvimento do micélio. Para confirmação do

resultado, a realização de novos testes em diferentes condições é necessária, como por exemplo, utilizando um recipiente com menor volume.

Conhecer os mecanismos de ação do micro-organismo antagonista é um dos principais passos para entendimento de sua ação no controle do fungo e na criação de uma formulação comercial. Nos testes de produção de enzimas hidrolíticas e biofilme, que foram realizados somente *in vitro* e sem contato com o fungo, é importante que também sejam realizados em condições *in vivo*, para confirmação dos resultados.

6. Literatura citada

BOSQUEIRO, A. S. **Potencial de *Meyerozyma guilliermondii* e *Trichosporon asahii* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata* em tomate.** 2016. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BIZARRIA JÚNIOR, R. **Potencial de *Torulaspora globosa* e *Rhodotorula mucilaginosa* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata* em tomate.** 2016. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCIO, V. β -1, 3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, n. 3, p. 293-300, 1997.

CATTELAN AJ. 1999. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal.** Londrina: Embrapa Soja. 36p.

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.

CHI, M.; LI, G.; LIU, Y.; LIU, G.; LI, M.; ZHANG, X.; SUN, Z.; SUI, Y.; LIU, J. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113-119, 2015.

DI FRANCESCO, A.; MARTINI, C.; MARI, M. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, n. 4, p. 711-717, 2016.

- 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.
- DUKARE, A. S.; PAUL, S.; NAMBI, V. E.; GUPTA, R. K.; SINGH, R.; SHARMA, K.; VISHWAKARMA, R. K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-16, 2018.
- FERRAZ, L. P.; DA CUNHA, T.; DA SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188, p. 72-79, 2016.
- FIORI, S.; SCHERM, B.; LIU, J.; FARRELL, R.; MANNAZZU, I.; BUDRONI, M.; MASERTI, B. E.; WISNIEWSKI, M. E.; MIGHELI, Q. Identification of differentially expressed genes associated with changes in the morphology of *Pichia fermentans* on apple and peach fruit. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 7, p. 785-795, 2012.
- GIOBBE, S.; MARCEDDU, S.; SCHERM, B.; ZARA, G.; MAZZARELLO, V. L.; BUDRONI, M.; MIGHELI, Q. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 8, p. 1389-1398, 2007.
- HUANG, R.; LI, G. K.; ZHANG, J.; YANG, L.; CHE, H. J.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 859-869, 2011.
- JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H. R.; AMINIAN, H.; ALIZADEH, A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **EPPO Bulletin**, v. 41, n. 1, p. 65-71, 2011.
- JIJAKLI, M. H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo- β -1, 3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, v. 88, n. 4, p. 335-343, 1998.
- LIU, C. L.; LAN, C. Y.; FU, C. C.; JUANG, R. S. Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 59-63, 2014.
- LOPES, M. R.; KLEIN, M. N.; FERRAZ, L. P.; DA SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. **Microbiological Research**, v. 175, p. 93-99, 2015.
- MARI, M.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; SIVAKUMAR, D. Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 70-81, 2016.
- MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of β -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.

MONTEIRO, V. N.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of a β -1, 3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 92-96, 2006.

NALLY, M. C.; PESCE, V. M.; MATURANO, Y. P.; RODRIGUEZ ASSAF, L. A.; TORO, M. E.; CASTELLANOS DE FIGUEROA, L. I.; VASQUEZ, F. Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 91-100, 2015.

NOGUCHI, K., GEL, Y. R., BRUNNER, E., KONIETSCHKE, F. nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. **Journal of Statistical Software**, v. 50, n. 12, 2012.

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.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>, 2017.

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1491-1502, 2010.

RUZICKA, F.; HOLÁ, V.; VOTAVA, M.; TEJKALOVÁ, R. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. **Folia Microbiologica**, v. 52, n. 3, p. 209-214, 2007.

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

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

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 185-194, 2004.

TOFFANO, L.; FIALHO, M. B.; PASCHOLATI, S. F. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to

control citrus black spot disease at postharvest. **Biological Control**, v. 108, p. 77-82, 2017.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; GONZÁLEZ, M. B.; BENTANCUR, O.; WISNIEWSKI, M. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). **FEMS yeast research**, v. 13, n. 2, p. 189-199, 2013.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, v. 57, n.3, p. 193-201, 2011.

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

CAPÍTULO 2. Resistência a estresses pelas leveduras *Torulaspota globosa* e *Trichosporon asahii*

1. Resumo

A utilização de leveduras para controle de fungos fitopatogênicos vem sendo uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos. Para que tenham bom desempenho no controle da doença, esses micro-organismos precisam resistir a uma série de condições estressantes para manterem-se viáveis e eficazes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade das leveduras *Torulaspota globosa* (linhagem 5S55) e *Trichosporon asahii* (linhagem 3S44) em diversas condições de estresse. Para isso, o cultivo das leveduras foi avaliado em diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C), condições de estresse osmótico (0, 3, 6 e 9% de NaCl) e de estresse oxidativo (0, 10, 20, 30 e 40 mM de H₂O₂), além de sua resistência a diferentes concentrações do fungicida Manzate WG[®] a base de mancozebe (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL). Como resultado, a temperatura de 10 °C foi a que gerou maior estresse sobre as leveduras; em 96 horas as linhagens apresentaram aumento no número de células vivas/mL, porém de forma mais lenta que nas outras duas temperaturas, sendo que *T. globosa* apresentou menor concentração de células vivas em comparação com *T. asahii*. Para o teste de estresse osmótico, a maior concentração testada, com 9% de NaCl, foi a que gerou maior estresse sobre as leveduras. Após 96 horas de cultivo, as linhagens apresentaram aumento no número de células vivas/mL, porém de forma mais lenta que o controle e as outras concentrações de NaCl, sendo que *T. globosa* apresentou menor concentração de células vivas em comparação com *T. asahii*. No teste de estresse oxidativo todas as concentrações afetaram *T. globosa* e

a de 40 mM foi a que gerou maior estresse sobre *T. asahii*. No tempo de 96 horas, *T. globosa* apresentou queda em sua concentração de células vivas, chegando a ser menor que a do inóculo inicial (1×10^6 células/mL) para 40 mM. Já *T. asahii* apresentou, nas mesmas condições e no mesmo tempo, um aumento em seu número de células. Para o teste de fungicidas, ambas as leveduras não resistiram a nenhuma concentração. Diante de tais resultados é possível afirmar que *T. asahii* (linhagem 3S44) apresentou-se mais resistente aos estresses testados que *T. globosa* (linhagem 5S55). Esta última apresentou bons resultados para estresse osmótico e temperatura, mas se mostrou muito sensível ao estresse oxidativo.

2. Introdução

Muitos resultados positivos de controle biológico em laboratório não são alcançados em condições práticas no campo (TEIXIDÓ; USALL; VIÑAS, 1999). Em muitas situações, isso acontece porque os agentes antagonistas são expostos a diferentes condições ambientais quando são aplicados no campo ou em packing houses (HU et al., 2015). Algumas dessas condições são estressantes, como baixas temperaturas, estresse osmótico e estresse oxidativo, e podem comprometer a viabilidade das células e, conseqüentemente, a sua atividade no controle biológico.

Para prolongar sua vida útil, a maioria dos frutos e hortaliças é armazenada e transportada em baixas temperaturas, sendo o estresse pelo frio uma adversidade comum à quais micro-organismos antagonistas usados para gerenciar doenças pós-colheita estarão expostos (HU et al., 2015; SUI et al., 2015). A habilidade de suportar o estresse osmótico é outro atributo importante para esses micro-organismos. Sendo assim, a capacidade de uma levedura antagonista de crescer a uma baixa atividade de água (a_w) deve ser considerada ao selecionar e desenvolver uma cepa potencial para biocontrole (SUI et al., 2015).

Também é de grande importância que esses micro-organismos tenham a capacidade de sobreviver sobre o tecido do seu hospedeiro, já que quando aplicados sobre a superfície ou em lesões em frutos, podem encontrar um ambiente de estresse oxidativo, prejudicial para sua viabilidade (SUI et al., 2012). Isso se deve pela interação entre o micro-organismo e o fruto, que gera uma resposta de defesa neste último, com produção rápida de espécies reativas de oxigênio, conhecida por explosão oxidativa (MACARISIN et al., 2007).

Além de estresses ambientais, o antagonista também pode estar exposto a outros estresses, como por exemplo, o causado pelo contato com fungicidas. Se o cultivo não for orgânico e o antagonista não tiver uma ampla atividade de controle sobre diversos fungos, ele poderá ser usado juntamente com fungicidas sintéticos. Além disso, diversos trabalhos tem proposto o uso de baixas doses de fungicidas em combinação com micro-organismos antagonista, para aumentar a eficácia do controle e também diminuir o uso de fungicida (BUCK, 2004; QIN; TIAN, 2004; NALLATHAMBI et al., 2009). Para as situações acima é necessário que o antagonista seja resistente ao fungicida que terá contato em sua aplicação e consiga manter sua atividade.

Considerando a importância dos micro-organismos resistirem a diferentes estresses para que mantenham sua viabilidade e atividade de controle, os objetivos desse trabalho foram 1) avaliar a resistência das leveduras a diferentes estresses ambientais (temperatura, estresse osmótico e estresse oxidativo) e 2) avaliar a resistência das leveduras a diferentes concentrações de fungicida Manzate WG[®] a base de mancozebe.

3. Materiais e métodos

3.1. Leveduras

Foram avaliados 2 isolados de levedura identificados como *Trichosporon asahii* (linhagem 3S44) e *Torulaspota globosa* (linhagem 5S55), obtidos da rizosfera de milho e de cana-de-açúcar (variedade RB867515), respectivamente, em área do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos *campus* Araras-SP (latitude: 22° 21' 25" S e longitude: 47° 23' 03" W, altitude de 629 m). Essas linhagens foram selecionadas, dentre mais de 300 isolados, como eficientes no controle de fungos, incluindo *Alternaria alternata*, em ensaios preliminares *in vitro* (dados não publicados). Foram identificadas por meio de sequenciamento da região D1/D2 – 28S do rDNA com o uso dos primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As linhagens foram mantidas em meio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose; composição: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose; 2% ágar) em tubo de ensaio com meio inclinado com glicerol 0,5 % para sua conservação até o início dos testes.

3.2. Resistência das leveduras a estresses ambientais

3.2.1. Temperatura

Para a realização do teste, 50 μL de uma suspensão com 1×10^8 células/mL das leveduras foram inoculados em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio BD (Batata Dextrose). Nessas condições, a concentração inicial de cada frasco foi de 1×10^5 células/mL. A incubação foi realizada nas temperaturas de 10, 20 e 30 °C sob agitação de 160 rpm. Após 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, uma amostra foi retirada de cada frasco e com o auxílio da câmara de Neubauer foi realizada a contagem de células vivas e mortas. Para verificar as células mortas, a amostra foi corada durante 10 minutos com corante azul de metileno 0,01% (p/v), utilizado na proporção de 1:1 (corante/amostra). Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída por um frasco.

3.2.2. Estresse osmótico

Para a realização do teste, 50 μL de uma suspensão com 1×10^8 células/mL das leveduras foram inoculados em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio BD (Batata Dextrose) suplementado com 0 (controle), 3, 6 e 9% de NaCl. Nessas condições, a concentração inicial de cada frasco foi de 1×10^5 células/mL. Os tratamentos foram incubados sob agitação de 160 rpm a 25 °C. Após 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, uma amostra foi retirada de cada frasco e com o auxílio da câmara de Neubauer foi realizada a contagem de células vivas e mortas, como descrito no item 3.2.1. Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída por um frasco.

3.2.3. Estresse oxidativo

O teste foi realizado de acordo com Chen et al. (2015) com modificações. Alíquotas de 50 μL de uma suspensão com 1×10^9 células/mL das leveduras foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio BD (Batata Dextrose) suplementado com 0 (controle), 10, 20, 30 e 40 mM de H_2O_2 . Nessas condições, a concentração inicial de cada frasco foi de 1×10^6 células/mL. Os tratamentos foram incubados sob agitação de 160 rpm a 25 °C. Após 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, uma amostra foi retirada de cada frasco e com o auxílio da câmara de Neubauer foi realizada a contagem de células vivas e mortas como

descrito no item 3.2.1. Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída por um frasco.

3.3. Resistência das leveduras a diferentes concentrações de fungicida a base de mancozebe

A sensibilidade das leveduras ao fungicida Manzate WG[®] a base de mancozebe, foi avaliada de acordo com Vero et al. (2013) com modificações. O teste foi realizado em placas de meio YEPD suplementado com as concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL de fungicida. 100 µL de uma suspensão das leveduras com concentração 1×10^3 células/mL foram espalhados sobre as placas e estas foram incubadas por 48 horas a 30 °C. Após incubação, a contagem do número de colônias foi realizada. O controle foi realizado sem a adição do fungicida. O teste foi realizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa.

3.4. Análise estatística

A análise nparLD foi realizada para os testes utilizando-se o modelo "F1-LD-F1". Foram utilizadas análises *Wald-type* ($p < 0,05$), seguidas de comparações pareadas entre curvas com modelo disponível no pacote nparLD (NOGUCHI et al., 2012).

4. Resultados e Discussão

4.1. Resistência das leveduras a estresses ambientais

4.1.1. Temperatura

Em relação às células vivas de *T. globosa* (linhagem 5S55), as curvas de crescimento nas três temperaturas foram consideradas estatisticamente diferentes entre si, o que indica um comportamento diferente em cada tratamento (Figura 1A). A temperatura de 30 °C, mais apropriada para o crescimento de leveduras em geral, possibilitou que *T. globosa* atingisse sua fase estacionária rapidamente em 24 horas, enquanto que a 20 °C, ela só a atingiu em 48 horas. Na temperatura de 10 °C tal fase não chegou a ser atingida ao final do teste (96 horas). Os tratamentos de 20 e 30 °C apresentaram, ao final do teste, concentração celular superior a 1×10^8 células/mL, enquanto que a 10 °C esse número não atingiu 1×10^6 células/mL.

Em relação à mortalidade, nas temperaturas de 20 e 30 °C, *T. globosa* apresentou uma taxa de células mortas baixa, não ultrapassando 4%, mostrando boa resistência nessas condições (Figura 1B). Na temperatura de 10 °C, as células foram bem menos resistentes nos primeiros tempos, chegando a 41% de mortalidade em 24 horas, porém com o passar do tempo houve queda nesse número, que ao final das 96 horas decresceu para 8,42%. Isso mostra que a princípio a levedura sofreu com estresse da temperatura mais baixa, mas com o passar do tempo a linhagem conseguiu se estabelecer no meio.

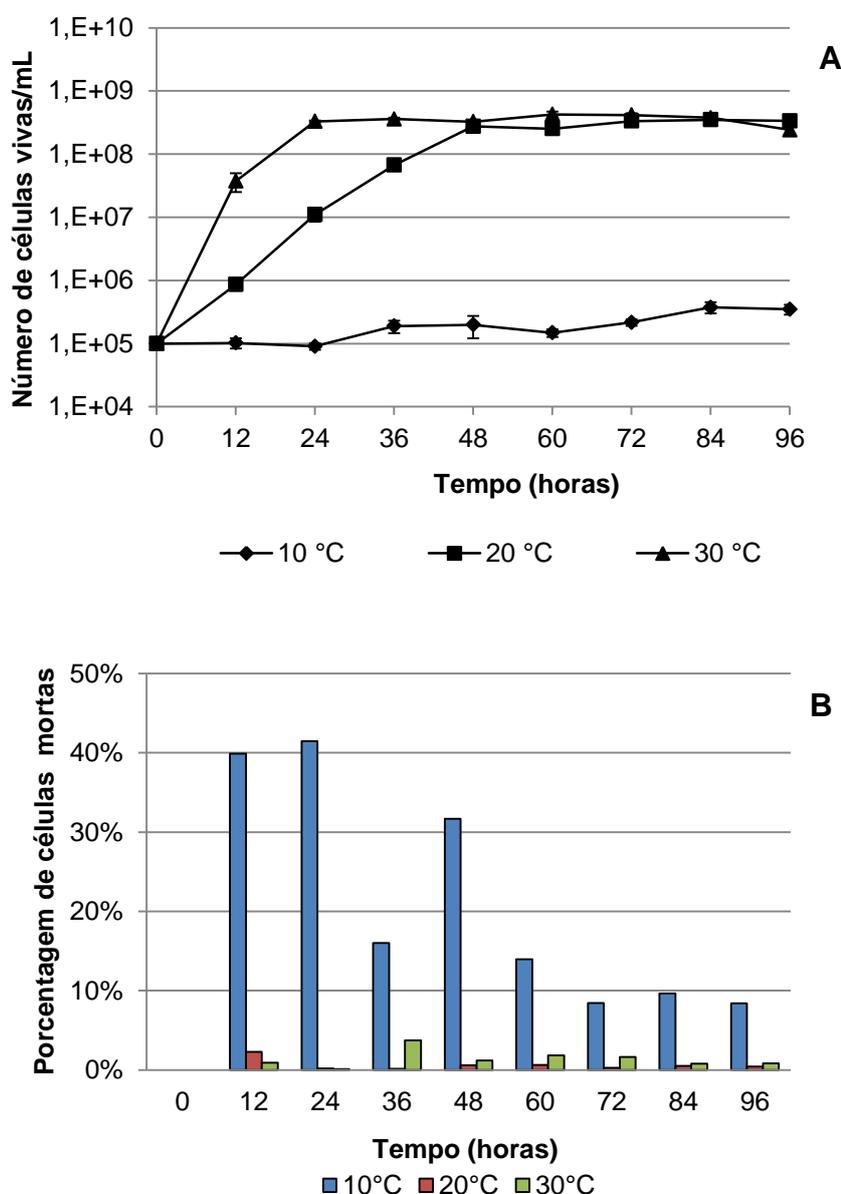


Figura 1. Cultivo de *T. globosa* (linhagem 5S55) em temperaturas de 10, 20 e 30 °C. **(A)** Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. **(B)** Porcentagem de células mortas.

Para células vivas de *T. asahii* (linhagem 3S44), as curvas de crescimento nas três temperaturas foram consideradas estatisticamente diferentes entre si, o que indica um comportamento diferente em cada tratamento (Figura 2A). Para o tratamento a 30 °C a levedura atingiu sua fase estacionária em 36 horas de cultivo, enquanto que a 20 °C isso ocorreu em 48 horas. Na temperatura de 10 °C, tal fase não chegou a ser atingida ao final do teste (96 horas). Os tratamentos de 20 e 30 °C apresentaram, no tempo de 96 horas, número superior a 1×10^8 células/mL, enquanto que a 10 °C esse número foi de $1,92 \times 10^6$ células/mL.

Em relação à mortalidade, as taxas foram baixas para as temperaturas de 30 e 20 °C com máximo de 8,5% e 2,22%, respectivamente. Já na temperatura de 10 °C, as taxas foram maiores no início do teste, chegando a 23% entre 36 e 48 horas com queda ao final, chegando a apenas 4,76% em 96 horas (Figura 2B).

Os resultados mantiveram um padrão semelhante para as duas leveduras. No caso das células vivas, foi possível observar que com a queda da temperatura as leveduras se multiplicaram mais lentamente, influenciando a curva de crescimento, levando mais tempo para atingirem a fase estacionária. Em relação a mortalidade, a mesma se apresentou baixa nas temperaturas de 20 e 30 °C, porém em 10 °C teve aumentos do início até mais ou menos a metade do tempo e, após isso, sofreu quedas atingindo taxas menores que 10% para *T. globosa* e menores que 7% para *T. asahii*. Isso mostra que, embora o número de células tenha sido influenciado pela baixa temperatura, as linhagens conseguiram se estabelecer no meio e ter um aumento de sua viabilidade ao final de 96 horas, se comparadas com o inóculo inicial.

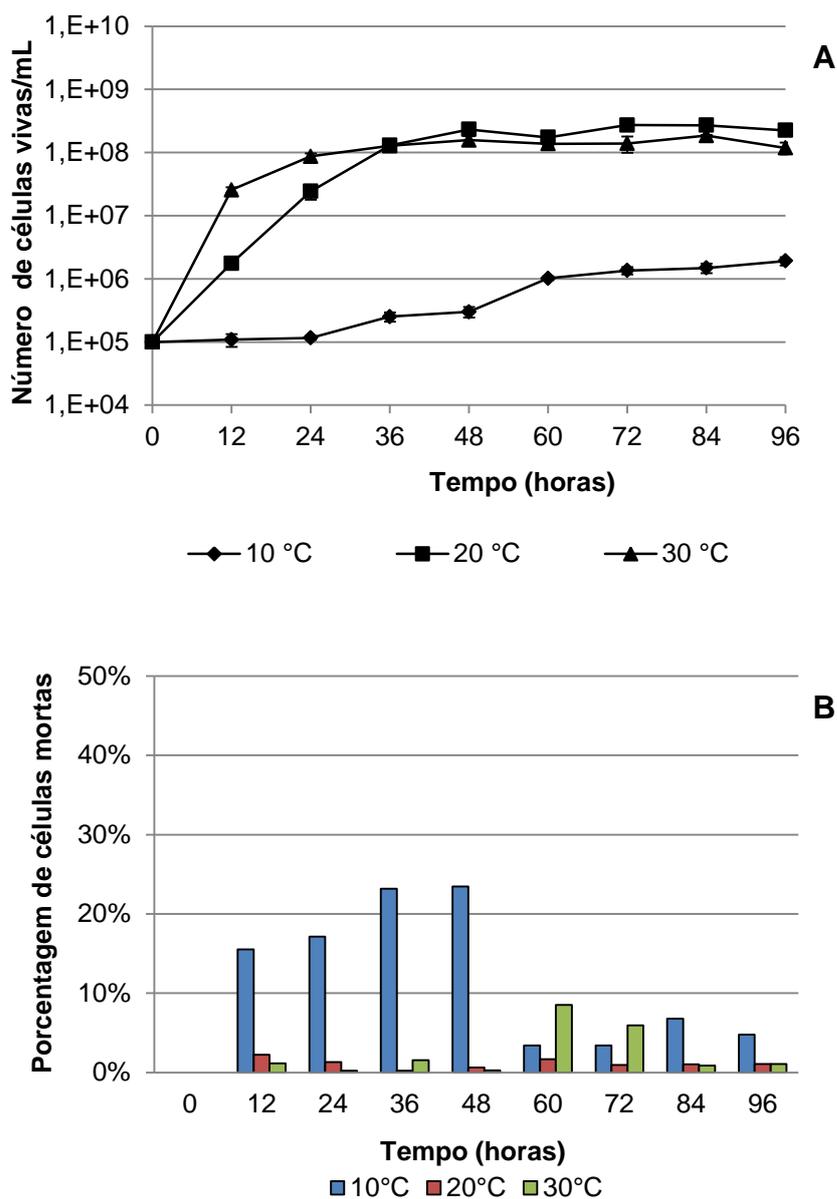


Figura 2. Cultivo de *T. asahii* (linhagem 3S44) em temperaturas de 10, 20 e 30 °C. **(A)** Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. **(B)** Porcentagem de células mortas.

Além de manter a sua viabilidade, é importante que os agentes de controle biológico também consigam manter a atividade de controle do fitopatógeno sob baixas temperaturas, as quais poderão ser expostos quando forem aplicados no ambiente ou estiverem em frutos armazenados. Trabalhos testando a tolerância a baixas temperaturas de leveduras com potencial antagonista vêm sendo realizados. O trabalho realizado por Robiglio et al. (2011) avaliou 75 culturas de leveduras, isoladas de peras na Patagônia, para controle de fungos patógenos nessa mesma

fruta armazenada a baixas temperaturas. Os autores realizaram um teste prévio “*in vitro*” em placas para avaliar o crescimento das linhagens em temperatura de $-1/0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura utilizada para armazenamento de frutas na Patagônia). Como resultado, 67% do total foram capazes de crescer nas temperaturas testadas, sendo que seis linhagens foram selecionadas para serem aplicadas em testes “*in vivo*” juntamente com os esporos de *Penicillium expansum* ou *Botrytis cinerea*. *Aureobasidium pululans* e *Rhodotorula mucilaginosa* reduziram a incidência de podridão por *P. expansum* para 33% e o diâmetro da lesão em 88% após 60 dias de incubação em temperaturas de $-1/0\text{ }^{\circ}\text{C}$, porém não apresentaram controle para *B. cinerea*.

Hu et al. (2015) também realizaram testes *in vivo* com objetivo de verificar a capacidade de leveduras isoladas de amostras de solo, coletadas no Tibete, contra o fungo *Penicillium expansum* em peras armazenadas em frigoríficos. As frutas foram feridas e inoculadas com uma suspensão de 1×10^8 células/mL de leveduras e 1×10^4 esporos/mL do fungo e incubadas a 4°C por 30 dias. A linhagem de *Rhodotorula mucilaginosa* YC1 apresentou o melhor resultado com somente 16% de incidência da doença, comparado a 100% do tratamento controle (sem presença da levedura).

Mesmo apresentando grande atividade antagonista, uma levedura pode ser inviabilizada de ser aplicada em pós-colheita se não resistir a baixas temperaturas, pois poderá perder sua viabilidade. Alguns trabalhos relatam que adição de trealose, um dissacarídeo, como fonte de carbono no meio de cultura, pode contribuir para o aumento da tolerância de micro-organismos a estresses como o de baixas temperaturas. O trabalho realizado por Li e Tian (2006), investigou os efeitos da trealose interna na viabilidade e eficácia de biocontrole da levedura *Cryptococcus laurentii* sob condições de baixa temperatura. O conteúdo de trealose foi aumentado na levedura pelo seu cultivo em meio suplementado a mesma. Como resultado, as células com alto nível de trealose interna obtiveram maior viabilidade, maior população e melhor eficácia de controle contra *Penicillium expansum* em frutos de maçã, se comparadas com aquelas cultivadas em meio de cultura sem adição do dissacarídeo. Uma das razões para o bom resultado pode estar relacionado à proteção eficaz da membrana plasmática pela trealose. Porém, seu uso não é prático e econômico, devido ao seu alto custo se comparado com a glicose. Como solução, é possível obter cepas contendo alto nível desse dissacarídeo por

manipulação genética ou fisiológica, com desempenho estável sob condições comerciais (LI; TIAN, 2006). Assim como a trealose, a prolina também é relatada na proteção de células de leveduras a baixas temperaturas (TAKAGI, 2008; HU et al., 2017).

Esse tipo de estratégia pode ser uma solução para melhorar a atividade e tolerância das linhagens testadas nesse trabalho, que embora ao final do cultivo a 10 °C tenham apresentado baixa mortalidade, as mesmas apresentaram pouco aumento populacional.

O teste realizado nesse trabalho foi preliminar, para observação de como as leveduras se comportam. Além dele, é de grande importância a realização de testes *in vivo*, assim como nos trabalhos discutidos acima. Este tipo de teste ajuda a compreender como a levedura se comportará não somente frente ao estresse de baixas temperaturas, mas também na presença do fungo *A. alternaria* no ambiente do fruto de tomate, simulando condições mais próximas da realidade que será enfrentada em sua atuação como agente de controle biológico.

4.1.2. Estresse osmótico

Em relação a células vivas de *T. globosa* (linhagem 5S55), todas as curvas dos tratamentos com NaCl (3, 6 e 9%) foram consideradas estatisticamente diferentes do grupo controle (Figura 3A). Isso mostra que em todos os tratamentos, as células sofreram com o estresse osmótico, apresentando um comportamento de crescimento diferente das células que não estavam sob essa condição. Com o aumento da concentração de NaCl, as leveduras se multiplicaram mais lentamente, influenciando a curva de crescimento, levando maior tempo para atingirem a fase estacionária. Ao final de 96 horas a concentração de leveduras foi de 3×10^8 , $2,7 \times 10^8$, 1×10^8 e $1,17 \times 10^7$ células/mL para controle, NaCl a 3, 6 e 9%, respectivamente. A mortalidade se mostrou maior com o aumento da concentração de NaCl, sendo que o tratamento com 9% foi o que obteve maiores valores, com 6,69% ao final de 96 horas, mas com pico de 8,3% em 60 horas (Figura 3B).

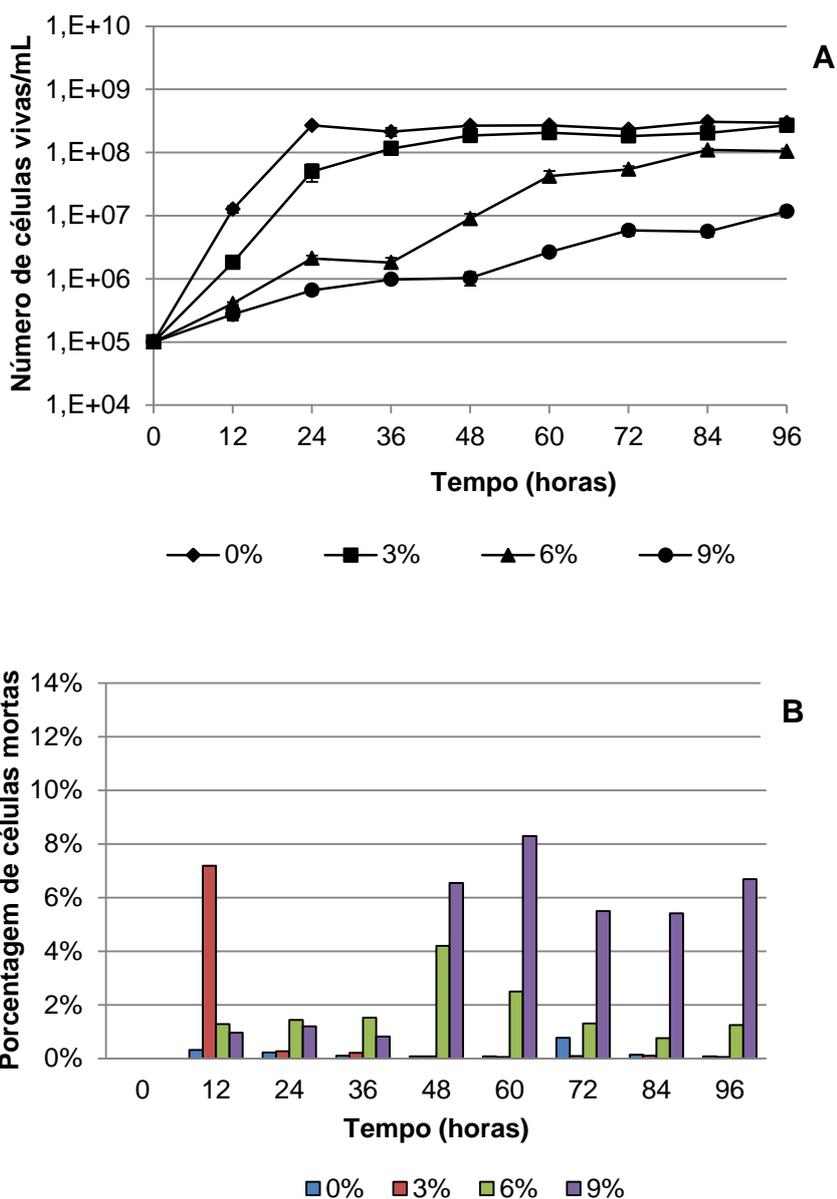


Figura 3. Cultivo de *T. globosa* (linhagem 5S55) em meio BD suplementado com 0, 3, 6 e 9% de NaCl. **(A)** Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. **(B)** Porcentagem de células mortas.

Em relação às curvas de células vivas de *T. asahii* (linhagem 3S44), todas foram estatisticamente diferentes do controle, exceto a do tratamento com 3% de NaCl (Figura 4A). Isso indica que a concentração de 3% foi a que menos sofreu influência do estresse osmótico em seu crescimento, inclusive ultrapassou o número de células do controle no último tempo (96 horas). Ao final de 96 horas a concentração de leveduras foi de $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $9,8 \times 10^7$ e $8,2 \times 10^7$ para controle, NaCl a 3, 6 e 9%, respectivamente. A mortalidade apresentou-se pequena para

todos os tratamentos. Seus picos foram atingidos nas concentrações de 6 e 9% com 9,8 e 13%, respectivamente em 12 horas, porém terminaram com as taxas entre 2 e 2,5 % em 96 horas (Figura 4B).

De um modo geral, as duas linhagens apresentaram bons resultados, porém *T. asahii* teve melhor desempenho na concentração de 9% de NaCl, condição de maior estresse, apresentando menor taxa de células mortas e maior número de células vivas ao final de 96 horas se comparada com *T. globosa*.

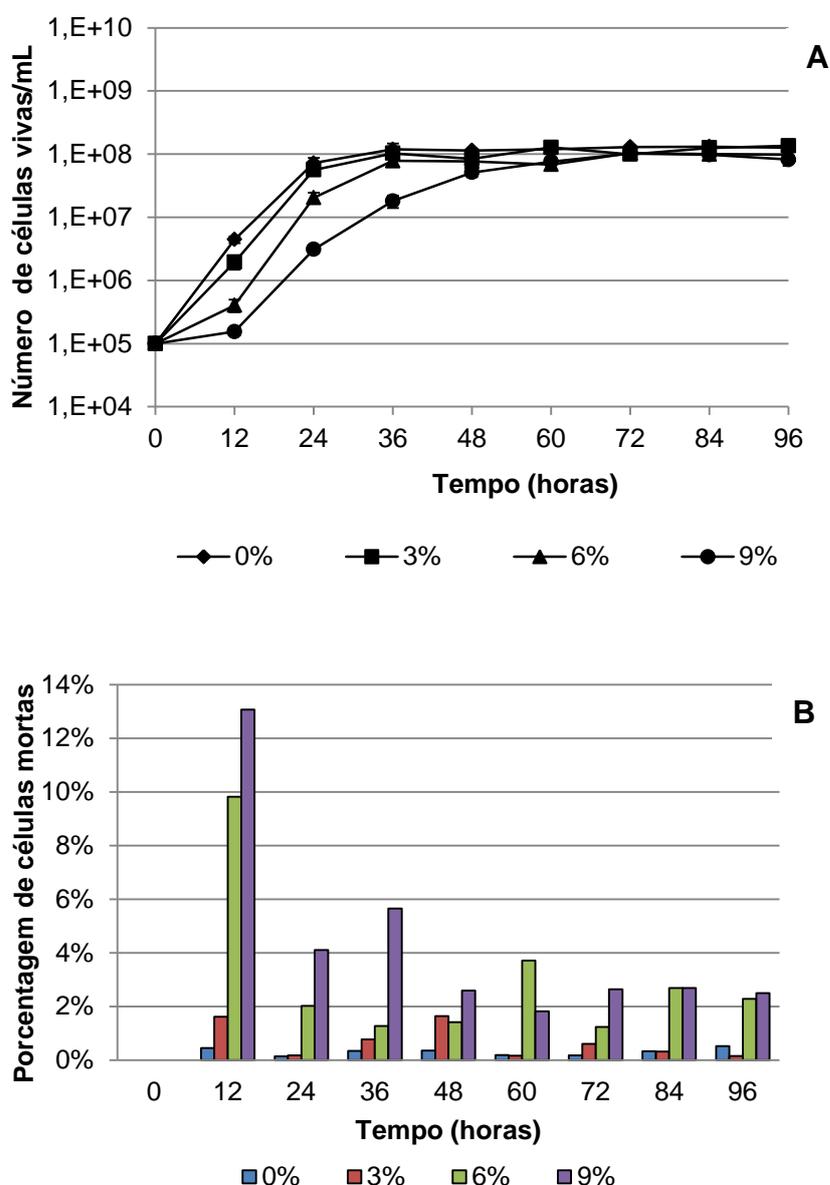


Figura 4. Cultivo de *T. asahii* (linhagem 3S44) em meio BD suplementado com 0, 3, 6 e 9% de NaCl. **(A)** Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. **(B)** Porcentagem de células mortas.

Diferente dos resultados deste trabalho, Abadias et al. (2000), reportaram grande sensibilidade da levedura antagonista *Candida sake* ao NaCl presente no meio de cultura. Os autores avaliaram o crescimento da linhagem sob efeito de diferentes valores de atividade de água (a_w) obtidos por meio da adição de NaCl. As porcentagens de NaCl (p/v) utilizadas foram de aproximadamente 3,5, 7,0 e 10,3% para modificação da a_w para 0,96, 0,94 e 0,92, respectivamente. Como resultado, o número de colônias diminuiu com o aumento do estresse. A fase estacionária permaneceu mais longa do que a obtida pelo controle. Enquanto este último atingiu-a em dois dias com aproximadamente 1200 ufc/mL, o tratamento com a adição de NaCl com $a_w = 0,96$ atingiu-a em 4 dias, com apenas 400 ufc/mL. Na menor a_w (0,92) a levedura não apresentou crescimento.

O aumento da atividade de biocontrole de uma levedura cultivada em meio alterado osmoticamente foi relatado por Teixidó et al. (1998). Os autores avaliaram *Candida sake* (linhagem CPA-1) cultivada em meio de cultura com adição de solutos orgânicos para alteração de a_w , resultando em um meio com baixo estresse osmótico. As células cultivadas em tal condição foram mais efetivas no controle da doença causada por *Penicillium expansum* em maçãs, do que aquelas cultivadas em meio sem adição dos solutos, com redução da infecção e do diâmetro das lesões em 75 e 90%, respectivamente. Além disso, foi observado aumento na dinâmica populacional das leveduras cultivadas sob o estresse. Esse é um exemplo de estratégia que poderia ser testada para a levedura *T. globosa* (linhagem 5S55), que embora não tenha apresentado grande mortalidade, teve crescimento prejudicado se comparado com o controle. Passar por um cultivo com baixo estresse osmótico pode torná-la mais efetiva e gerar um aumento de sua população em situações pouco favoráveis, como por exemplo, a baixa atividade de água que pode ser encontrada na prática.

4.1.3. Estresse oxidativo

Em relação às curvas de células vivas de *T. globosa* (linhagem 5S55), todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes do controle (Figura 5A). Ao final de 96 horas a concentração de leveduras foi de $2,37 \times 10^8$, $2,1 \times 10^5$, $1,78 \times 10^5$, $1,6 \times 10^5$ e $1,62 \times 10^5$ células/mL para controle, 10, 20, 30 e 40 mM de H_2O_2 , respectivamente. A mortalidade apresentou-se alta mesmo na concentração mais baixa de H_2O_2 , variando entre 77 e 81% para todos os tratamentos no tempo de 96 horas,

mostrando a grande sensibilidade da linhagem 5S55 em situações de estresse oxidativo (Figura 5B).

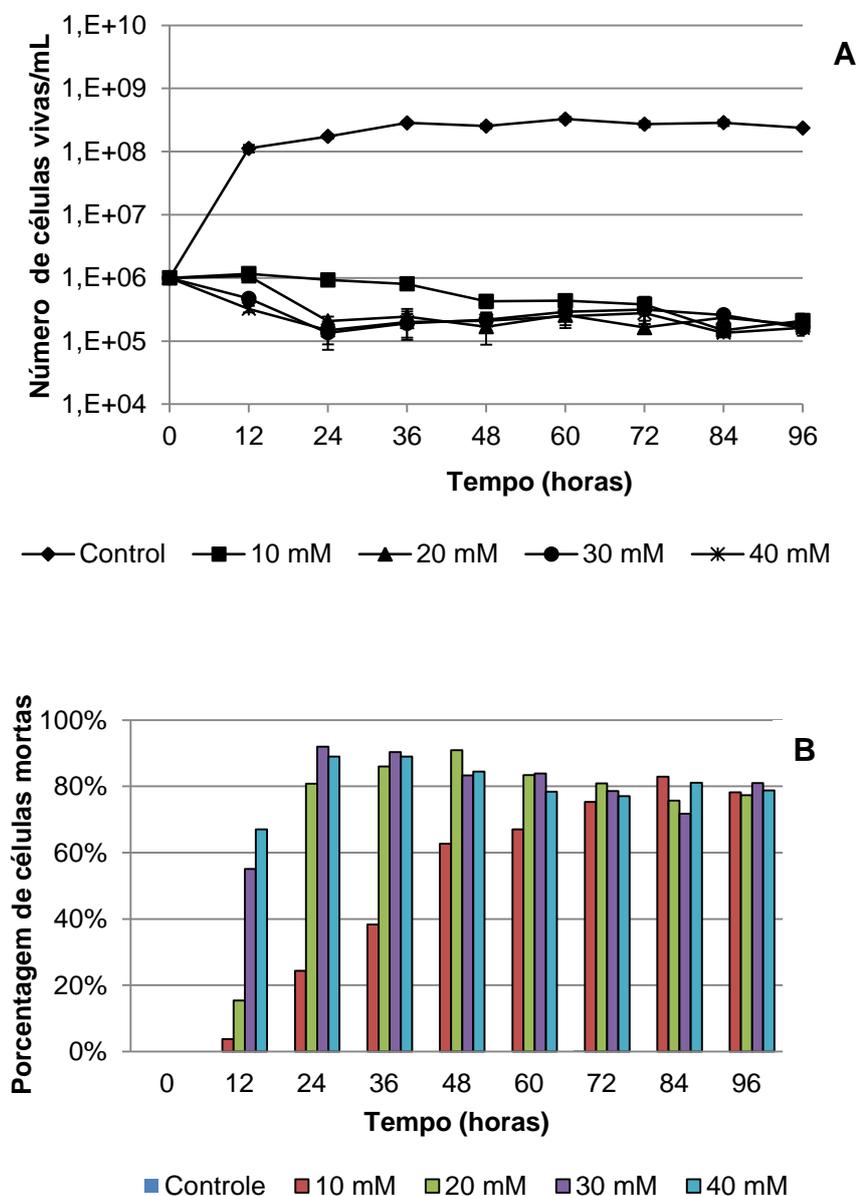


Figura 5. Cultivo de *T. globosa* (linhagem 5S55) em meio BD suplementado com 0, 10, 20, 30 e 40 mM de H₂O₂. **(A)** Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. **(B)** Porcentagem de células mortas.

Para *T. asahii* (linhagem 3S44) todos os tratamentos apresentaram curva de células vivas estatisticamente diferentes da do grupo controle (Figura 6A). Porém, diferente de *T. globosa*, as células de *T. asahii* apresentaram curvas crescentes. Ao final de 96 horas, a concentração de leveduras foi de $2,6 \times 10^8$, $1,94 \times 10^8$, $2,07 \times 10^8$,

2×10^8 e $1,79 \times 10^8$ células/mL para controle, 10, 20, 30 e 40 mM de H_2O_2 , respectivamente. A mortalidade apresentou-se baixa mesmo no tratamento com concentração de 40 mM de H_2O_2 . Nesse tratamento, embora a mortalidade tenha alcançado taxa de 14,35% em 36 horas, ao final de 96 horas a mesma apresentava-se abaixo de 1% (Figura 6B).

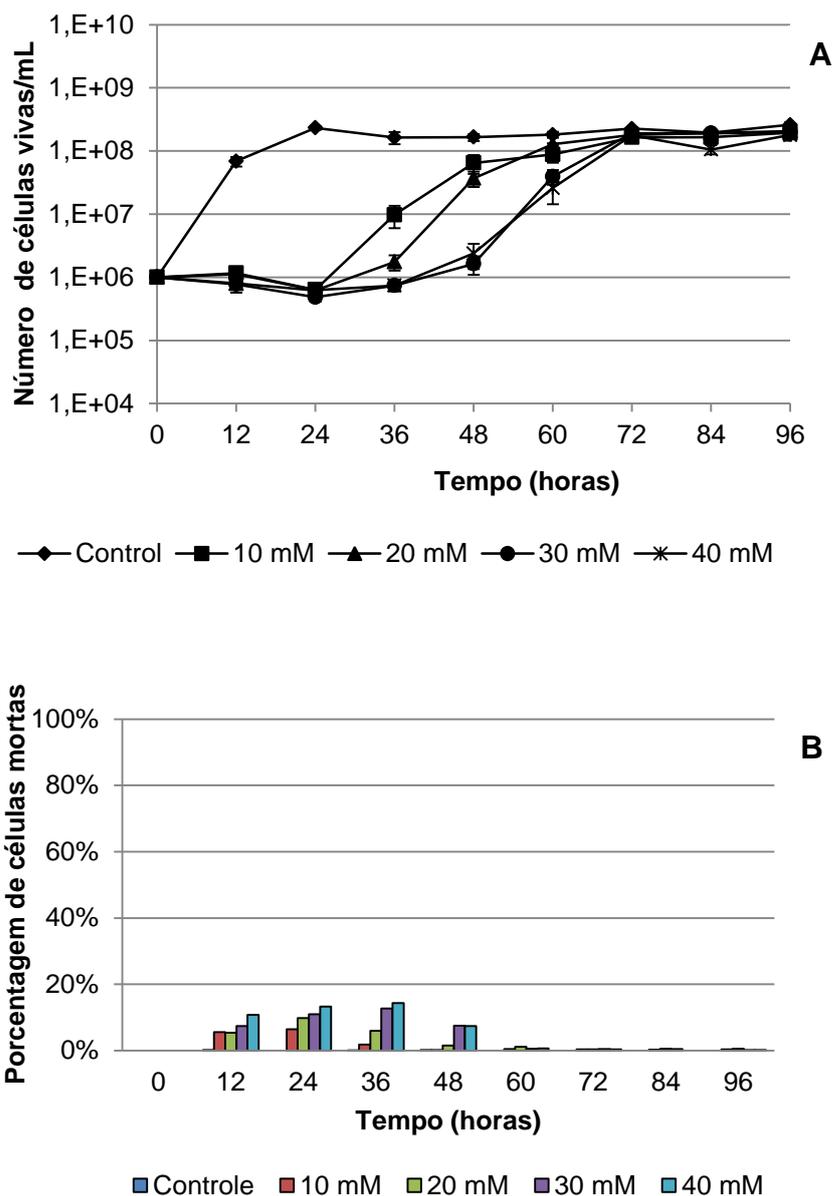


Figura 6. Cultivo de *T. asahii* (linhagem 3S44) em meio BD suplementado com 0, 10, 20, 30 e 40 mM de H_2O_2 . **(A)** Curva de crescimento das células vivas. Barras indicam erro padrão da média. **(B)** Porcentagem de células mortas.

Chen et al. (2015), tiveram resultados semelhantes aos obtidos para *T. globosa* nesse trabalho. Os autores avaliaram a sensibilidade da levedura *Rhodotorula glutinis* a H_2O_2 nas concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40 mM, as mesmas utilizadas nesse trabalho, com objetivo de investigar a tolerância da linhagem ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 . A viabilidade de *R. glutinis* diminuiu de forma dependente do tempo e da dose de H_2O_2 . A concentração de 30 mM foi moderadamente letal para as células (aproximadamente 50%). Os autores concluíram que o estresse oxidativo é a causa primária que leva a diminuir a eficácia do controle biológico de *R. glutinis* contra *P. expansum*, causador de podridão do mofo azul em frutos de pessegueiro. Resultados semelhantes também foram apresentados por Liu et al. (2012), testando a levedura *Candida oleophila* nas concentrações de 20, 50 e 100 mM de H_2O_2 , onde a viabilidade das células também diminuiu com o aumento da concentração de H_2O_2 ao longo do tempo.

Antes de atuar no controle de *A. alternata*, a levedura *T. globosa* precisa adquirir maior tolerância ao estresse oxidativo, para garantir sua viabilidade e eficiência quando aplicada em tomates. Nesse sentido, diferentes estratégias vêm sendo estudadas. Um exemplo é o trabalho citado anteriormente, realizado por Liu et al. (2012). Os autores realizaram um pré-tratamento de *Candida oleophila*, utilizando a dose subletal de 5 mM de H_2O_2 durante 30 minutos. Como resultado, a tolerância da levedura aumentou, passando a resistir a níveis de 50 mM H_2O_2 , que antes eram letais. Além disso, tais células exibiram melhor controle de infecções em maçãs causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, e maior dinâmica populacional em feridas na fruta. Outra estratégia que vem sendo relatada é a adição de algumas substâncias exógenas durante o cultivo, que podem melhorar a viabilidade e eficácia de leveduras na atividade de biocontrole sob estresse oxidativo, como por exemplo, glicina betaína (SUI et al., 2012) e ácido ascórbico (LI et al., 2014).

4.2. Resistência das leveduras a diferentes concentrações de fungicida a base de mancozebe

As leveduras foram sensíveis às concentrações de mancozebe testadas em placa e não apresentaram crescimento. Apenas o grupo controle, que não possuía o fungicida, apresentou crescimento de colônias (Figura 7).

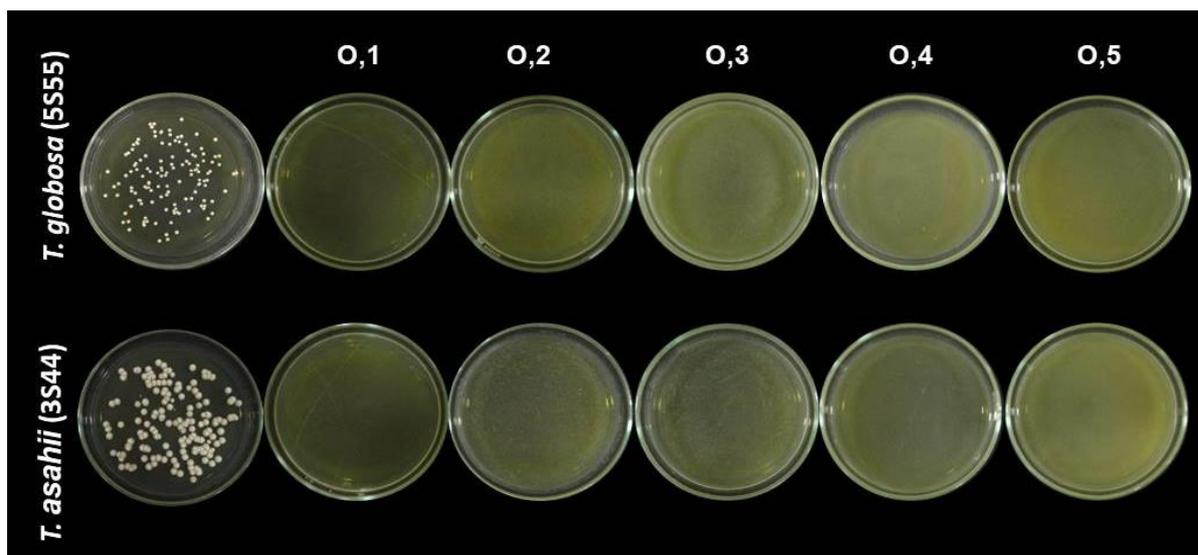


Figura 7. Placas com adição de diferentes concentrações do fungicida Manzate WG[®] (mg/mL) em meio YEPD após 48 horas de incubação a 30 °C.

No sistema AGROFIT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons), não há fungicidas registrados para o uso em tomate no controle de *Alternaria alternata*. Fungicidas a base de mancozebe são registrados no Brasil para controle de *Alternaria solani*, porém estes são indicados para controle de diversas espécies de fungos, incluindo *A. alternata* (GULLINO et al., 2010). O mancozebe pertence ao grupo dos fungicidas etileno-bisditiocarbamatos (EBDC) (CENGIZ; CERTEL, 2014). Sua natureza multissítio no modo de ação mostra atividade contra uma ampla gama de fungos, incluindo ascomicetos, oomicetos, basidiomicetos e fungos imperfeitos, agindo na inibição da germinação de esporos (GULLINO et al., 2010).

Lima et al. (2006), apresentaram resultados semelhantes aos desse trabalho, com leveduras que apresentaram baixa tolerância ao mancozebe. As linhagens de leveduras *Cryptococcus laurentii* (LS28), *Aureobasidium pullulans* (LS30), *Rhodotorula glutinis* (LS11) com elevada atividade antagônica contra vários patógenos fúngicos, foram cultivadas em meio com concentrações de mancozebe que variaram entre 0 a 1600 µg/mL. Todas se mostraram bastantes sensíveis ao fungicida com as concentrações mínimas inibitórias variando de 5 a 15 µg/mL.

A integração de fungicidas em baixas concentrações e micro-organismos antagonistas pode aumentar a eficácia do controle e também reduzir a quantidade usada desse tipo de produto químico. Há diversos trabalhos que testaram pequenas

quantidades destes aplicadas juntamente com leveduras ou fungos antagonistas e obtiveram resultados altamente efetivos no controle do patógeno, se comparados com o uso do micro-organismo sozinho, sendo muitas vezes superior àquele obtido pelo fungicida (CHAND-GOYAL; SPOTTS, 1996; BUCK, 2004; QIN; TIAN, 2004; LIMA et al., 2006; NALLATHAMBI et al., 2009).

Para as leveduras deste trabalho, é importante que concentrações menores do fungicida sejam testadas, já que ambas não cresceram em concentrações a partir de 0,1 mg/mL. Posteriormente, podem ser testadas para estratégias de manejo integrado com o fungicida, com objetivo de diminuir as quantidades usadas deste último.

Testes de resistência a fungicidas devem ser realizados mesmo quando o antagonista apresenta ótima atividade de controle de determinada doença pós-colheita e não há intenção de utilizá-lo em manejo integrado com fungicidas, isso porque, o micro-organismo pode se deparar com outros fungicidas utilizados para controle de outros patógenos que atacam a mesma cultura e que podem afetar a sua viabilidade.

5. Conclusões

Com os resultados deste trabalho foi possível observar que *T. asahii* (linhagem 3S44) se mostrou mais resistente às condições de estresses em relação a *T. globosa* (linhagem 5S55), o que pode ser uma vantagem em sua atuação no controle de *A. alternaria*. Mesmo com desempenho inferior, a levedura *T. globosa* também apresentou bons resultados, como boa tolerância a baixas temperaturas e condições de estresse osmótico, mostrando potencial para atuar em controle biológico pós-colheita. Já em relação ao fungicida Manzate WG[®], ambas se mostraram pouco resistentes, sendo necessários outros testes para estabelecimento na concentração mínima inibitória.

Novos testes são necessários, principalmente *in vivo*, para confirmar se os resultados mostrados nos ensaios *in vitro* se mantêm na interação das leveduras com o hospedeiro, nesse caso o tomate, e com patógeno *A. alternaria*. Também é interessante testar estratégias que possam favorecer a atuação das leveduras durante a atividade de biocontrole, como por exemplo, uso de pré-tratamentos e adição de substâncias exógenas no cultivo.

6. Literatura citada

ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I.; MAGAN, N. Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 1009-1017, 2000.

BUCK, J. W. Combinations of fungicides with phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 196-202, 2004.

CENGIZ, M. F.; CERTEL, M. Effects of chlorine, hydrogen peroxide, and ozone on the reduction of mancozeb residues on tomatoes. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, n. 3, p. 371-376, 2014.

CHAND-GOYAL, T.; SPOTTS, R. A. Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. **Biological Control**, v. 6, n. 2, p. 253-259, 1996.

CHEN, J.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. Mechanism of H₂O₂-induced oxidative stress regulating viability and biocontrol ability of *Rhodotorula glutinis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 152-158, 2015.

GULLINO, M. L.; TINIVELLA, F.; GARIBALDI, A.; KEMMITT, G.M.; BACCI, L.; SHEPPARD, B. Mancozeb: past, present, and future. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1076-1087, 2010.

HU, H.; WISNIEWSKI, M. E.; ABDELFAH, A.; ZHENG, X. Biocontrol activity of a cold-adapted yeast from Tibet against gray mold in cherry tomato and its action mechanism. **Extremophiles**, v. 21, n. 4, p. 789-803, 2017.

HU, H.; YAN, F.; WILSON, C.; SHEN, Q.; ZHENG, X. The ability of a cold-adapted *Rhodotorula mucilaginosa* strain from Tibet to control blue mold in pear fruit. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 6, p. 1391-1404, 2015.

LI, B. Q.; TIAN, S. P. Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 854-861, 2006.

LI, C.; ZHANG, H.; YANG, Q.; KOMLA, M. G.; ZHANG, X.; ZHU, S. Ascorbic acid enhances oxidative stress tolerance and biological control efficacy of *Pichia caribbica* against postharvest blue mold decay of apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 30, p. 7612-7621, 2014.

LIMA, G.; DE CURTIS, F.; PIEDIMONTE, D.; SPINA, A. M.; DE CICCIO, V. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, n. 3, p. 301-307, 2006.

LIU, J.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; NORELLI, J.; HERSHKOVITZ, V.; TIAN, S.; FARRELL, R. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 578-590, 2012.

MACARISIN, D.; COHEN, L.; EICK, A.; RAFAEL, G.; BELAUSOV, E.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. **Phytopathology**, v. 97, n. 11, p. 1491-1500, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Consulta de Produtos Formulados. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 30 junho de 2018.

NALLATHAMBI, P.; UMAMAHESWARI, C.; THAKORE, B. B. L.; MORE, T. A. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. **Crop Protection**, v. 28, n. 6, p. 525-532, 2009.

NOGUCHI, K., GEL, Y. R., BRUNNER, E., KONIETSCHKE, F. nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. **Journal of Statistical Software**, v. 50, n. 12, 2012.

QIN, G. Z.; TIAN, S. P. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low dosage of fungicides under different storage conditions. **Plant Disease**, v. 88, n. 5, p. 497-501, 2004.

ROBIGLIO, A.; SOSA, M. C.; LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 211-216, 2011.

SUI, Y.; LIU, J.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; NORELLI, J.; HERSHKOVITZ, V. Pretreatment of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, with glycine betaine increases oxidative stress tolerance in the microenvironment of apple wounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 45-51, 2012.

SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, J. Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 9, p. 2968-2975, 2015.

TAKAGI, H. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 211 - 223, 2008.

TEIXIDO, N.; USALL, J.; VINAS, I. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 203-210, 1999.

TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I.; USALL, J.; MAGAN, N. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. **Phytopathology**, v. 88, n. 9, p. 960-964, 1998.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; GONZÁLEZ, M. B.; BENTANCUR, O.; WISNIEWSKI, M. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 2, p. 189-199, 2013.

CAPÍTULO 3. Avaliação de formulações na aderência das leveduras e no controle de *Alternaria alternata* em tomates

1. Resumo

Para que micro-organismos agentes de controle biológico tenham sucesso em condições práticas e comerciais, devem se manter viáveis e aderidos aos frutos quando aplicados, de modo que consigam manter boa atividade de controle do fungo fitopatígeno. Este trabalho teve como objetivo avaliar formulações com amido de milho ou gelatina, ambos a 2%, como veículos na aderência das leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44) na superfície de tomates e, posteriormente, no controle do fungo *Alternaria alternata*. Para avaliação da aderência, as formulações foram preparadas com as leveduras na concentração de 1×10^8 células/mL. Após incubação por 48 horas a 25 °C foram retiradas duas porções de 1 g em cada fruto e realizado plaqueamento para contagem de UFC (unidades formadoras de colônias) para determinar a presença de células viáveis das leveduras no fruto. A formulação com melhor resultado foi testada em tomates com lesões artificiais que receberam 20 µL de solução de *A. alternata* com 1×10^5 esporos/mL. O diâmetro (cm) e a presença de micélio e esporos na podridão foram avaliados. Foram recuperadas $6,49 \times 10^2$ ufc/g de tomate no tratamento controle com 5S55, enquanto que com a adição de gelatina e amido de milho, esse número aumentou para $1,30 \times 10^4$ e $1,74 \times 10^5$ ufc/g de tomate, respectivamente. Para 3S44, o controle apresentou $3,81 \times 10^3$ ufc/g de tomate, enquanto que com os veículos na formulação, houve um aumento para $3,14 \times 10^5$ e $1,07 \times 10^6$ ufc/g de tomate com

gelatina e o amido de milho, respectivamente. Dessa forma, o tratamento com amido mostrou melhor resultado e foi utilizado no teste posterior para controle de *A. alternata*. Neste último, a média dos diâmetros da podridão no controle foi de 2,75 cm e na presença das leveduras caiu para 2,32 e 1,58 cm para *T. globosa* e *T. asahii*, respectivamente. Além disso, houve redução na quantidade de micélio e esporos presentes nas lesões. Como conclusão, apesar da formulação com as leveduras mostrar melhor adesão nos tomates e apresentar uma leve inibição do fungo no teste *in vivo*, que pode ser eficaz para prevenir o desenvolvimento da doença, novas fórmulas devem ser testadas para verificar se resultados mais eficazes podem ser alcançados.

2. Introdução

Nas últimas décadas houve um crescimento no número de trabalhos científicos que utilizam leveduras antagonistas para controle biológico de doenças pós-colheita, mas apenas uma pequena parcela das espécies chega ao mercado como produto. Na maioria dos casos, isso se deve à inconsistência e baixo desempenho desses micro-organismos em condições comerciais (SPADARO; DROBY, 2016). Para que as leveduras tenham sucesso é necessário que se mostrem eficientes em tais condições, o que depende grandemente de sua formulação, que deve atender a certos critérios, como por exemplo, manter a eficácia do controle em escala comercial e manter as populações celulares viáveis com prolongamento de seu prazo de validade (DUKARE et al., 2018).

Revestimentos comestíveis têm mostrado boa atividade como veículos para o transporte de micro-organismos vivos, possibilitando melhora, por exemplo, na viabilidade das células durante o tempo de armazenamento (GUIMARÃES et al., 2018). Sendo assim, esses revestimentos, em conjunto com os micro-organismos agentes de controle biológico, podem ser uma alternativa de formulação. Seus constituintes podem ajudar a manter os micro-organismos vivos, agir como nutrientes e favorecer sua adesão ao fruto (MARÍN et al., 2016; MARÍN et al., 2017). Esse tipo de formulação em combinação com leveduras agentes de controle biológico tem sido relatada em diversos trabalhos (FAN et al., 2009; ALOUI et al., 2015; PARAFATI et al., 2016; GONZÁLEZ-ESTRADA et al., 2017).

Os revestimentos comestíveis podem ser feitos a partir de uma variedade de materiais, como por exemplo, polissacarídeos e proteínas. Os polissacarídeos de

maior interesse nesse processo são os amidos, celuloses, gomas e quitosana, e as proteínas são gelatina, proteína do soro de leite, caseína, colágeno, queratina, glúten de trigo, proteína de soja, proteína do amendoim, zeína de milho e proteína da semente de algodão (DHALL, 2013).

Considerando a importância da formulação adequada para a aplicação de micro-organismos agentes de controle biológico em condições reais e comerciais, os objetivos deste trabalho foram (1) avaliar a aderência das linhagens de leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44) na superfície de tomates utilizando-se formulações a base de amido de milho (2%) e gelatina (2%) e (2) avaliar a formulação com melhor resultado de aderência em combinação com as leveduras para controle do fungo *Alternaria alternata*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Micro-organismos

Foram avaliados 2 isolados de levedura identificados como *Trichosporon asahii* (linhagem 3S44) e *Torulaspota globosa* (linhagem 5S55), obtidos da rizosfera de milho e de cana-de-açúcar (variedade RB867515), respectivamente, em área do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos *campus* Araras-SP (latitude: 22° 21' 25" S e longitude: 47° 23' 03" W, altitude de 629 m). Essas linhagens foram selecionadas, dentre mais de 300 isolados, como eficientes no controle de fungos, incluindo *Alternaria alternata*, em ensaios preliminares *in vitro* (dados não publicados). Foram identificadas por meio de sequenciamento da região D1/D2 – 28S do rDNA com o uso dos primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As linhagens foram mantidas em meio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose; composição: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose; 2% ágar) em tubo de ensaio com meio inclinado com glicerol 0,5 % para sua conservação até o início dos testes.

O fungo *Alternaria alternata* foi isolado de lesões na superfície de tomates com sintomas de podridão e, posteriormente, testado em relação à sua patogenicidade através da inoculação de esporos em tomates saudáveis. Foi mantido em BDA (Batata Dextrose Ágar; 39g/L de meio comercial). Os esporos utilizados nos experimentos foram removidos de culturas em fase de esporulação,

após 14 dias de cultivo. A remoção foi realizada com a raspagem dos esporos com alça de platina estéril, e estes foram suspensos em solução de água destilada com 0,05% (v/v) Tween 20, de acordo com Zhao et al. (2008), com modificações. O ajuste de concentração foi realizado em câmara de Neubauer a 1×10^5 esporos/mL.

3.2. Tomates

Os tomates (*Solanum lycopersicum* L.) utilizados nos ensaios foram obtidos de uma produção orgânica no município de Cordeirópolis/SP apresentando maturidade comercial com tamanhos uniformes e livres de lesões e podridões. Para os experimentos, foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e álcool 70%, sendo posteriormente lavados com água destilada estéril. Após desinfecção, os frutos foram artificialmente feridos (3 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade), sendo removida a porção de tecido.

3.3. Avaliação de formulações na aderência das leveduras na superfície de tomates

O experimento foi realizado de acordo com Lima et al. (2014) e Marín et al. (2016), com modificações. As leveduras foram cultivadas em YEPD líquido, incubadas durante 24 horas a 25 °C. Antes de serem utilizadas, foram centrifugadas a 3600 rpm durante 5 minutos, lavadas com água destilada estéril duas vezes e ressuspensas nas formulações, alcançando uma concentração final de 1×10^8 células/mL. A formulação foi preparada com solução salina (0,85%), tween 80 a 0,01% (v/v) e gelatina comercial ou amido de milho comercial a 2% (p/v), que foram utilizados como veículos para as leveduras. Os tomates foram desinfetados de acordo com o item 3.2. Depois de desinfetados, foram mergulhados na formulação com a levedura, secos a temperatura ambiente e incubados a 25 °C por 48 horas. Após incubação, foram retiradas duas porções de cada tomate, em locais opostos no fruto, com aproximadamente 1g e área superficial de $3,14 \text{ cm}^2$. Cada porção foi adicionada em um erlen com volume de 50 mL com 9 mL de solução salina com adição de 1% de tween, constituindo a diluição -1. Antes de prosseguir com as diluições, o erlen foi agitado por 150 rpm durante 10 minutos, para permitir que as células se soltassem da superfície do fruto. As diluições foram plaqueadas em triplicata e incubadas a 30°C por 48 horas, e o número de colônias foi verificado. Cada tratamento foi realizado com 5 frutos, totalizando 10 porções de tomates. Para

o controle, os frutos foram imersos na formulação com as leveduras, mas sem adição dos veículos. O resultado foi dado em UFC/g de tomate.

3.4. Avaliação do controle de *Alternaria alternata* em tomates por formulação contendo a levedura

No presente experimento utilizou-se a formulação de amido de milho a 2% com as leveduras, pois foi a que apresentou melhor resultado no teste anterior. Os tomates foram desinfetados e feridos de acordo com o item 3.2. Depois foram imersos na formulação e secos durante 30 minutos. Após secagem, 20 µL de uma suspensão de *Alternaria alternata* com concentração de 1×10^5 esporos/mL foram inoculados em cada lesão. O tratamento controle foi realizado da mesma forma, porém sem a presença das leveduras na formulação com amido. Os frutos foram incubados a 25°C por 7 dias em bandejas plásticas, tampadas. Para controle da umidade, as caixas possuíam dois montes de gaze umedecidos com 25 mL de água destilada estéril em cada. Os tratamentos foram realizados em triplicata, sendo cada replicata constituída por 10 frutos, e cada fruto contendo três feridas (total de 30 feridas por replicata). Após o período de incubação foi determinado o diâmetro da podridão em cada lesão. Além disso, características como a presença de micélio e de esporos nas lesões com podridão foram avaliadas, conforme descrito no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1. Categorias para a descrição da podridão desenvolvida nas lesões quanto à presença de micélio e esporos.

ESTRUTURA	CATEGORIAS	DESCRIÇÃO
Micélio	0	Micélio não visível
	1	Pequena a média quantidade de micélio
	2	Grande quantidade de micélio
Esporos	0	Esporos não visíveis
	1	Pequena a média quantidade de esporos
	2	Grande quantidade de esporos

3.5. Análise estatística

Os dados obtidos nos testes foram avaliados via ANOVA one-way. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade dos dados foram verificados pelos

testes de Shapiro-wilk e Bartlett, respectivamente. A transformação logarítmica $\log(x)$ foi aplicada para atender aos pressupostos, para o teste do item 3.3. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% (item 3.3.) e Skott-knott (item 3.4.) utilizando o software R v.3.3.3 (R CORE TEAM, 2017).

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação de formulações na aderência das leveduras na superfície de tomates

Neste teste observou-se que tanto a utilização de amido quanto de gelatina como veículos, ambos na concentração de 2%, melhoraram a aderência das células das leveduras *T. globosa* (5S55) e *T. asahii* (3S44) na superfície do tomate. Após 48 horas de incubação, no tratamento controle para a linhagem 5S55 foram recuperados $6,49 \times 10^2$ UFC/g de tomate, enquanto que esse número foi de $1,30 \times 10^4$ e $1,74 \times 10^5$ UFC/g de tomate, para os tratamentos com 2% de gelatina e 2% de amido, respectivamente (Figura 1A). Esses dois últimos tratamentos diferiram estatisticamente do controle e, embora o tratamento com amido tenha permitido a fixação de um número maior do que o tratamento com gelatina, eles não diferiram estatisticamente. Para a linhagem 3S44, no tratamento controle foram recuperados $3,81 \times 10^3$ UFC/g de tomate, enquanto que esse número foi de $3,14 \times 10^5$ UFC/g de tomate para o tratamento com 2% de gelatina e $1,07 \times 10^6$ UFC/g de tomate para e 2% de amido. Nesse caso, os três tratamentos foram estatisticamente diferentes (Figura 1B).

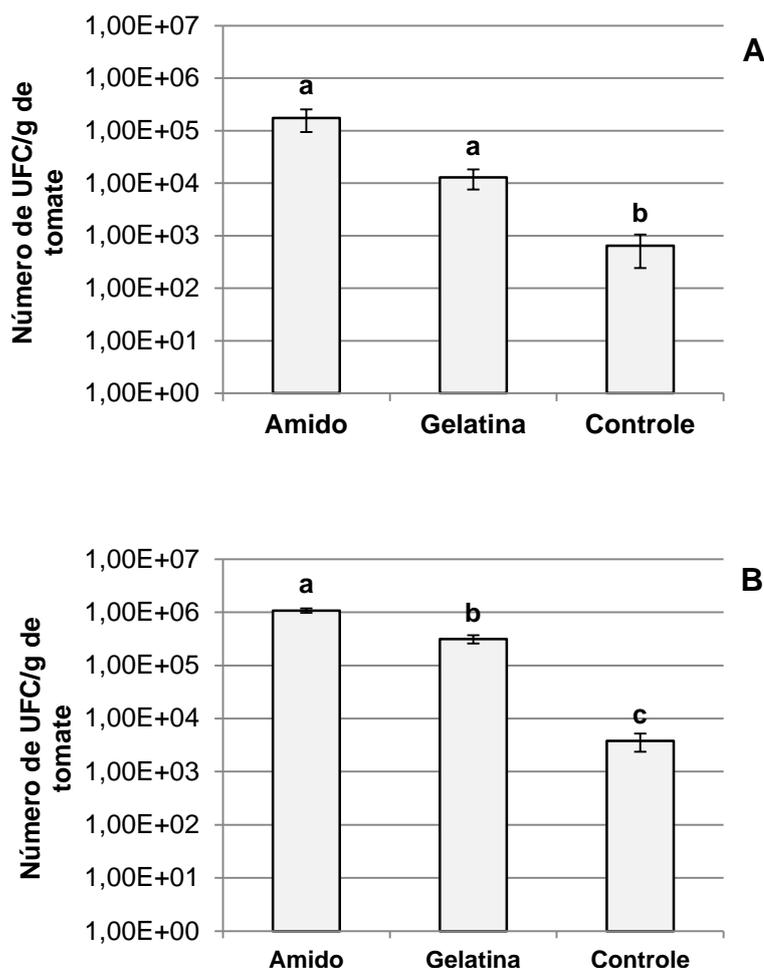


Figura 1. Número de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate), em formulação com amido de milho ou gelatina a 2%, recuperadas da superfície do tomate após incubação a 30 °C durante 48 horas. **(A)** Formulação com *T. globosa* (5S55) e com **(B)** *T. asahii* (3S44). Tratamentos com letras diferentes são significativamente diferentes a 5% pelo teste de Tukey. Barras indicam erro padrão da média.

Diante dos resultados apresentados, pode-se observar uma ação mais efetiva por parte da formulação que utilizou o amido como veículo, para as duas linhagens de leveduras. Além disso, todos os tratamentos de *T. asahii* (3S44), inclusive o controle, apresentaram resultados melhores, sendo que o tratamento com gelatina chegou a apresentar um ciclo log a mais que em *T. globosa* (5S55), o que pode gerar melhor eficácia da levedura no momento de sua aplicação como agente de controle biológico. Embora *T. asahii* (3S44) tenha apresentado, de modo geral, um

resultado melhor, a eficácia das duas formulações foi semelhante para as duas leveduras.

O fato de *T. asahii* ter mostrado melhores resultados pode ter ocorrido devido à capacidade da linhagem em formar biofilme, como relatado no item 4.3 do capítulo 1 deste trabalho. O biofilme pode contribuir para melhores resultados nesse caso, porque a matriz extracelular que embebe suas células é formada por um agregado de polímeros responsáveis pela sua arquitetura tridimensional, que permite a sua adesão e coesão a superfícies (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Assim como o resultado do presente teste, o trabalho de Marín et al. (2016) também apresentou um maior número da levedura *Candida sake* em formulação com amido quando comparado com grupo controle. O trabalho testou diversas formulações da levedura *C. sake*, conhecida por ser um agente de controle biológico, contendo diferentes polímeros de revestimento, sendo um deles o amido de milho (2%), com o objetivo de controlar o fungo *Botrytis cinerea* em uvas. No teste de dinâmica populacional, após 24 horas de incubação o número de leveduras em tratamento com amido de milho a 2% foi significativamente maior que o do grupo controle.

O trabalho de Lima et al. (2014), testou diferentes veículos, entre eles amido e a gelatina, ambos a 2%, para formulações com as leveduras *Wickerhamomyces anomalus* (linhagem 422) e *Meyerozyma guilliermondii* (linhagem 443) no controle de antracnose em mamões. Um dos aspectos avaliados foi a distribuição superficial do antagonista nos frutos utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, após 24 horas da aplicação da formulação. Como resultado, tanto a formulação com amido quanto a com gelatina, mostraram bons resultados de adesão das células.

A adesão da levedura após a etapa de aplicação é importante para garantir a sua colonização na superfície do fruto e o efetivo controle da doença. O resultado desse trabalho e dos outros citados, mostra a eficiência desse tipo de formulação que usa os biopolímeros gelatina e amido como veículos para antagonistas microbianos. Além disso, formulações com revestimentos comestíveis, podem ser consumidas, pois são formados por produtos naturais e biodegradáveis.

4.2. Avaliação do controle de *Alternaria alternata* em tomates por formulação contendo a levedura

A formulação com amido de milho foi utilizada no teste para controle do fungo *A. alternata* porque apresentou melhores resultados no teste do item 3.3. Como resultado do presente teste, a média do diâmetro das lesões nos tomates infectados com *A. alternata* para o tratamento controle foi de 2,75 cm. Para o tratamento com *T. globosa* (5S55) a média foi de 2,32 cm, representando uma inibição de 15,7% em relação ao controle. Para o tratamento com *T. asahii* (3S44), a média foi de 1,58 cm, com aproximadamente 42,5 % de inibição (Figuras 2, 3 e 4). Ambos os tratamentos com as duas leveduras foram estatisticamente diferentes do controle. Além disso, em relação ao controle, os tratamentos com as leveduras apresentaram um maior número de lesões com micélio na categoria 1, caracterizada por uma pequena a média quantidade deste e, conseqüentemente, uma diminuição de lesões na categoria 2, caracterizada pela presença de grande quantidade de micélio (Figura 5A).

Em relação à presença de esporos, no tratamento com as leveduras também ocorreu maior número de lesões na categoria 1 (presença de pequena a média quantidade de esporos) e categoria 0 (ausência de esporos visíveis), com menor número de lesões na categoria 2 (grande quantidade de esporos), em comparação com o controle (Figura 5B). O aumento de lesões na categoria 1 e a diminuição de lesões na categoria 2, mostra que o tratamento com as leveduras na formulação com amido foi capaz de afetar o desenvolvimento micelial e de esporos, o que pode contribuir para o controle da podridão.

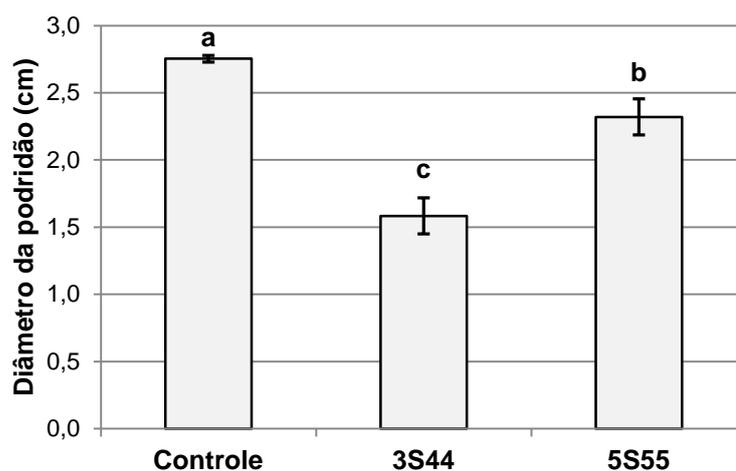


Figura 2. Diâmetro da podridão causada por *A. alternata*, em frutos tratados com formulação de amido de milho a 2%, incubados durante 7 dias a 25 °C. Tratamentos com letras diferentes são significativamente diferentes a 5% pelo teste Skott-Knott. Barras indicam erro padrão da média.

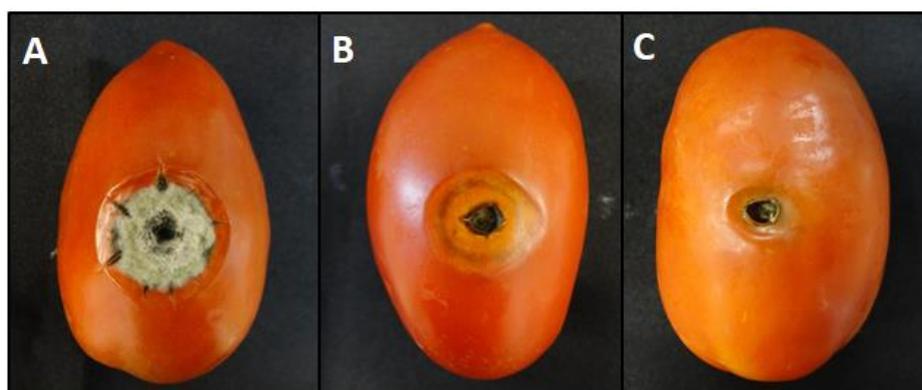


Figura 3. Podridão em lesões nos tomates revestidos com formulação de amido de milho a 2%, provocadas por *A. alternata* após incubação durante 7 dias a 25 °C. Os tomates estão representando (A) tratamento controle, (B) tratamento com *T. globosa* (5S55) e (C) tratamento com *T. asahii* (3S44).



Figura 4. Visão geral da replicata de tomates revestidos com formulação de amido de milho a 2%, provocadas por *A. alternata* após incubação durante 7 dias a 25 °C. **(A)** Tratamento controle. **(B)** Tratamento com *T. globosa* (5S55). **(C)** Tratamento com *T. asahii* (3S44).

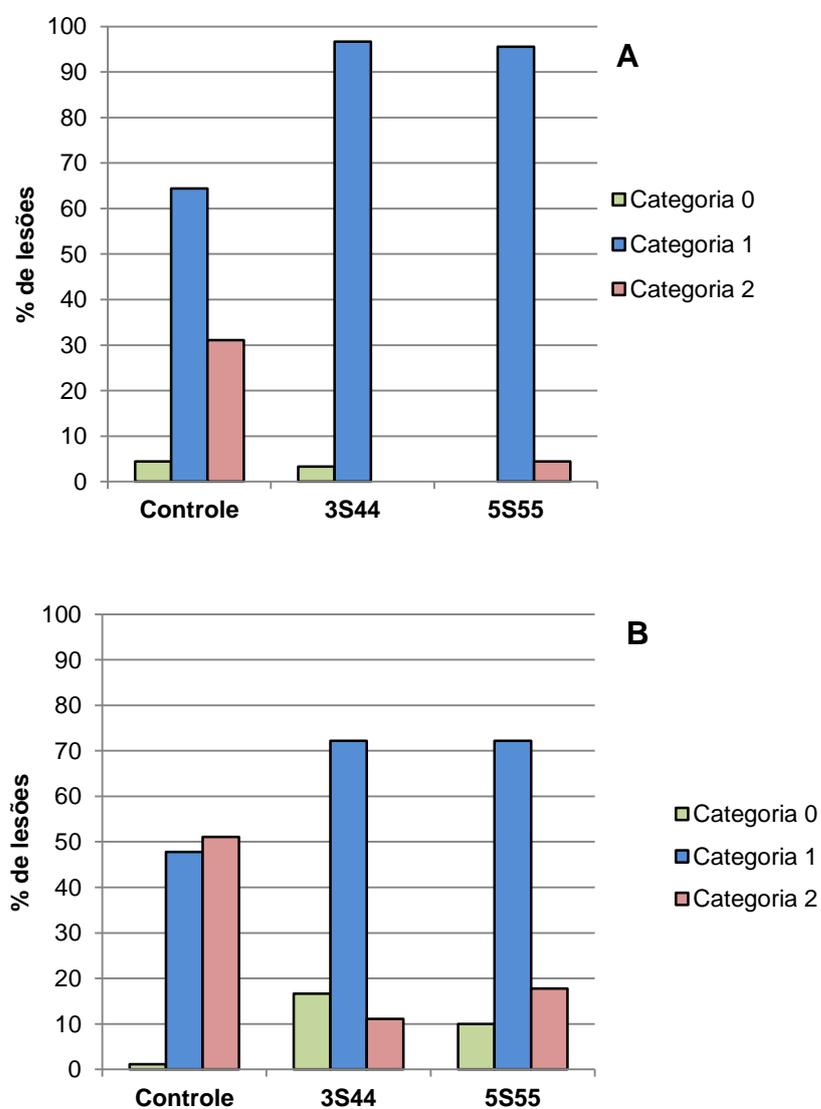


Figura 5. Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de **(A)** micélio e **(B)** esporos.

A inibição do fitopatógeno utilizando-se leveduras em formulações contendo amido também foi relatada por Marín et al. (2016). Em seu trabalho, uma formulação contendo amido de milho a 2% com adição de tween 85 (relação massa de amido: surfactante de 1: 0,1) em conjunto com a levedura *Candida sake*, foi efetiva e teve uma redução de mais de 80% na incidência do fungo *Botrytis cinerea* em uvas em relação ao controle (sem amido e sem levedura) que teve uma incidência de 86% em 7 dias de incubação.

Em trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa por Bizarria Júnior (2016), a levedura *T. globosa* (5S55) foi aplicada diretamente em lesões artificiais nos tomates, sem adição de nenhum veículo, com concentração de 1×10^8 células/mL, e a inibição do diâmetro da podridão causada por *A. alternata* foi de 35,5%, comparado com o controle em 7 dias de incubação. Nas mesmas condições, *T. asahii* (3S44) apresentou 74% de inibição no diâmetro da podridão (BOSQUEIRO, 2016). No teste atual, houve uma queda da inibição do fungo quando comparado com os resultados citados anteriormente. Isso pode ter ocorrido porque a formulação pode não ter sido completamente eficaz, e no processo de imersão do fruto e, posteriormente, no de secagem, pode ter ocorrido perda de células pela não adesão na superfície do mesmo. Além disso, nos trabalhos citados as leveduras e a solução de esporos foram aplicadas diretamente na lesão, o que pode ter favorecido um melhor resultado. O processo de mergulhar os frutos na formulação, pode não garantir a mesma quantidade de células nas lesões, contribuindo para uma inibição inferior.

Embora a formulação tenha proporcionado uma maior aderência de células em comparação com o controle no teste anterior (item 4.1), não foi possível ter conhecimento da eficiência da formulação, ou seja, se a taxa de células aderidas foi baixa em relação ao número inicial aplicado no momento da imersão. O valor de células recuperadas foi de $1,07 \times 10^6$ e $1,74 \times 10^5$ UFC/g de tomate para 3S44 e 5S55, respectivamente. Esse número de células pode ter sido baixo para proporcionar um controle mais eficiente do fungo. Nesse caso, o uso de uma suspensão com maior concentração das mesmas pode favorecer um melhor resultado.

Outro fato observado é que no teste anterior (item 4.1), o número de células da linhagem 3S44 que permaneceram viáveis na superfície do tomate foi maior em comparação com a linhagem 5S55. Esse resultado confirmou-se no atual teste com

a exibição de melhor atividade no controle da podridão por parte dessa linhagem. A maior eficiência da formulação para esta linhagem pode estar relacionada a um maior número de células na superfície e, conseqüentemente, um melhor controle da podridão.

5. Conclusões

As formulações contendo amido de milho e gelatina a 2%, conhecidos por serem utilizados como revestimentos comestíveis, mostraram bons resultados na aderência das leveduras *T. globosa* (5S55) e *T. asahii* (3S44) na superfície dos tomates, evidenciando a importância desses veículos em tal ação. Em relação a inibição do fungo *A. alternata* em tomates, houve redução no diâmetro da podridão quando os frutos foram tratados com a formulação contendo amido a 2% e leveduras na concentração de 1×10^8 células/mL. Apesar das formulações apresentarem resultados positivos, a inibição não chegou a 50%. Dessa forma, outros testes com diferentes veículos, modos de aplicação e maiores concentrações de células, podem ser realizados com objetivo de proporcionar maior controle de *A. alternata* por parte das leveduras.

Além dos testes realizados neste trabalho, para aderência e controle do fungo, outros aspectos devem ser estudados para obtenção de uma formulação comercial, como por exemplo, a viabilidade das leveduras ao longo do tempo, bem como características físicas, textura e aparência nos frutos.

6. Literatura citada

ALLOUI, 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.

BIZARRIA JÚNIOR, R. **Potencial de *Torulaspora globosa* e *Rhodotorula mucilaginosa* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata* em tomate**. 2016. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

BOSQUEIRO, A. S. **Potencial de *Meyerozyma guilliermondii* e *Trichosporon asahii* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata* em tomate**. 2016. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

DHALL, R. K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 435-450, 2013.

DUKARE, A. S.; PAUL, S.; NAMBI, V. E.; GUPTA, R. K.; SINGH, R.; SHARMA, K.; VISHWAKARMA, R. K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-16, 2018.

FAN, Y.; XU, Y.; WANG, D.; ZHANG, L.; SUN, J.; SUN, L.; ZHANG, B. Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria x ananassa*) preservation quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, n. 1-2, p. 84-90, 2009.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

GONZÁLEZ-ESTRADA, R. R.; CARVAJAL-MILLÀN, 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.

GUIMARÃES, A.; ABRUNHOSA, L.; PASTRANA, L. M.; CERQUEIRA, M. A. Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: a new strategy towards biopreservation and healthier foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 594-614, 2018.

LIMA, J. R. de; VIANA, F. M. P.; LIMA, F. A.; PIENIZ, V.; GONÇALVES, L. R. B. Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 203-211, 2014.

MARÍN, A.; ATARÉS, L.; CHAFER, M.; CHIRALT, A. Properties of biopolymer dispersions and films used as carriers of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 60-69, 2017.

MARÍN, A.; CHÁFER, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; TORRES, R.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N. Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. **Biological Control**, v. 96, p. 108-119, 2016.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. The effect of locust bean gum (LBG)-based edible coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. **Food Microbiology**, v. 58, p. 87-94, 2016.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. 2017.

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.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico é uma técnica que ainda vem sendo pouco aplicada em condições práticas, isso se deve à complexidade das condições que serão enfrentadas pelo micro-organismo antagonista, incluindo sua interação com o fruto e o fungo, além dos diferentes estresses ambientais que podem comprometer sua viabilidade e eficácia. Assim, conhecer o modo como agem esses organismos, sua resposta frente a diferentes estresses e o desenvolvimento de uma formulação que mantenha sua viabilidade e sua ação no controle do fungo, além do uso de estratégias que possam melhorar sua atuação, são necessários para a criação de um produto biológico eficiente e que possa competir com os fungicidas convencionais.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, a linhagem *T. globosa* (5S55), apresentou como mecanismo de ação a produção da enzima β -1,3-glucanase. A linhagem *T. asahii* (3S44), além da produção da enzima β -1,3-glucanase, também foi capaz de produzir biofilme. Em relação aos estresses, embora *T. asahii* tenha mostrado melhor desempenho, a levedura *T. globosa* também apresentou bons resultados com potencial para atuar em controle biológico pós-colheita.

As formulações contendo amido de milho e gelatina a 2% mostraram bons resultados na aderência das leveduras na superfície dos tomates, e no controle do fungo *A. alternata* a formulação com amido mostrou redução no diâmetro da podridão com diminuição de micélio e esporos em comparação com o controle.

Como conclusão, as leveduras apresentaram bons resultados e podem vir a ser usadas no combate de *A. alternata*. Para isso, é importante a realização de testes *in vivo* que confirmem os mecanismos de ação e a resposta aos diferentes

estresses na presença do fungo e do tomate. Além disso, devem ser pesquisados outros mecanismos que possam estar envolvidos na atividade de controle das leveduras e o uso de pré-tratamentos para torná-las mais resistentes quando estiverem expostas a condições adversas. Em relação à formulação, devem ser verificadas outras concentrações, veículos e modos de aplicação de modo a melhorar a atuação dessas leveduras.