

**ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae*
ENVOLVIDOS NO CONTROLE DE *Colletotrichum acutatum***

MARCOS R. LOPES¹; KATIA C. KUPPER²; ALINE C. SILVA³; MARIANA N. KLEIN⁴.

Nº 12141

RESUMO

Com grande importância econômica e social que representa a citricultura para o país, o setor enfrenta vários problemas de natureza fitossanitária. Destacando-se a queda prematura dos frutos cítricos, doença causada pelo fungo *C. acutatum* Simmonds. Tendo como controle da doença a pulverização com produtos químicos na época da florada. Mas com altos custos financeiros e ambientais de tais aplicações, aliado às recentes restrições à presença de resíduos em frutos, faz necessário o estudo de outros meios. Assim, o controle biológico surge como técnica importante, ecologicamente e economicamente. Dentre os agentes de biocontrole encontram-se as leveduras, citadas na literatura por suas ações inibitórias a vários fungos causadores de podridões em frutas no período de pós-colheita e pela sua capacidade em controlar doenças de diversas culturas de interesse econômico no campo, pois são ótimas competidoras por nutrientes e espaço. Este trabalho teve por objetivo Identificar os possíveis mecanismos de ação de *S. cerevisiae* envolvidos no controle biológico de *C. acutatum*. As leveduras apresentaram capacidade de controlar o *C. acutatum* através da competição por nutrientes do meio e produção de compostos antifúngicos, sendo esses não identificados nos estudos aqui realizados. A maioria das leveduras mostrou que os compostos produzidos por elas não suporta altas temperaturas. Apenas os agentes de controle biológico KD1, CAT1 e BG1 foram capazes de produzir metabolitos voláteis. O mecanismo de ação apresentado pelas leveduras na zona de antagonismo não afetaram completamente a viabilidade das hifas do fitopatógeno.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. Agrônoma, UFSCar, Araras-SP, lopes.mrl@hotmail.com.

² Orientadora: Pesquisadora Nível VI, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

³ Colaborador: Estagiaria de Mestrado, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

⁴ Colaborador: Estagiaria de Mestrado, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

ABSTRACT

With great economic and social importance that represents the citrus industry for the country, the sector faces several problems in a plant. Highlighting the fruit drop of citrus, a disease caused by the fungus *C. acutatum* Simmonds. With the disease control spraying with chemicals at the time of flowering. But with high financial and environmental costs of such applications, combined with recent restrictions on the presence of residues in fruits, is necessary to study other means. Thus, biological control technique emerges as important ecologically and economically. Among the biocontrol agents are yeasts, reported in the literature for their inhibitory actions at various fungi that cause fruit rot in the post-harvest and its ability to control diseases of various crops of economic interest in the field, they are great competing for nutrients and space. This study aimed to identify the possible mechanisms of action of *S. cerevisiae* involved in biological control of *C. acutatum*. The yeasts were capable of controlling *C. acutatum* by competition for the nutrient medium and production of antifungal compounds, and not identified in these studies performed here. Most yeasts showed that the compounds produced by them do not support high temperatures. Only the biological control agents KD1, BG1 CAT1 and were able to produce volatile metabolites. The mechanism of action submitted by the yeast in the area of antagonism did not affect the viability of completely hyphae of the phytopathogen.

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de citros do mundo, tanto em termos de área de cultivo, produção e quantidade de frutas processadas. Cerca de 85% da produção é destinada à industrialização, cujo suco produzido é exportado para vários países, incluindo-se, principalmente Bélgica, Estados Unidos, Japão, Suíça e China (AGRIANUAL, 2009).

Entretanto, apesar de toda importância dessa cultura, o setor citrícola enfrenta sérios problemas fitossanitários e, dentre as doenças mais importantes encontra-se a Queda Prematura dos frutos Cítricos (QPFC), causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds. A medida predominante de controle desta doença é a pulverização com produtos químicos na época da florada. No entanto, os custos financeiros e ambientais de tais aplicações, aliado às crescentes restrições à presença de resíduos, estão a exigir o estudo de novas alternativas. Entre estas, o controle

biológico surge como técnica importante que, além da sua coerência ecológica, em muitos casos, poderá se constituir em tecnologia poupadora de capital.

Muitos pesquisadores têm demonstrado a eficácia do controle biológico em diferentes interações entre antagonistas e fitopatógenos. PICCININ (1996) utilizou *Saccharomyces cerevisiae* no controle de fitopatógenos fúngicos e bacterianos em sorgo, maracujá e eucalipto, em condições de campo, fazendo inoculações 24 horas antes ou depois da inoculação com os fitopatógenos. Os resultados mostraram o efeito da levedura como agente indutor de proteção, indicando, ainda, a inexistência de especificidade no controle de diferentes fitopatógenos.

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

Leveduras são microrganismos conhecidos por participarem ativamente em diversos processos biotecnológicos importantes. Atualmente, com o grande interesse na produção e economia de energia através de tecnologias sustentáveis, a mais conhecida espécie representante deste grupo, *S. cerevisiae*, é comprovadamente essencial neste caminho. Outras espécies de leveduras também estão em estudo e diferentes aplicações são apresentadas, sendo o controle biológico uma das áreas mais promissoras. Leveduras como *Candida oleophila* podem ser encontradas comercialmente e apresentam ótimos resultados quando aplicadas no controle de fungos de podridão pós-colheita, permitindo menores perdas e desperdícios, além de proporcionar maiores lucros para produtores e comerciantes (DROBY et al., 1998; GAMAGAE et al., 2004).

Trabalhos realizados no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” têm mostrado a potencialidade de isolados de *S. cerevisiae* em controlar *Colletotrichum acutatum* (dados não publicados), sob condições *in vitro* e *in vivo*. Portanto, dando continuidade a esses estudos, este projeto de pesquisa teve por objetivo estudar os possíveis mecanismos de ação de diferentes isolados de levedura envolvidos no controle de *Colletotrichum acutatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, IAC, em Cordeirópolis/SP.

Avaliação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* quanto ao antagonismo a *Colletotrichum acutatum*:

Para estudar o efeito antagônico dos agentes de controle biológico (ACBs) no crescimento micelial de *C. acutatum*, utilizou-se a técnica do cultivo pareado em placas de Petri, contendo batata-dextrose-água (BDA) (Dennis & Webster, 1971).

Uma alçada retirada de colônias ativas de cada um dos isolados de *S. cerevisiae* (ACB-BG1, ACB-CAT1, ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1 e ACB-PE2), com dois dias de idade, foi transferida para o meio BDA, contido em placas de Petri, à 3 cm de distância de um disco (7mm) de micélio do fitopatógeno. As testemunhas foram constituídas de discos de micélio do patógeno sem o pareamento com os ACBs. A incubação das culturas se deu em estufa para BOD a 27°C, em fotoperíodo 12/12h, por 18 dias. A avaliação ocorreu quando a cultura do patógeno atingiu toda a placa no tratamento testemunha, pela medição das colônias dos fitopatógenos em dois sentidos perpendiculares.

Seguiu-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Esse estudo foi realizado duas vezes.

Avaliação de alguns mecanismos de ação das leveduras envolvidos no antagonismo a *Colletotrichum acutatum*:

Produção de compostos antifúngicos voláteis

Com o objetivo de se verificar a produção de compostos antifúngicos voláteis por *S. cerevisiae*, foi avaliado o crescimento de *C. acutatum* repicado conjuntamente com os isolados de leveduras, porém, utilizando placas com divisão, a qual impede que exsudatos não voláteis produzidos pela levedura tenham contato com o fungo através do meio de cultura. A mesma quantidade de meio de cultura BDA foi vertida em cada um dos lados da placa, sendo depositado uma alçada da levedura de um lado e um disco de 7 mm de diâmetro com micélio fúngico em crescimento ativo do outro. Após 07 dias de incubação a 25°C foi realizada a avaliação que constou da medida do diâmetro micelial do patógeno frente à levedura, comparada à placa com apenas a presença do fungo (sem a levedura). Esse ensaio foi realizado em duplicata.

Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Para cada isolado de *S. cerevisiae* foi utilizado um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de batata dextrose (BD). Três discos de meio com crescimento de

cada um dos isolados da levedura foram adicionados aos frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de batata dextrose (BD). Em seguida, as culturas foram incubadas em condições ambiente de laboratório por 72 horas, sob agitação constante, no escuro. Após os 3 dias, uma alíquota de 10 mL foi transferida para frascos de Erlenmeyer com 90 mL de BDA. Em seguida, os frascos foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 120°C e 1 atm de pressão, posteriormente, cada meio contendo o respectivo metabólito, foi vertido para placas de Petri. Após solidificação dos meios, foi transferido para o centro de cada placa, um disco de 7 mm de diâmetro, obtido dos bordos de colônias de *C. acutatum*, com 8 dias de idade. A incubação das culturas foi em estufa para BOD a 25°C. As testemunhas foram constituídas de placas contendo o fitopatógeno nos meios de cultura, sem a presença de metabólitos. Após 5 dias de incubação foi efetuado a medição das colônias dos fitopatógenos, em dois sentidos perpendiculares. Seguiu-se um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. O ensaio foi realizado em duplicata.

Produção de compostos antifúngicos livres de células do antagonico

Para cada isolado de *S. cerevisiae*, foi utilizado um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido à base de batata-dextrose. Um disco de meio com crescimento micelial de *S. cerevisiae* foi colocado em cada frasco e incubado em condições de laboratório por 72 horas, sob agitação constante, no escuro.

Em seguida, os caldos fermentados foram filtrados em papel de filtro. Os mesmos foram submetidos à filtração em membrana millipore (0,45 µm), a fim de se conseguir um filtrado livre de células de *S. cerevisiae* (adaptação da técnica de FRIGHETTO & MELO, 1995). Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de BDA fundente. Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos para placas de Petri. Um disco de meio de cultura de (7 mm de diâmetro), contendo o fitopatógeno com 8 dias de idade, foi transferido para o centro das placas, após a solidificação dos meios. As testemunhas foram constituídas de placas de Petri contendo o patógeno nos meios de cultura sem a presença dos metabólitos. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 25°C durante 09 dias e, a avaliação foi efetuada por meio da medição da colônia de *C. acutaum*, em dois sentidos perpendiculares. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

Competição por nutrientes:

Este ensaio teve por objetivo verificar a competição por nutrientes entre *C. acutatum* e *S. cerevisiae*. Para tal, diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%) de sacarose foram adicionadas em ágar-água. Gotas de 10 µL da suspensão de cada um dos isolados de levedura (ACB-BG1, ACB-CAT1, ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1 e ACB-PE2) (1×10^6 ufc/mL) e de suspensão de esporos do fitopatógeno (1×10^4 esporos/mL) foram depositadas em áreas demarcadas de lâminas, previamente preparadas, contendo meio ágar-água mais sacarose nas respectivas concentrações. Para os tratamentos testemunhas foram colocadas gotas de água destilada e esterilizada no lugar dos antagonistas. As lâminas foram colocadas no interior de caixas de polietileno, contendo dois chumaços de algodão embebido em água destilada e esterilizada. As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D., no escuro a 25 °C por 15 horas. Ao término desse período gotas de 10 µL de uma solução de azul láctico foram adicionadas nas áreas demarcadas, com a finalidade de paralisar o desenvolvimento do patógeno. Para a avaliação foi contado o número de esporos germinados e não germinados, em um total de 100 conídios, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Esse ensaio foi realizado duas vezes.

Avaliação do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* retirado da zona de antagonismo:

A partir da observação do halo de inibição entre os isolados de levedura antagonísticos e o fitopatógeno (ensaio de cultivo pareado, item 3.1), foi realizado um experimento para quantificar o crescimento micelial de *C. acutatum* retirado da zona de antagonismo (micélio localizado adjacente do halo de inibição de crescimento fúngico), com o intuito de verificar se as hifas estavam ou não viáveis.

Para tal, discos de micélio fúngico (7 mm de diâmetro) foram retirados da zona de antagonismo a partir de três diferentes locais: do halo de inibição, da região mediana (próxima ao halo de inibição) e, para fins de comparação, do micélio longe da levedura (onde o micélio não estava sofrendo a ação inibitória da levedura). Após a retirada dos discos, os mesmos foram colocados em placas de Petri contendo BDA. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, fotoperíodo 12/12h, durante 06 dias. A avaliação constou da medição do diâmetro médio da colônia de *C. acutatum* a cada 24 horas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* quanto ao antagonismo a *Colletotrichum acutatum*:

Pelos dados apresentados na Tabela 1, verifica-se que todos os isolados de levedura inibiram o crescimento da colônia de *C. acutatum*, diferindo estatisticamente do tratamento testemunha, com valores de inibição que variaram de 55 a 71%.

TABELA 1. Diâmetro médio da colônia de *Colletotrichum acutatum*, após o pareamento com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

Isolados	Diâmetro médio da colônia de <i>C. acutatum</i> (cm)	% de inibição em relação à testemunha
ACB-CAT1	2,60 a ⁽¹⁾	71,03
ACB-CR1	3,00 ab	66,57
ACB-BG1	3,40 bc	62,02
ACB-KD1	3,41 bc	62,01
ACB-PE2	3,87 cd	56,82
ACB-K1	4,00 d	55,43
TESTEMUNHA	8,97 e	0,00

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

Avaliação de alguns mecanismos de ação das leveduras envolvidos no antagonismo a *Colletotrichum acutatum*:

Produção de compostos antifúngicos voláteis

Os isolados, ACB-KD1, ACB-CAT1 e ACB-BG1 produziram compostos voláteis que inibiram o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno, diferindo estatisticamente da testemunha com valores de inibição da colônia que variaram de 16 a 25 %. Os demais isolados apresentaram valores intermediários de inibição, não diferindo estatisticamente da testemunha e dos demais isolados (Tabela2).

Segundo Bruce et al. (2003) observaram que no cultivo em meio triptona de soja, *S. cerevisiae* foi capaz de inibir cerca de 75% o crescimento de fungos causadores de podridão em madeira, como *Sclerophoma pithyophila*. Os mesmos autores afirmaram que esta produção pode ser fortemente influenciada pelo meio de cultivo, sendo que em meio pobre nutricionalmente, o controle obtido foi muito baixo ou nulo, o que pode ter ocorrido neste teste que utilizou um meio de cultura que pode não ser o melhor para que as leveduras produzam uma maior quantidade de compostos antifúngicos voláteis.

TABELA 2. Produção de compostos voláteis produzidos por diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e o efeito no crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*.

Isolados	Diâmetro médio da colônia de <i>C. acutatum</i> (cm)	% de inibição em relação à testemunha
ACB-KD1	3,61 a ⁽¹⁾	25,17
ACB-CAT1	3,94 a	18,45
ACB-BG1	3,98 a	17,59
ACB-CR1	4,11 ab	14,90
ACB-PE2	4,16 ab	13,79
ACB-K1	4,39 ab	9,14
TESTEMUNHA	4,83 b	0,00

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

Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Os dados da Tabela 3 mostraram que os isolados ACB-PE2 e ACB-BG1 foram os únicos capazes de produzir metabólitos que suportaram altas temperaturas e em quantidades suficientes para inibirem o crescimento micelial *C. acutatum*.

TABELA 3. Produção de metabólitos termoestáveis produzidos por diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e o efeito no crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*.

Isolados	Diâmetro médio da colônia de <i>C. acutatum</i> (cm)	% de inibição em relação à testemunha
ACB-PE2	3,11 a ⁽¹⁾	26,65
ACB-BG1	3,34 ab	21,23
ACB-K1	3,79 bc	10,61
ACB-CAT1	4,04 c	4,72
ACB-CR1	4,11 c	3,07
ACB-KD1	4,19 c	1,18
TESTEMUNHA	4,24 c	0,00

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

Produção de compostos antifúngicos livres de células do antagonico

Quando se avaliam os dados da Tabela 4 sobre a produção de compostos livres de células, verifica-se que todos os isolados de *S. cerevisiae* produziram substancias antifúngicas que inibiram o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno, com valores de inibição que variaram de 11 a 37 %, sendo que o isolado ACB-CR1 foi o mais eficiente para a inibição.

TABELA 4. Produção de compostos livres de células produzidos por diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e o efeito no crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*.

Isolados	Diâmetro médio da colônia de <i>C. acutatum</i> (cm)	% de inibição em relação à testemunha
----------	--	---------------------------------------

ACB-CR1	4,19	a ⁽¹⁾	36,90
ACB-BG1	4,87	b	26,66
ACB-CAT1	5,03	b	24,25
ACB-KD1	5,12	b	22,89
ACB-PE2	5,76	c	13,25
ACB-K1	5,91	c	11,00
TESTEMUNHA	6,64	d	0,00

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

Competição por nutrientes

Os dados sobre a competição de nutrientes pelos isolados de *S. cerevisiae* e *C. acutatum* encontram-se nas Tabelas 5, 6 e 7. Verificou-se que todos os isolados da levedura afetaram a germinação dos esporos do fitopatógeno. A adição de sacarose na concentração de 0,5 % favoreceu a atividade antagônica da levedura, aumentando a porcentagem de inibição da germinação.

Chanchaichaovivat et al. (2008), avaliaram possíveis mecanismos de ação da levedura *Pichia guilliermondii* no controle da doença antracnose em pimenta causada pelo fungo *Colletotrichum capsici*. Os autores observaram que o aumento das concentrações de açúcar reduziu a supressão da germinação do esporo fúngico, sugerindo que a levedura compete pelos nutrientes do meio com o fungo, inibindo seu desenvolvimento, assim podemos comparar que o mesmo acontece neste experimento, onde a levedura *S. cerevisiae* compete por sacarose com o fitopatógeno.

TABELA 5. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de *Colletotrichum acutatum*, após 15 horas de incubação a 25°C.

Isolados	% de esporos germinados	% de inibição da colônia fitopatógeno
TESTEMUNHA	99,72 a ⁽¹⁾	0,00
ACB-K1	59,03 b	40,69
ACB-CAT1	38,72 c	61,00
ACB-BG1	28,58 d	71,14
ACB-CR1	26,92 de	72,80
ACB-PE2	21,14 e	78,58
ACB-KD1	12,39 f	87,33

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

TABELA 6. Efeito na germinação de diferentes concentrações de Sacarose na germinação de *Colletotrichum acutatum*, após 15 horas de incubação a 25°C.

Isolados	% de esporos germinados
----------	-------------------------

0,0	48,93 a ⁽¹⁾
0,5	33,48 c
1,0	43,12 b
1,5	38,09 bc
2,0	41,62 b
2,5	40,33 b

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

TABELA 7. Interação entre isolados e concentrações de sacarose na germinação de *Colletotrichum acutatum*, após 15 horas de incubação a 25°C.

Isolados	Concentração de Sacarose (%)											
	0,0		0,5		1,0		1,5		2,0		2,5	
TEST.	100,00	aA	99,83	aA	99,17	aA	99,53	aA	100,00	aA	100,00	aA
ACB-PE2	47,50	cA	16,67	cdBC	25,00	cdB	1,67	dC	15,33	dBC	20,67	deB
ACB-CR1	28,83	dA	13,33	cdB	25,00	cdAB	28,50	cAB	34,83	cA	31,00	cdA
ACB-CAT1	48,00	cA	35,33	bA	44,16	bA	16,17	cdB	39,83	cA	48,33	bA
ACB-KD1	8,33	eA	7,33	dA	19,33	dA	15,67	cdA	16,67	dA	77,00	eA
ACB-K1	74,50	bA	38,00	bC	52,50	bBC	79,17	bA	67,17	bAB	42,83	bcC
ACB-BG1	35,33	cdA	23,83	bcAB	36,70	bcA	25,67	cAB	17,50	dB	32,50	bcdAB

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Avaliação do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* retirado da zona de antagonismo

Os dados referentes às avaliações do crescimento micelial de *C. acutatum* retirado da zona de antagonismo encontram-se nas Tabelas 8, 9 e 10.

As hifas de *C. acutatum* retiradas da zona de antagonismo propriamente dito, não perderam a viabilidade de crescimento micelial, após o pareamento com os demais isolados de levedura. No entanto, a menor porcentagem de viabilidade (30 %) ocorreu no tratamento com o isolado ACB-CAT1.

TABELA 8. Avaliação do crescimento micelial de *C. acutatum*, cujas hifas foram retiradas da zona de antagonismo.

Isolados	Diâmetro médio da colônia de <i>C. acutatum</i>		% de viabilidade de crescimento da colônia
TESTEMUNHA	4,39	a ⁽¹⁾	100,00
(C. a.) x ACB-BG1	4,35	ab	99,05
(C. a.) x ACB-PE2	4,25	b	96,34
(C. a.) x ACB-CR1	3,80	c	86,53
(C. a.) x ACB-KD1	3,35	d	76,28
(C. a.) x ACB-K1	3,22	e	73,43
(C. a.) x ACB-CAT1	1,35	f	30,74

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

Obs.: C. a. (*C. acutatum*).

TABELA 9. Avaliação do crescimento micelial de *C. acutatum*, cujas hifas foram retiradas longe da levedura.

Isolados	Diâmetro médio da colônia de <i>C. acutatum</i>	% de viabilidade de crescimento da colônia
TESTEMUNHA	4,39 a ⁽¹⁾	100,00
(<i>C. a.</i>) x ACB-KD1	4,34 a	98,86
(<i>C. a.</i>) x ACB-PE2	3,81 b	86,91
(<i>C. a.</i>) x ACB-K1	3,55 b	81,02
(<i>C. a.</i>) x ACB-CR1	3,00 c	68,50
(<i>C. a.</i>) x ACB-BG1	2,92 c	66,60
(<i>C. a.</i>) x ACB-CAT1	2,77 c	63,19

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

Obs: *C. a.* (*C. acutatum*).

TABELA 10. Avaliação do crescimento micelial de *C. acutatum*, cujas hifas foram retiradas longe da zona de antagonismo.

Isolados	Diâmetro médio da colônia de <i>C. acutatum</i>	% de viabilidade de crescimento da colônia
TESTEMUNHA	4,39 a ⁽¹⁾	100,00
(<i>C. a.</i>) x ACB-BG1	3,95 b	89,94
(<i>C. a.</i>) x ACB-CR1	3,24 c	73,81
(<i>C. a.</i>) x ACB-PE2	3,18 c	72,48
(<i>C. a.</i>) x ACB-KD1	2,81 d	64,14
(<i>C. a.</i>) x ACB-CAT1	2,72 de	62,05
(<i>C. a.</i>) x ACB-K1	2,65 e	60,63

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

Obs: *C. a.* (*C. acutatum*).

CONCLUSÃO

As leveduras apresentaram capacidade de controlar o *C. acutatum* através da competição por nutrientes do meio e produção de compostos antifúngicos, sendo esses não identificados nos estudos aqui realizados.

A maioria das leveduras mostrou que os compostos produzidos por elas não suporta altas temperaturas.

Apenas os ACB's KD1, CAT1 e BG1 foram capazes de produzir metabolitos voláteis.

O mecanismo de ação apresentado pelas leveduras na zona de antagonismo não afetaram completamente a viabilidade das hifas do fitopatógeno.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL, 2009. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria & Comércio, 2009. p. 267-300.
- BRUCE, A.; DOUGLAS, S.; SUSAN, V.; RON, E.W. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p. 101-108, 2003.
- CHANCHACHAOVIVAT, A.; BHINYO, P.; RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. **Biological Control**, v.47, p.207-215, 2008.
- DROBY, S., COHEN, L., DAUS, A., WEISS, B., HOREV, B., CHALUTZ, E., KATZ, H., KEREN-TZUR, M., SHACHNAI, A. Commercial testing of Aspire: A yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. **Biological Control**, v.12, p.97-101, 1998.
- FRIGHETTO, R.T.S., MELO, I.S. de. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I. S. de, SANHUEZA, R.M.V. (Coords.) **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. p.40-46. (Manual Técnico).
- GAMAGAE, S.U., SIVAKUMAR, D., WIJESUNDERA, R.L.C. Evaluation of post-harvest application of sodium bicarbonate-incorporated wax formulation and *Candida oleophila* for the control of anthracnose of papaya. **Crop Protection**, v.23, p.575-579, 2004.
- GUETSKY, R., SHTIENBERG, D., ELAD, Y. & DINOOR, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Phytopathology**, v.91, p.621-627, 2001
- JIJAKLI, M.H. & LEPOIVRE, P. Characterization of an exo-b-1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, v. 49, p. 234-237, 1998.
- MASIH, E.I., SLEZACK-DESCHAUMES, S., MARMARAS, I., AIT BARKA, E., VERNET, G., CHARPENTIER, C., ADHOLEYA, A. & PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. **FEMS Microbiology Lett.**, v. 202, p.227-232, 2001.
- MEHROTRA, N.K., SHARMA, N., GHOSH (NAYEK), R. & NIGAM, M. Biological control of green and blue mould disease of citrus fruit by yeast. **Indian Phytopathology**, v. 49, p. 350-354, 1996.



- PICCININ, E. **Proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflorae edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos por *Saccharomyces cerevisiae*.** Piracicaba, 1996. 106p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.
- SHARMA, R.R., SINGH, D., SINGH, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, v.50, p.205–221.