

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*,  
*Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por  
*Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros**

**Leonardo Toffano**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia**

**Piracicaba  
2010**

Leonardo Toffano  
Engenheiro Agrônomo

**Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros**

Orientador:  
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba  
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Toffano, Leonardo

Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros / Leonardo Toffano. - - Piracicaba, 2010.  
78 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Compostos orgânicos 2. Doenças de plantas 3. Laranja 4. Leveduras 5. Mancha preta  
6. Pós-colheita I. Título

CDD 634.31  
T644e

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

Ao Marcelo, Marcio e Marcos, grandes amigos (*in memoriam*)

## **DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Sérgio F. Pascholati pela orientação, ensinamentos e amizade.

Aos Professores Dr. Ângelo Jacomino e Dr. Ricardo Kluge, pela disponibilidade das instalações do Laboratório de Fisiologia Pós-colheita.

Ao Professor Dr. Fábio Augusto, Laboratório de Cromatografia Gasosa/ Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNICAMP.

Ao Professor Dr. Wolfgang Osswald, Departamento de Patologia Florestal, Universidade Técnica de Munique, Alemanha.

A Professora Dra. Liliam Amorim e a técnica Silvia pela utilização do Laboratório de Pós-colheita, no Campo Experimental da Fitopatologia.

Ao Grupo Fischer, pelo apoio e disponibilidade nas pesquisas.

Ao Josué, estagiário e amigo que me auxiliou nos trabalhos.

A Dra. Silvia Blumer pelo aprendizado e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica: André, Ariana, Dalilla, Fernando, Greicy, Marizete (*in memorian*), Maurício, Nikolas e Nívea.

Aos amigos que aqui encontrei, Ana Paula, Barbara, Cristiane, Daniela, Fabrício, Júlio, Geraldo, Isolda, Leandro, Maria Cândida e Rafaele.

Ao amigo Ivan Herman Fischer pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários Jefferson, Fernanda, Rodolfo, Heloísa, Pedro Arthuso, Edivaldo e Carmem pela convivência e atenção durante o transcorrer do curso.

Aos demais Professores do Setor de Fitopatologia pelos conhecimentos transmitidos.

Meu agradecimento especial a todos meus amigos, familiares e a querida Samira que sempre me apoiaram e incentivaram.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica.....	17
2.1.1 Mancha preta dos citros.....	17
2.1.1.1 Ocorrência.....	17
2.1.1.2 Sintomatologia.....	18
2.1.1.3 Etiologia.....	19
2.1.1.4 Medidas de controle.....	20
2.1.2 Agentes utilizados no controle da mancha preta dos citros .....	21
2.1.2.1 <i>Lentinula edodes</i> .....	21
2.1.2.2 <i>Agaricus blazei</i> .....	23
2.1.2.3 Albedo de <i>Citrus sinensis</i> var. Valência.....	24
2.1.2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
2.1.3 Controle biológico.....	27
2.1.4 Uso de voláteis na agricultura.....	28
2.1.5 Medidas de controle pós-colheita em citros.....	30
3 OBJETIVOS.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Potencial dos extratos do albedo de <i>C. sinensis</i> , <i>L. edodes</i> e <i>A. blazei</i> no controle da mancha preta dos citros em frutos de laranja Valência associados a baixa temperatura.....	35
4.1.1 Obtenção dos agentes.....	35
4.1.1.1 Obtenção e preparo do extrato do <i>L. edodes</i> .....	35
4.1.1.2 Obtenção e preparo do extrato do <i>A. blazei</i> .....	35
4.1.1.3 Obtenção e preparo do extrato do albedo de <i>C. sinensis</i> var. Valência.....	36
4.1.1.4 Obtenção e preparo da suspensão de <i>S. cerevisiae</i> .....	36



4.1.2 Efeito dos agentes no controle da mancha preta dos citros em frutos de <i>Citrus sinensis</i> var. Valência.....	37
4.1.3 Efeitos dos compostos voláteis produzidos por <i>S. cerevisiae</i> sobre <i>G. citricarpa</i> em frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência em pós-colheita.....	38
4.1.3.1 Obtenção dos frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência.....	38
4.1.3.2 Preparo das placas contendo <i>S. cerevisiae</i> e montagem do experimento envolvendo os compostos voláteis e frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência.....	39
4.2 Efeito dos compostos voláteis identificados a partir da levedura <i>S. cerevisiae</i> sobre o crescimento micelial, germinação e formação de apressório por <i>G. citricarpa</i> .....	40
4.2.1 Obtenção do fungo <i>G. citricarpa</i> .....	42
4.2.2 Efeitos dos compostos voláteis sobre o crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> .....	42
4.2.3 Efeito dos compostos voláteis sobre a germinação e formação de apressório por <i>G. citricarpa</i> .....	43
4.3 Efeito dos compostos voláteis disponíveis comercialmente identificados a partir da levedura <i>S. cerevisiae</i> , sobre frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência apresentando sintomas de mancha preta dos citros, quando tratados em pós-colheita.....	43
4.3.1 Obtenção dos frutos.....	43
4.3.2 Efeito dos compostos voláteis sobre frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência apresentando sintomas de mancha preta dos citros.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Potencial dos extratos do albedo de <i>C. sinensis</i> , <i>L. edodes</i> , <i>A. blazei</i> e da suspensão de <i>S. cerevisiae</i> no controle da mancha preta dos citros em frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência quando associados a baixa temperatura.....	45
5.2 Efeito dos compostos voláteis produzidos por <i>S. cerevisiae</i> sobre <i>G. citricarpa</i> em frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência em pós-colheita.....	50
5.3 Efeito dos compostos voláteis identificados a partir de <i>S. cerevisiae</i> sobre <i>G. citricarpa in vitro</i> e em frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência em pós-colheita..	54

5.3.1 Efeito <i>in vitro</i> da mistura artificial dos compostos voláteis disponíveis comercialmente identificados a partir de <i>S. cerevisiae</i> sobre <i>G. citricarpa</i> .....	54
5.3.2 Efeito dos compostos voláteis, disponíveis comercialmente, sobre o crescimento micelial, germinação e formação de apressório por <i>G. citricarpa</i> .....	56
5.3.3 Efeito dos compostos voláteis identificados, disponíveis comercialmente, obtidos a partir da levedura <i>S. cerevisiae</i> , na redução dos sintomas da mancha preta dos citros sobre frutos de <i>C. sinensis</i> var. Valência.....	59
6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS .....	65



## RESUMO

### **Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros**

A mancha preta dos citros é uma doença que limita a exportação de laranja brasileira para os países da Europa. Exceto para *Citrus aurantium* e seus híbridos, todas as outras variedades são susceptíveis ao patógeno. Com isso existe um grande interesse para que esta doença não ocorra, uma vez que é considerada uma doença quarentenária A1. Problemas associados à aquisição de resistência e a percepção do público em geral sobre o impacto potencial das práticas tradicionais de controle sobre a saúde e meio ambiente levaram a uma crescente demanda por produtos livres de resíduos químicos. Em vista disso, este trabalho verificou o efeito dos extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes*, *A. blazei* e da suspensão de *S. cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros quando associados a refrigeração. Os frutos de *C. sinensis* var. Valência, após serem tratados pelos extratos, permaneceram durante 21 dias a 3 °C e posteriormente 4 dias a 25 °C, foram realizadas cinco avaliações ao longo do experimento. Neste trabalho, também verificou-se a eficiência dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros quando aplicados em pós-colheita. A linhagem CR-1 da levedura *S. cerevisiae* foi colocada para crescer em placas de poliestireno contendo meio de batata-dextrose-ágar e colocada em recipientes de vidro de 3 L fechados, junto com frutos de *C. sinensis* var. Valência apresentando sintomas de mancha preta dos citros. E por fim, verificou-se a eficiência de diferentes compostos orgânicos identificados a partir da *S. cerevisiae*, obtidos a partir de produtos disponíveis comercialmente, que foram utilizados para verificar o crescimento micelial a germinação e a formação de apressório por *G. citricarpa*, e o controle da mancha preta dos citros em pós-colheita. Como resultado, os extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes* e *A. blazei* apresentaram potencial como agentes de controle sobre a mancha preta dos citros em frutos de laranja (*C. sinensis* var. Valência) associados a refrigeração, pois apresentaram inibição no aparecimento de novas lesões. Os compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* inibiram a expressão de sintomas em frutos de *C. sinensis* var. Valência, quando tratados em pós-colheita, sendo que os compostos orgânicos voláteis, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol apresentaram inibição sobre *Guignardia citricarpa in vitro* e atuaram como agentes de controle, inibindo o aparecimento de novas lesões em frutos de laranja Valência, apresentando sintomas de mancha preta, quando aplicados em pós-colheita.

Palavras-chave: Mancha preta dos citros; *Sacharomyces cerevisiae*; Compostos voláteis



## ABSTRACT

### **Effect of albedo extracts of *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* and volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* in the control of citrus black spot**

The citrus black spot is a disease that restricts the export of Brazilian oranges to the countries in Europe. Except for *Citrus aurantium* and its hybrids, all other varieties are susceptible to the pathogen. Thus, there is great interest that this disease does not occur, since it is considered a quarantine A1 disease. Problems associated with the acquisition of fungal resistance and the perception of the general public about the potential impact of traditional control measures over the health and the environment led to a growing demand for products free of chemical residues. Thus, this study was carried out to investigate the effect of aqueous extracts of the albedo of *C. sinensis*, *L. edodes*, *A. blazei* and the suspension of *S. cerevisiae* cells in the control of citrus black spot when associated with cooling. The fruits of *C. sinensis* var. Valencia, after being treated with the extracts, were stored for 21 days at 3 ° C and then 4 days at 25 ° C (there were five evaluations during the experiment). This work also verified the efficiency of volatile organic compounds produced by *S. cerevisiae* in the control of citrus black spot when applied in post-harvest. The CR-1 strain of yeast *S. cerevisiae* was put to grow inside polystyrene plates containing potato-dextrose-agar medium. The plates were placed in closed glass containers of 3 L, along with fruits of *C. sinensis* var. Valencia showing symptoms of citrus black spot. Finally, it was verified the effect of different organic compounds, identified from the *S. cerevisiae* and obtained from commercially available products, on *in vitro* mycelial growth, germination and appressorium formation by *G. citricarpa* and on the *in vivo* control of citrus black spot under post-harvest conditions. The results showed that the aqueous extracts of the albedo of *C. sinensis*, *L. edodes* and *A. blazei* exhibit potential to control the black spot in orange (*C. sinensis* var. Valencia) associated with cooling, since they inhibited the appearance of new lesions. The volatile compounds produced by *S. cerevisiae* inhibited the expression of symptoms in fruits of *C. sinensis* var. Valencia, when treated in post-harvest. On the other hand, the microbial volatile organic compounds, 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol inhibited the growth of *Guignardia citricarpa* *in vitro* and acted as control agents by inhibiting the appearance of new lesions of black spot in fruits of Valencia orange when applied in post-harvest.

Keywords: Citrus black spot; *Sacharomyces cerevisiae*; Volatile compounds



## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura constitui importante segmento na estrutura sócio-econômica do Brasil, podendo ser caracterizada como uma das mais típicas atividades agro-industriais do país. O Brasil assumiu nas últimas décadas a liderança mundial de produção de laranjas, tendo produzido na safra 2007/08, aproximadamente 15,9 milhões de toneladas seguido pelos EUA, com aproximadamente 9,2 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2009). No Brasil, o estado de São Paulo se destaca como o maior produtor nacional, com aproximadamente 87,44% da produção total do país (AGRIANUAL, 2009). Entre os principais grupos de frutas no mundo, os citros ocupam o primeiro lugar em volume de produção, com aproximadamente 105,4 milhões de toneladas seguidos pelas culturas de banana, uva e maçã (FAO, 2009). De acordo com Souza (2001), além do suco e dos frutos *in natura*, são comercializados subprodutos da laranja obtidos durante o processo de industrialização, como farelo, células congeladas, óleos essenciais e líquidos aromáticos. Estes produtos são usados como solvente industrial, componentes aromáticos, na obtenção de sabores artificiais, na indústria farmacêutica e alimentícia e na fabricação de adesivos. Entretanto, a citricultura vem sendo constantemente ameaçada por graves problemas fitossanitários, sendo que entre as diversas doenças que atacam os citros destaca-se a mancha preta dos citros.

A União Européia considera como doenças quarentenárias A1 (aquelas que não estão presentes em nenhuma área dos países membros) para os frutos cítricos, a mancha preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa*. São considerados frutos com mancha preta, apenas os que apresentarem sintomas. Portanto, um trabalho adequado de escolha no *packing-house* faz com que nossas frutas não tenham problemas para a importação para aqueles países. Entretanto, as laranjas podem expressar sintomas na pós-colheita, por exemplo, durante o período de transporte (*ex-packing-house*). Caso seja detectado apenas um fruto com um único sintoma desta doença na inspeção no porto de destino, todo o lote é rechaçado.

Problemas associados à aquisição de resistência e a percepção do público em geral sobre o impacto potencial das práticas tradicionais de controle sobre a saúde e meio ambiente levaram a uma crescente demanda por produtos livres de resíduos



químicos (GULLINO; KUIJPERS, 1994). Desta forma, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate de doenças (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A utilização de microrganismos antagonistas na pós-colheita pode interromper algum estágio da doença ou do ciclo de vida do fitopatógeno. Isso pode ocorrer através de parasitismo, competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas (PUNJA; UTKHEDE, 2003), compostos antibióticos voláteis (STROBEL, 2006) e não voláteis (VINALE et al., 2006). Foi verificado em trabalho prévio que a linhagem CR-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, isolada de processos fermentativos para a produção de etanol, apresentou capacidade antagonista *in vitro* contra *G. citricarpa* (FIALHO, 2004) e que os extratos aquosos do albedo de *Citrus sinensis*, *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* ocasionaram a diminuição do aparecimento de novas lesões em frutos apresentando sintomas de mancha preta dos citros, quando aplicados em pós-colheita (TOFFANO, 2005).

Devido aos prejuízos causados pela mancha preta dos citros, maior interesse por métodos alternativos de controle e da necessidade de uma maior compreensão sobre os mecanismos envolvidos nas interações mediadas por diferentes compostos produzidos por microrganismos, o presente trabalho teve como objetivos verificar o efeito dos extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *A. blazei* e *L. edodes* no controle da mancha preta dos citros quando associados a refrigeração e identificar os compostos orgânicos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* e elucidar alguns dos mecanismos de ação atuantes no processo inibitório de *G. citricarpa in vivo* e *in vitro*.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **2.1.1 Mancha preta dos citros**

##### **2.1.1.1 Ocorrência**

A mancha preta dos citros, tendo o fungo *G. citricarpa* como agente causal, foi constatada pela primeira vez na Austrália, no ano de 1895, e posteriormente em 1929 na África do Sul (KIELY, 1948; DOIDGE, 1929). Como consequência, ocorreram prejuízos causando queda na produção citrícola desses países (KLOTZ, 1978). Além destes países, sua ocorrência também já foi relatada na China, Filipinas, Indonésia, Japão, Hong Kong e Taiwan, na Ásia; Swazilândia, Quênia, Nigéria, Zimbabwe, Rodésia e Moçambique, na África; e Argentina, Peru, Uruguai, Venezuela e Brasil, na América do Sul (KOTZÉ, 1988; FEICHTENBERGER, 1996; TIMMER et al., 2000; FEICHTENBERGER et al., 2005). No Brasil, a primeira constatação ocorreu no município de Piracicaba em 1940 (AVERNA-SACCÁ, 1940), sem, no entanto, ter sido mencionada a sua importância em termos de perdas. Na década de 80, a doença foi relatada no Estado do Rio de Janeiro (baixada fluminense), causando perdas consideráveis em "Tangerina Rio" (ROBBS, 1990) e, atualmente, também tem ocorrido em frutos de laranjas 'Lima', 'Seleta', 'Folha Murcha', 'Natal', 'Pêra' e 'Valência' (GÓES et al., 1990). Em 1986, foi encontrada no Estado do Rio Grande do Sul (Vale da Cal), causando sérios prejuízos para a citricultura daquela região (GÓES et al., 1988; GÓES et al., 1991). Em 1992, novas constatações do fungo foram feitas no Estado de São Paulo, causando severos prejuízos em pomares localizados na região dos municípios de Conchal e Mogi-Guaçu (GÓES; FEICHTENBERGER, 1993). Em Minas Gerais, a presença da doença foi confirmada em 2001, na região de Guaxupé, afetando laranjeiras doces. No Espírito Santo a doença foi relatada no sul do Estado em 2002 (COSTA et al., 2003).

### 2.1.1.2 Sintomatologia

O patógeno *Guignardia citricarpa* por ser específico de citros (Baayen et al., 2002), causa lesões em ramos, folhas e frutos. Entretanto, os sintomas em laranjeiras doces são visíveis e problemáticos apenas em frutos. As lesões ficam limitadas ao flavedo (CARDOSO FILHO, 2003), depreciando os frutos para a comercialização no mercado interno de fruta fresca e restringindo as exportações para a União Européia, maior importador dos frutos cítricos brasileiros. A mancha preta dos citros não modifica as qualidades internas dos frutos (FAGAN E GÓES, 2000), podendo estes serem utilizados na produção de suco cítrico concentrado (TIMMER et al., 2000).

No início, apenas quatro diferentes sintomas associados à mancha preta dos citros foram descritos: mancha dura, falsa melanose, mancha sardenta e mancha virulenta (TIMMER et al., 2000). Porém, no Brasil, já foram relatados seis diferentes sintomas em frutos relacionados à mancha preta dos citros, sendo eles: *Mancha dura* – a mais comum e típica lesão. Geralmente começa a aparecer no período que inicia a mudança da coloração dos frutos. As lesões apresentam o centro necrótico deprimido, marrom claro, e as bordas salientes, marrom-escuras. Em frutos mais esverdeados a lesão é circundada por um halo amarelado. Em frutos mais maduros a lesão é circundada por um halo esverdeado. Uma característica típica dessa lesão é a presença de pontos negros em seu interior, que se constituem nos corpos de frutificação do fungo, os picnídios; *Falsa melanose* – são manchas escuras e pequenas, dispersas ou agregadas nos frutos, que normalmente aparecem com estes ainda verdes. Este sintoma pode ser confundido com os de outra doença fúngica, a melanose (*Diaporthe citri*). Entretanto, nesta última, as lesões são ásperas quando comparadas às da falsa melanose; *Mancha sardenta* – pequenas lesões deprimidas e avermelhadas que geralmente ocorrem no período de maturação dos frutos e na pós-colheita; *Mancha rendilhada* – são lesões superficiais que atingem grandes áreas dos frutos, quando estes ainda apresentam-se verdes. Estas lesões não apresentam corpos de frutificação; *Mancha trincada* – a expressão dos sintomas está associada à presença do ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*). As lesões são arredondadas, ocorrendo em frutos ainda verdes. Com a maturação dos frutos as lesões apresentam trincas em sua

superfície, não apresentando corpos de frutificação; *Mancha virulenta* – este sintoma caracteriza-se por ser a coalescência das lesões dos diferentes tipos de sintomas, atingindo, portanto, grandes áreas da superfície dos frutos (FUNDECITRUS, 2003; SPÓSITO 2003).

### 2.1.1.3 Etiologia

A mancha preta dos citros é causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, cuja forma anamórfica corresponde a *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp.). A forma imperfeita do fungo foi inicialmente descrita como *Phoma citricarpa* Mc Alpine. Pseudotécios são encontrados apenas em folhas de citros caídas em decomposição no solo. Os pseudotécios são isolados ou agregados, globosos, imersos, de coloração castanho-escuro a preta, com 95-125 µm de diâmetro, ostíolo não papilado, circular, com 10-17,5 µm de diâmetro e pseudoparáfises ausentes. Os ascos são cilíndrico-clavados (40-64 x 12-15 µm), de parede bitunicada, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com o centro dilatado (12,5-16 x 4,5-6,5 µm) e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (BALDASSARI et al., 2001).

A fase assexual, representada por *P. citricarpa*, produz picnídios em lesões nos ramos, frutos e folhas e em folhas em decomposição. Os picnídios são solitários, às vezes agregados, globosos, com 115-190 µm de diâmetro, coloração marrom escura para preta, ostíolo levemente papilado, circular e com 12-14,5 µm de diâmetro. Os conídios possuem formato obovóide para elíptico, hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice hialino em uma das extremidades, base truncada e medem 8-10,5 x 5,5-7 µm. O conidióforo é cilíndrico e alongado com 9 µm de comprimento (BALDASSARI et al., 2001; SUTTON E WATERSON, 1966).

Dos isolamentos realizados de lesões de frutos e folhas obtém-se colônias negras de bordos lobulados, de aspecto granuloso. Devido ao desenvolvimento de picnídios nestes cultivos, é comum que se desenvolva simultaneamente o estado espermiófito deste fungo que corresponde ao gênero *Leptodothiorella*. Neste estado são produzidas espermiócias baciliformes, que são células especializadas, masculinas,

unicelulares e participam da reprodução sexual, da qual origina-se os ascomas ou pseudotécios do estado teleomórfico (ALCOBA et al., 2000).

#### **2.1.1.4 Medidas de controle**

Atualmente, no controle convencional da mancha preta dos citros, são empregadas medidas de controle que devem levar em consideração o período de suscetibilidade dos frutos, as fontes de inóculo do fungo e as condições ambientais. Sabendo-se que os frutos são suscetíveis até cerca de cinco meses após a queda das pétalas das flores. As principais medidas de controle incluem:

- utilizar mudas livres da doença nos plantios e replantios, principalmente em locais onde a doença não foi ainda constatada;
- em áreas onde a ocorrência da doença é recente, remover e queimar os órgãos infectados das plantas durante o outono-inverno, antes do início do florescimento das plantas, para reduzir as fontes de inóculo;
- controlar o mato das linhas de plantio com herbicidas pós-emergentes, e o mato das ruas com roçadeiras, de modo a produzir cobertura morta sobre as folhas caídas ao solo na área de projeção da copa das plantas, antes do início do florescimento destas, para reduzir a produção e a dispersão de esporos do fungo nas folhas em decomposição sobre a superfície do solo;
- eliminar plantas em estado de depauperamento avançado do pomar;
- manter as plantas em boas condições de nutrição e sanidade;
- pulverizar as plantas com fungicidas para a proteção dos frutos durante o seu período de maior suscetibilidade. Fungicidas dos grupos benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), estrobilurinas (pyraclostrobin, azoxystrobin e trifloxystrobin), ditiocarbamatos (mancozeb e propineb) e produtos à base de cobre (oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso e sulfato de cobre na forma de calda bordalesa) estão registrados e são usados com sucesso no controle da doença. O

controle deve ser iniciado logo após a queda das pétalas das flores e o número de aplicações pode variar em função do histórico da doença na área, das condições climáticas prevalentes durante o período de desenvolvimento do fruto, da suscetibilidade do hospedeiro, e do nível de controle requerido. Em pomares para exportação ou para o mercado interno de frutas frescas, os produtos à base de cobre em mistura com óleo podem ser usados somente nas primeiras pulverizações. A restrição ao uso desses fungicidas nas pulverizações subsequentes deve-se ao fato dos mesmos poderem provocar fitotoxicidade aos frutos, e também por eles tornarem mais evidentes manchas, lesões e injúrias provocadas por outras causas, bióticas ou abióticas. Nas demais pulverizações, recomenda-se utilizar benzimidazóis ou estrobilurinas misturadas com óleo emulsionável. (CALAVAN, 1960; GÓES et al., 1990; KOTZÉ, 1981, 1996; PRATES; NOGUEIRA, 1996; FEICHTENBERGER et al., 2005).

## **2.1.2 Agentes utilizados no controle da mancha preta dos citros**

### **2.1.2.1 *Lentinula edodes***

O interesse pelo cultivo e consumo do cogumelo Shiitake, como é conhecido o *L. edodes*, é atribuído às suas qualidades gastronômicas, nutricionais e medicinais, tornando-o atualmente o segundo cogumelo mais consumido no mundo (SAN ANTONIO, 1981; PRZYBYLOWICZ E DONOGHUE, 2007). É conhecido há aproximadamente 1.000 anos nos países asiáticos (SINGER, 1961; PRZYBYLOWICZ E DONOGHUE, 2007).

Trabalhos de grande importância relacionam compostos de ação antiviral produzidos pelo fungo. O complexo lignina-proteína-carboidratos, EP3, apresentou atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus* - HIV), sendo a lignina solubilizada em água o princípio ativo presente no composto (SUZUKI et al., 1990). Lentinana usada em combinação com azidotimidina (AZT) suprimiram a expressão superficial do HIV sobre células-T em maior intensidade do que o AZT sozinho. LEM também é útil no tratamento da AIDS, inibindo a infecção do HIV

em células-T humanas cultivadas e potencializando o efeito do AZT contra replicação viral *in vitro* (TOCHIKURA et al., 1988).

Em vista deste interesse pelo cogumelo e pelos resultados na medicina, mais estudos que mencionam o uso do *L. edodes* com ação sobre vírus, bactérias e fungos patogênicos a animais e plantas foram desenvolvidos. Pacumbaba; Beyl; Pacumbaba, (1999) demonstraram que o exsudato de *L. edodes* inibiu significativamente o crescimento de todas as espécies de bactérias fitopatogênicas testadas, incluindo *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *Erwinia amylovora*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, além do crescimento de bactérias que afetam alimentos e animais, como *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

Em relação a fitopatologia, os extratos obtidos a partir da massa micelial de *L. edodes*, dependendo da concentração utilizada, inibiram o desenvolvimento *in vitro* dos fungos *Helminthosporium* sp. e *Fusarium solani*, agentes causais da helmintosporiose do trigo e da síndrome da morte súbita em soja, respectivamente (SASAKI, 1997), bem como de *Phomopsis sojae*, agente causal da seca das hastes e das vagens em soja. Piccinin (2000) mostrou também que o filtrado obtido a partir da massa micelial de *L. edodes*, bem como os filtrados obtidos a partir do píleo e da estipe do cogumelo, reduziram significativamente o crescimento micelial de *Exserohilum turcicum* e *Colletotrichum sublineolum* a partir da concentração de 10.000 µg/mL de filtrado no meio de cultivo. A 20.000 µg/mL os filtrados reduziram a esporulação dos patógenos. Di Piero e Pacholati (2004b) demonstraram que o extrato aquoso do basidiocarpo reduziu a severidade da antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em plantas de pepino nas condições de casa de vegetação. Toffano (2005) demonstrou que o extrato aquoso diminuiu o aparecimento de novas lesões de mancha preta dos citros em frutos de laranja Valência quando tratados em pós-colheita.

Compostos antivirais também são produzidos por *L. edodes*. Uma fração protéica isolada de cogumelo shiitake, denominada FBP (*Fruiting Body Protein*), previne a infecção de plantas contra TMV (PRZYBYLOWICZ E DONOGHUE, 2007). Di Piero (2003) observou que a mistura dos extratos aquosos de basidiocarpos dos isolados LE

96/17 e LE 96/22 de *L. edodes* à suspensão viral de *Passion fruit woodiness virus* (PWV) inibiu a infectividade do vírus em folhas de *Chenopodium quinoa*.

### **2.1.2.2 *Agaricus blazei***

O cogumelo-da-vida (*Agaricus blazei*) é nativo do Brasil, sendo encontrado naturalmente na região sudoeste do Estado de São Paulo (PASCHOLATI; STANGARLIN; PICCININ, 1998). Segundo Mizuno et al. (1990), o basidiocarpo de *A. blazei* apresenta 40 a 45 % de proteínas, 38 a 45 % de carboidratos, 6 a 8 % de fibras, 5 a 7 % de minerais e 3 a 5 % de gorduras, baseado em matéria seca.

Além das propriedades nutricionais, o cogumelo é utilizado por milhares de pessoas para a prevenção do câncer ou como um adjuvante no tratamento com drogas quimioterápicas, após a remoção de um tumor maligno (TAKAKU; KIMURA; OKUDA, 2001). Kawagishi et al. (1990) obtiveram um complexo glucano-protéico, com alto conteúdo dos aminoácidos leucina e alanina, apresentando atividade antitumoral. O efeito, caracterizado pela inibição do crescimento de um sarcoma-180 implantado em camundongos, ocorreu provavelmente devido às propriedades imuno-regulatórias do complexo. Mizuno et al. (1990) constataram efeito similar por polissacarídeos obtidos a partir do extrato aquoso do basidiocarpo, destacando-se o complexo 1,6- e 1,4- $\alpha$ -glucana e o complexo 1,6- e 1,3- $\beta$ -glucana como componentes principais de diferentes polissacarídeos.

Estudos apontaram para uma possível substância constituída de polissacarídeos de ligação  $\beta$ -glicosídica associada a determinadas proteínas e denominada de complexo glucanoprotéico, que possui uma forte atividade antitumoral (WASSER; WEIS, 1999). Embora possua moléculas com atividade biológica já demonstrada sobre tecidos animais, as pesquisas envolvendo o cogumelo-da-vida e o seu possível uso fitopatológico estão apenas no início em se tratando de agricultura. Em vista disso, Di Piero e Pascholati (2004b) demonstraram que o extrato aquoso inibiu em média 50% a severidade da antracnose (*C. lagenarium*) em plantas de pepino em condições de casa de vegetação. Além disso, também diminuiu a severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) em plantas de tomate (DI PIERO; PACHOLATI, 2004a).



Toffano (2005) demonstrou que o extrato aquoso diminuiu o aparecimento de novas lesões de mancha preta dos citros em frutos de laranja Valência quando tratados em pós-colheita.

### **2.1.2.3 Albedo de *Citrus sinensis* var. Valência**

A utilização de resíduos da indústria alimentícia apresenta oportunidades de redução da poluição ambiental, geração de emprego e de agregação de valor, oferece diversas possibilidades de uso em diferentes ramos da indústria, desde que este material apresente características físico, químicas e tecnológicas favoráveis aos processos. Na indústria de processamento de frutas, estes resíduos são gerados em grande quantidade e são subutilizados muitas vezes, para alimentação animal e como fertilizantes (THEBAUBIN et al., 1997; GRIGELMO-MIGUEL; MARTIN-BELLOSO, 1999; SANTANA, 2005).

Na indústria citrícola, o albedo é considerado um subproduto. Assim, a disponibilidade para a utilização seria interessante, pois a indústria citrícola, voltada para a produção de suco concentrado, disponibiliza aproximadamente seis toneladas do subproduto por ano.

O albedo faz parte da composição da casca dos frutos cítricos, conhecido como mesocarpo. Assim, a casca de um fruto de laranja é composta pelo flavedo que é a camada externa, a qual é o epicarpo, e pelo albedo que é a camada interna da casca. O albedo é constituído por um tecido esponjoso de coloração branca, onde podem ser encontrados os carboidratos solúveis, aminoácidos, flavonóides e pectinas. Enquanto que no flavedo, constituído pela epiderme e por uma camada de células glandulares de óleo, podem ser encontrados os carotenóides, vitaminas e óleos essenciais.

Na interação do albedo com microrganismos o uso do extrato de albedo e flavedo na inibição do crescimento micelial de *Phomopsis citri* foi relatado por El-Tobshy e Sinclair (1964). Murdoch e Allen (1960 citado em BRODRICK, 1971) relataram que o limoneno obtido da casca de laranja, em concentrações variando de 0,02 a 0,1 %, foi tóxico ao fungo *Zygosaccharomyces* spp. Em 1971, Brodrick também relatou o potencial do limoneno, extraído do albedo e do flavedo de laranja para o controle de *G.*

*citricarpa* (forma anamórfica *P. citricarpa*), comprovando o efeito antifúngico deste composto.

Cardoso Filho (2003) demonstrou que o flavedo de *Citrus sinensis* var. Pêra é promissor no controle de *G. citricarpa*, pois os resultados *in vitro* evidenciaram um atraso no crescimento micelial e na esporulação do patógeno, quando comparados com o controle. Através destes trabalhos, o autor demonstrou que extratos de origem vegetal exibem um grande potencial como agentes antimicrobianos.

Em trabalho realizado por Toffano (2005), foi verificado que o extrato aquoso do albedo de laranja Valência inibiu a expressão dos sintomas de mancha preta em frutos de *C. sinensis* var. Valência. Assim, esta parte do trabalho na presente tese, tem como interesse dar continuidade no processo de uso do albedo, em pós colheita, porém associado a baixa temperatura, simulando o período de transporte dos frutos do Brasil até a Europa.

#### **2.1.2.4 *Saccharomyces cerevisiae***

As leveduras (pertencentes ao grupo dos fungos) são organismos eucarióticos unicelulares que existem no solo, ar, plantas, frutos e alimentos. A espécie mais comum é a *Saccharomyces cerevisiae*, com tamanho médio de 5  $\mu\text{m}$ , conhecida vulgarmente como levedura de padeiro ou da cerveja. Encontra-se no centro da Biotecnologia tradicional pelo seu papel milenar na produção de pão, vinho e cerveja, devido à sua capacidade de produzir álcool (principalmente o etanol, presente em bebidas fermentadas) e dióxido de carbono (que permite a expansão da massa do pão) a partir de açúcares. Devido a essa capacidade de produzir álcool, a levedura possui alta eficiência na produção de etanol, portanto, tal característica permite inibir o crescimento de organismos competidores. Além disso, são os mais tolerantes ao etanol dentre os conhecidos na natureza, podendo desenvolver-se em meios contendo até 14-16% (v/v) de etanol. Possui rápido crescimento, metabolização eficiente de açúcares, tolerância a baixos níveis de oxigênio e grandes variações de temperatura, osmotolerância e atividade celular em ambientes ácidos. Essas características são fundamentais para a

sua utilização industrial e para a sua alta competitividade contra outros microrganismos (PISKUR et al., 2006; ANDRIETTA et al., 2007).

O uso de leveduras no controle foliar e doenças de pós-colheita deve-se ao fato destes organismos serem os maiores componentes da comunidade microbiana na superfície de folhas, frutos e vegetais (WILSON; WISNIEWSKI, 1989). Elas são agentes de controle potencialmente mais efetivos, pois são fenotipicamente mais adaptadas a esses nichos e são hábeis na colonização e competição por espaço e nutrientes (McLAUGHLIN et al., 1990; FILONOW, 1998).

Pesquisas envolvendo o uso de *S. cerevisiae* como agente de controle de doenças em plantas como milho, sorgo, eucalipto e maracujazeiro contra fitopatógenos vem há vários anos, sendo realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica - Esalq/USP (PASCHOLATI; 1998; SILVA; PASCHOLATI, 1992; STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994). Wulff e Pascholati (1999) verificaram que eliciadores glicoprotéicos, obtidos da levedura *S. cerevisiae*, estimularam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. As frações ativas foram resistentes a autoclavagem, solúveis em etanol 50% e ligaram-se a resina aniônica DEAE-Celulose. Por sua vez, o tratamento das frações com proteinase reduziu a atividade eliciadora.

Labanca (2002) também verificou que um carboidrato, possivelmente manana e glucosamina, obtido da parede celular de *S. cerevisiae*, induziu resistência local em pepineiro contra *C. lagenarium*.

Produtos comerciais à base de *S. cerevisiae* estão disponíveis no mercado como biofertilizante ou aditivo para a fermentação de silagem, e não estão registrados com a finalidade de controlar doenças em plantas. Entre estes, pode-se citar o Agro-Mos<sup>®</sup>, cujo princípio ativo é representado por mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede celular de *S. cerevisiae* e o ISR 2000<sup>®</sup>, o qual é composto por extratos da levedura e da planta *Yucca schidigera*. Esses produtos têm mostrado efeitos positivos no controle de doenças em videira, batata e tomate, quando utilizados em conjunto com fungicidas, possibilitando assim a redução do número de aplicações destes (DI PIERO et al., 2005). Porém, atualmente existem produtos comerciais a base de leveduras, mas não do gênero *Saccharomyces* spp, que foram desenvolvidos para o controle de

fitopatógenos como o Aspire<sup>®</sup> (*Candida oleophila*); Yield plus<sup>®</sup> e Shemer<sup>®</sup> (*Metschnikowia fruticola*).

Fialho (2004) demonstrou que a linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*, isolada de processos fermentativos para produção de álcool, apresentou capacidade antagônica *in vitro* contra *G. citricarpa*.

### 2.1.3 Controle biológico

O desafio para os produtores no controle de doenças tem aumentado cada vez mais com a demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos e pela percepção do público em geral sobre o impacto potencial das práticas utilizadas no controle de doenças, como o uso de agrotóxicos, sobre a saúde dos seres humanos e sobre o meio ambiente. Tais pressões exercidas pela sociedade promoveram o estabelecimento de políticas governamentais que restringem a utilização de agrotóxicos (GULLINO E KUIJPERS, 1994; RAGSDALE E SISLER, 1994). Desta forma, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate a doenças (PUNJA E UTKHEDE, 2003).

As plantas cultivadas podem ser consumidas frescas ou depois de processadas e podem ser produzidas através de métodos de produção convencional, orgânica ou ainda sob intenso manejo em condições ambientais controladas em casas de vegetação. No entanto, não são poupadas da destruição por fitopatógenos, os quais afetam raízes, caules, folhas, flores e frutos (PUNJA E UTKHEDE, 2003).

O combate a doenças é altamente dependente de agrotóxicos, que são de modo geral, eficazes para o controle de pragas, mas apresentam, por vezes, consequências indesejáveis. Os agrotóxicos são apontados como substâncias altamente prejudiciais, que se acumulam no organismo e são capazes de causar câncer e mutações genéticas em descendentes (LIMA et al., 2000).

O controle alternativo no contexto da proteção de plantas contra fitopatógenos engloba o controle biológico e indução de resistência, e não inclui o controle químico clássico e o melhoramento genético de plantas para resistência a doenças. Alguns autores, no entanto, classificam a indução de resistência como um tipo de controle

biológico (PASCHOLATI, 1998). O controle biológico tem como premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis (LIMA et al., 2000). Em um conceito mais amplo, o controle biológico é definido segundo Baker e Cook (1974) como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, esta provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas”. Posteriormente, Cook e Baker (1983) redefiniram o controle biológico como sendo “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

No contexto particular deste estudo, o controle biológico de doenças de plantas pode ser definido simplesmente como “o controle de um microrganismo através de outros microrganismos”.

Dentre os diversos produtos biológicos disponíveis no mercado, a grande fatia do mercado de biopesticidas (cerca de 80%) é representada por produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos. Outros exemplos de microrganismos comercializados são a *Agrobacterium radiobacter* no controle da galha da coroa causada por *A. tumefaciens*, o vírus *Baculovirus anticarsia* contra a lagarta desfolhadora (*Anticarsia gemmatalis*) em soja, *Colletotrichum gloeoporioides* f.sp. *aeschynomene* utilizado como bioherbicida em culturas de arroz e soja, *Trichoderma harzianum* no controle de *Sclerotium rolfsii* e a levedura *Candida oleophila* no controle de fitopatógenos em pós-colheita (NARDO E CAPALBO, 1998)

#### **2.1.4 Uso de voláteis na agricultura**

A agência norte americana de proteção ambiental (EPA) classifica diversos tipos de fungicidas sintéticos, utilizados no intuito de prevenir o desenvolvimento de doenças em plantas, como potencialmente carcinogênicos, e tóxicos para a vida selvagem e organismos não alvo. No entanto, causando restrições e limitações ao seu uso no

futuro. Um exemplo é o uso de brometo de metila, um composto biocida, na esterilização do solo e no controle de pestes em pós-colheita. Em virtude da sua alta toxicidade e efeito deletério sobre a camada de ozônio, o seu uso já não é mais tolerado. Isso torna o uso de produtos fungistáticos de origem natural uma alternativa atraente no intuito de substituir não apenas o brometo de metila, mas também outros fungicidas sintéticos (STROBEL et al. 2004).

Existem poucos fungicidas e fungistáticos com uso permitido na pós-colheita, e os mesmos ficam restritos a apenas algumas poucas *commodities*. Essa limitação é decorrência do nível residual nos produtos tratados ser de forma geral mais elevado quando comparado ao tratamento em pré-colheita. Tal fato se deve primariamente ao curto período de tempo decorrido entre a aplicação e o consumo. Nas poucas circunstâncias em que fungicidas podem ser utilizados em pós-colheita, frutos ou vegetais são tratados através de aspersão, imersão ou ainda o fungicida pode ser aplicado associado à cera (STROBEL et al., 2004). A mistura contendo fungicida é recirculada diversas vezes elevando-se consideravelmente o nível de sujeiras, esporos fúngicos e outros materiais durante todo o processo. O processo de aplicação é caro, demanda muito tempo e interrompe o fluxo do produto no armazenamento (SONG et al., 2000). A aquisição de resistência por parte de fitopatógenos e os riscos à natureza e saúde humana inerente a utilização de fungicidas (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008), contribuiu para a intensificação de pesquisas relacionadas a métodos alternativos de controle que eventualmente levaram ao registro de biofungicidas como o *Aspire*<sup>®</sup> e *Biosave*<sup>®</sup> para o uso na pós-colheita nos EUA (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). Leveduras e bactérias antagonistas são empregadas como biofungicidas primariamente para colonizar e proteger ferimentos presentes na superfície de frutos, resultando na exclusão ou inibição de fitopatógenos (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). No entanto, agentes de biocontrole geralmente tem a desvantagem de carecer de atividade curativa, e seu estabelecimento pode ser negativamente afetado pelo ambiente físico e químico do local a ser colonizado (MERCIER; WILSON, 1995; BROWN; DAVIS; CHAMBERS, 2000).

O uso de compostos voláteis produzidos por microrganismos para o tratamento de frutos, ou mesmo a fumigação com misturas artificiais de voláteis, pode ser

vantajosa no intuito de inibir ou eliminar patógenos em áreas fechadas durante o transporte e armazenamento. Os fumigantes são ideais para o tratamento na fase de pós-colheita, visto ser um processo que minimiza a manipulação do produto. Além do dióxido de enxofre, há poucos fumigantes disponíveis para serem utilizados no controle de doenças na pós-colheita. Porém, esse gás não apresenta efetividade contra infecções pré-existentes (ADASKAVEG; FÖRSTER; SOMMER, 2002). Recentemente, tem-se verificado esforços no intuito de se descobrir fumigantes alternativos, como compostos naturais comumente reconhecidos como seguros.

Métodos não residuais de controle excluem o uso de fumigantes ou atmosfera modificada, visto que nenhum deles é totalmente livre de resíduos. Entretanto, é consenso que o gás penetre e sofra sorção pelo produto, e então ao final do tratamento de exposição, o gás sofra completa desorção e pode ser completamente removido com a aeração. Portanto, a fumigação é uma alternativa viável ao uso de procedimentos de controle residuais (DONAHAYE, 2000).

Pouco se sabe sobre o modo de ação de voláteis na inibição de microrganismos. É provável que os voláteis atuem na alteração da síntese de proteínas (HUMPHRIS et al., 2002) e atividade de enzimas específicas, como lacases e tirosinases. Ambas as enzimas são fenoloxidasas que utilizam o oxigênio para oxidar compostos aromáticos e estão envolvidas na morfogênese de fungos (WHITE; BODDY, 1992; WHEATLEY, 2002). O conhecimento dos mecanismos de ação atuantes é fundamental no intuito de melhorar a eficiência do controle, bem como no desenvolvimento de estratégias de controle.

### **2.1.5 Medidas de controle pós-colheita em citros**

A partir dos anos setenta problemas relacionados a resistência aos fungicidas sintéticos de fungos que ocorrem em frutos cítricos passou a ser considerado importante (HOUCK, 1977). Desde então, muitos estudos têm constatado que o fenômeno de resistência é uma das principais causas do fracasso de muitos tratamentos com fungicidas de pós-colheita. Existem vários que se referem, por sua importância econômica, a *P. digitatum* e *P. italicum* frente aos fungicidas do grupo dos

benzimidazóis, ortofenilfenato sódico e imazalil, e descrevem casos tanto de resistência simples como de resistência cruzada e múltipla (BROWN, 1982; ECKERT, 1990; BUS; BONGERS; RISSE, 1991) Porém, não existem estudos comprovando a resistência de *G. citricarpa* a fungicidas quando aplicados em pós-colheita, levando em consideração que a maior parte do controle para mancha preta dos citros se inicia no campo.

No Brasil e em outros países, o uso de fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis em larga escala tem levado à seleção de linhagens fúngicas resistentes (GHINI E KIMATI, 2000). Além disso, em nossas condições, muitos produtos químicos testados e/ou suas misturas não possuem registro para uso em pós-colheita (AGROFIT, 2009), o que agrava a situação para os produtos destinados à exportação, uma vez que existem diferenças entre as populações dos países consumidores em relação ao uso de determinados fungicidas, bem como na variação da dose mínima residual tolerada (ALMEIDA, 2002). Desta forma, de acordo com Henz (2002), como existe hoje em dia uma maior preocupação dos consumidores brasileiros e estrangeiros, principalmente por produtos sem resíduos químicos tóxicos, microbiológicos ou com outros tipos de contaminação, inúmeros trabalhos estão sendo realizados buscando-se encontrar métodos de controle alternativo de fitopatógenos (FRANCO E BETTIOL, 2000; JANISIEWICZ, 1998; TEEWARI E NAYAK, 1991; ZAMBONELLI et al., 1996).

Existem vários fatores que podem contribuir para a ocorrência de doenças em pós-colheita, como uma colheita precipitada, mal programada, e a uma precária ou nula seleção dos frutos nas casas de embalagem (*packing-house*) (TUSET, 1987). No armazenamento, pode ocorrer disseminação e infecção de frutos sadios por contato com frutos doentes. Portanto, o manuseio cuidadoso de frutos durante as operações de colheita, transporte, processamento e armazenamento é prática recomendada.

A alteração da temperatura do ambiente pelo uso de câmaras frias no armazenamento e containeres refrigerados no transporte dos frutos beneficiados é prática importante para a redução das doenças em pós-colheita. A temperatura utilizada para a conservação depende da variedade cítrica a ser armazenada. Em termos gerais, recomenda-se para pomelos, limões verdadeiros e limas temperaturas de armazenamento entre 10 e 12 °C, para as tangerinas entre 5 e 7 °C e para os diferentes



tipos de laranja doce entre 2 e 4 °C, com umidade relativa do ambiente entre 90 e 95 % (BENATO; CIA; SOUZA, 2001).

Outro fator que pode contribuir para a expressão dos sintomas de doenças pós-colheita em citros, é o uso em concentrações elevadas de etileno no processo de desverdecimento (WHITESIDE; GARNSEY; TIMMER, 1993). O desverdecimento parece aumentar a suscetibilidade das frutas às podridões, particularmente quando a duração do tratamento é excessiva, a concentração de etileno empregada é muito alta e/ou a temperatura utilizada é demasiadamente elevada (MAZZUZ, 1996; PETRACEK; MONTALVO, 1997). A ocorrência de podridões durante e após o desverdecimento pode ser minimizada através da aplicação de fungicidas antes ou após o tratamento. Cohen (1983) indicou o tratamento com thiabendazole (500 mg/L), por imersão, antes do desverdecimento de tangerinas 'Satsuma' como forma de reduzir as podridões. Petracek e Montalvo (1997) comentaram que, para reduzir a incidência de fungos provocada pela exposição de tangerinas ao etileno, como *C. gloeosporioides* e *Diplodia* sp., os frutos devem ser retirados da câmara pouco antes de alcançarem o pleno desverdecimento. O armazenamento refrigerado das frutas após o desverdecimento também pode reduzir os problemas advindos do processo, considerando que um dos efeitos da frigoconservação é retardar o desenvolvimento de patógenos causadores de podridões (CHITARRA; CHITARRA, 1990). Os estudos de conservação pós-colheita de frutas cítricas desverdecidas é importante, pois pode determinar a durabilidade da fruta durante o transporte a longas distâncias, como no caso de exportação, e proporcionar o prolongamento do período de comercialização.

Outra técnica importante a ser utilizadas na pós-colheita, é levar em conta as características típicas de cada variedade cítrica, a distância que será percorrida até o destino e a legislação vigente de cada país importador, quanto aos produtos e resíduos permitidos (MAZZUZ, 1996).

O fornecimento de frutos saudáveis e utilizando menores quantidades de fungicidas são práticas que poderiam ser adotadas, as quais aumentariam o interesse pelo consumo de frutos.

### 3 OBJETIVOS

- Avaliar o potencial dos extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes*, *A. blazei* e da suspensão de *S. cerevisiae* como possíveis agentes de controle da mancha preta dos citros em frutos de laranja Valência, quando associados a baixa temperatura;
- Verificar o efeito dos compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* sobre *G. citricarpa* em frutos de *C. sinensis* var. Valência em pós-colheita;
- Verificar o efeito dos compostos voláteis identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, disponíveis comercialmente, sobre *G. citricarpa in vitro* e em frutos de *C. sinensis* var. Valência em pós-colheita.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Potencial dos extratos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes* e *A. blazei* no controle da mancha preta dos citros em frutos de laranja Valência quando associados a baixa temperatura**

#### **4.1.1 Obtenção dos agentes**

##### **4.1.1.1 Obtenção e preparo do extrato do *L. edodes***

Os estudos foram realizados com um isolado de *L. edodes*, no caso o LE 96/22, o qual apresentou controle sobre *G. citricarpa*, em frutos de *C. sinensis* var. Valência quando tratados em pós-colheita (TOFFANO, 2005). O cogumelo (Shiitake) foi produzido no Departamento de Produção Vegetal (Módulo de Cogumelos), da Faculdade de Ciências Agrárias/ UNESP/ Botucatu, na época, sob responsabilidade do Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira. Os basidiocarpos foram obtidos de acordo com Pacholati; Stangarlin e Piccinin (1998), sendo o cultivo do cogumelo efetuado em toras de eucalipto da espécie *Eucalyptus grandis*, em local sombreado, no campo. As principais etapas desse cultivo envolveram: i) produção de “inóculo” (crescimento vegetativo) em meio sintético; ii) “inoculação” das toras de eucalipto; iii) incubação; iv) choque térmico e hídrico para induzir os primórdios de basidiocarpo; v) colheita e processamento dos basidiocarpos. Para a obtenção do extrato aquoso, o pó seco de basidiocarpo recebeu água (14 mL para cada grama), e após 24 horas de incubação a 4 °C, a suspensão foi filtrada em filtro comum (gramatura: 8 g/cm<sup>2</sup>) e o extrato foi utilizado nos testes de proteção de frutos de *C. sinensis* var. Valência.

##### **4.1.1.2 Obtenção e preparo do extrato do *A. blazei***

Os estudos foram realizados com um isolado de *A. blazei*, no caso o ABL 28, o qual apresentou controle sobre *G. citricarpa*, em frutos de *C. sinensis* var. Valência quando tratados em pós-colheita (TOFFANO, 2005). Estes cogumelos também foram produzidos no Módulo de Cogumelos/ UNESP, Botucatu – SP, porém, os basidiocarpos

foram provenientes de cultivo axênico, realizado em substrato mantido no interior de câmaras de produção, onde os fatores ambientais são totalmente controlados. As etapas de cultivo envolveram: i) preparo do substrato de cultivo (bagaço de cana, capim de gramíneas, farelo de soja, enriquecido com sais minerais) através da compostagem e da pasteurização; ii) adição de micélio do cogumelo junto ao substrato; iii) colonização do substrato; iv) cobertura do substrato com turfa Santa Catarina, para induzir a formação dos primórdios de basidiocarpo; v) colheita e processamento dos basidiocarpos (PASCHOLATI, STANGARLIN; PICCININ, 1998). Para a obtenção do extrato aquoso, o pó seco de basidiocarpo recebeu água (14 mL para cada grama), e após 24 horas de incubação a 4 °C, a suspensão foi filtrada em filtro comum (gramatura: 8 g/cm<sup>2</sup>) e utilizado nos testes.

#### **4.1.1.3 Obtenção e preparo do extrato do albedo de *C. sinensis* var. Valência**

Frutos, com idade aproximada de 10 meses, de laranja Valência (*C. sinensis*), assintomáticos, foram coletados de plantas adultas em pomares comerciais do Estado de São Paulo. No laboratório, a separação do flavedo e albedo foi efetuada com auxílio de uma máquina manual descascadora, a qual retirou o flavedo e posteriormente uma faca, com a qual retirou-se o albedo. Após a separação, o albedo ou mesocarpo de *C. sinensis* var. Valência foi desidratado em ambiente seco e sombreado, a temperatura ambiente. Após a secagem, o material foi moído em moedor do tipo martelo e transformado em pó. Para a obtenção do extrato aquoso, o pó seco do albedo recebeu água (10 mL para cada grama), sendo a suspensão filtrada em filtro comum (gramatura: 8 g/cm<sup>2</sup>) e utilizada nos testes.

#### **4.1.1.4 Obtenção e preparo da suspensão de *S. cerevisiae***

Foi utilizada uma linhagem de *S. cerevisiae*, usada em processo de fermentação alcoólica, no caso a CR-1, a qual foi cedida pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Basso da área de Bioquímica e Fermentação Alcoólica do Departamento de Ciências Biológicas da Esalq/USP. A escolha desta linhagem deve-se ao fato da mesma produzir compostos

voláteis tóxicos *in vitro* para o fungo *G. citricarpa* (FIALHO, 2004). A levedura foi cultivada em meio “Yeast Extract Peptone Dextrose” (YEPD) a 32 °C, sob luz ambiente a 90 rpm durante 12 horas. Posteriormente foi espalhada, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de Petri contendo meio Batata-dextrose-ágar (BDA), e mantida sob temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 h. Após a formação de colônias (aproximadamente 48 horas) sobre toda a superfície do meio, a levedura foi suspensa em água, preparada uma suspensão de  $1 \times 10^{-8}$  esporos/ mL e utilizada para a aplicação nos frutos de laranja.

#### **4.1.2 Efeito dos agentes no controle da mancha preta dos citros em frutos de *C. sinensis* var. Valência**

Os frutos foram colhidos em estágio de maturação adequado para exportação, em pomar comercial de laranja Valência no Estado de São Paulo, os quais apresentavam sintomas de mancha preta dos citros. Os extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes*, *A. blazei* e da suspensão de *S. cerevisiae*, nas respectivas concentrações, foram testados no controle pós-colheita da mancha preta nos frutos de *C. sinensis* var. Valência. Foram também incluídos, como controle, um tratamento com água e um com o fungicida Thiabendazole (800 ppm).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se 10 frutos em cinco repetições, em um total de 50 frutos por tratamento. Os frutos de laranja sintomáticos (inóculo de campo) foram coletados na Fazenda Oriçanga, situada no município de Mogi-guaçu (SP). Posteriormente, foram lavados com água e submetidos a desinfestação superficial utilizando-se hipoclorito de sódio (200 ppm). As lesões existentes foram marcadas com o auxílio de uma caneta para retro-projetor, para avaliação das novas lesões (Figura 1). Os frutos foram tratados via aspersão, em uma caixa plástica branca rasa (80 x 40 x 15 cm), e posteriormente, virados para que toda a superfície dos mesmos fosse tratada, sendo utilizado 100 mL de calda por tratamento. Após a secagem, os frutos foram mantidos em câmara controlada a 3 °C por 21 dias (período que simula o transporte dos frutos em containeres refrigerados até os portos da Europa) e posteriormente a 25 °C e 85% UR por 4 dias.



**Figura 1:** Fruto com lesões oriundas do campo que foram marcadas com caneta para retroprojeter (detalhe de coloração mais escura).

As avaliações, em temperatura ambiente (25 °C), foram para verificar se haveria o aparecimento de novas lesões após a refrigeração. No período de refrigeração foram realizadas avaliações de 7 em 7 dias (3 °C) e no período após a refrigeração, avaliações de 2 em 2 dias (25 °C). A cada avaliação, novas lesões eram contadas e marcadas, sendo que na última (vigésimo quinto dia), todas as lesões existentes nos frutos estavam marcadas. Vários experimentos, utilizando as mesmas metodologias e o mesmo número de frutos, foram realizados.

#### **4.1.3 Efeito dos compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* sobre *G. citricarpa* em frutos de *C. sinensis* var. Valência em pós-colheita**

##### **4.1.3.1 Obtenção dos frutos**

Os frutos foram colhidos em estágio de maturação adequado para exportação, em pomar comercial de laranja Valência no Estado de São Paulo (Fazenda Oriçanga, Mogi-guaçu). Após a coleta dos frutos, estes foram selecionados visando um lote de tamanho médio e estágio de maturação uniformes, sendo que todos apresentavam lesões características de mancha preta dos citros. Os frutos foram lavados com detergente neutro e água corrente para retirada da sujeira e de resíduos de defensivos

de campo. Os sintomas de *G. citricarpa* já existentes foram assinalados para não serem computados com os desenvolvidos posteriormente aos tratamentos.

#### **4.1.3.2 Preparo das placas contendo *S. cerevisiae* e montagem do experimento envolvendo os compostos voláteis e frutos de *C. sinensis* var. Valência**

A levedura (linhagem CR-1) foi cultivada em meio “Yeast Extract Peptone Dextrose” (YEPD) a 32 °C, sob luz ambiente a 90 rpm durante 12 horas. Posteriormente foi espalhada, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de Petri de poliestireno contendo meio Batata-dextrose-ágar (BDA), e mantida sob temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 h. Após a formação de colônias (aproximadamente 24 horas) sobre toda a placa, as mesmas foram utilizadas no experimento.

As tampas das placas de poliestireno foram perfuradas (7 orifícios por tampa; 0,4 cm de diâmetro cada orifício), sendo então as mesmas colocadas no fundo de recipientes de vidro (potes) de 3 L com tampa plástica de rosca. Foram colocadas duas placas de poliestireno contendo a levedura, por recipiente (Figura 2). Na sequência foram colocados os frutos sintomáticos (8 frutos), dentro dos potes, acima das placas de poliestireno contendo a levedura (Figura 3). Os experimentos consistiram de 5 repetições de 8 frutos totalizando 40 frutos por tratamento. Sendo o tratamento **1** – BDA + placa de poliestireno; **2** – BDA + placa de poliestireno + *S. cerevisiae* (colocada 24 h após a repicagem); **3** – BDA + placa + *S. cerevisiae* (repicada no momento em que foi colocada nos potes) e **4** – placa de poliestireno vazia. Os recipientes foram mantidos em temperatura controlada de 25° C. Os frutos permaneceram dentro dos potes durante 7 dias, pois foi verificado que se os frutos permanecessem por mais de sete dias sem oxigenação ocorria o início de um processo de anaerobiose, apresentando um odor característico de fermentação por parte dos frutos de laranja. Após a retiradas dos frutos dos recipientes os mesmos continuaram em temperatura de 25° C e umidade relativa de 85%. As avaliações foram realizadas de 7 em 7 dias, totalizando 21 dias, sendo feita uma avaliação logo após a retirada dos frutos dos recipientes de vidro e duas com os frutos fora do recipiente, sendo assim realizadas três avaliações por experimento. Foram realizados dois experimento seguindo esta mesma metodologia. As



avaliações foram feitas através da contagem do aparecimento de novas lesões e comparadas com a testemunha, verificando se existe efeito dos compostos voláteis produzidos pela *S. cerevisiae* sobre os frutos de laranja Valência.



**Figura 2:** Vista de cima de um recipiente de vidro de 3 L. Dentro duas placas de poliestireno com a tampa perfurada, contendo meio BDA e o fungo *S. cerevisiae*.



**Figura 3:** Recipientes de vidro com tampa plástica (3 L) de rosca contendo frutos de laranja Valência sobre as duas placas de poliestireno contendo o fungo *S. cerevisiae*.

#### **4.2 Efeito dos compostos voláteis identificados a partir da levedura *S. cerevisiae* sobre o crescimento micelial, germinação e formação de apressório por *G. citricarpa***

A partir dos resultados obtidos na análise da atmosfera gasosa produzida por *S. cerevisiae* através de SPME-GC-MS (Micro extração de fase sólida – Cromatografia gasosa – Espectômetro de massa) (Tabela 1) (FIALHO, 2008) foi possível identificar sete picos (picos de 1 a 7, com exceção do pico 2), sendo que seis compostos orgânicos voláteis identificados estavam disponíveis comercialmente, os quais foram obtidos e utilizados nos testes. Como é possível observar na Tabela 1 o pico número 2 é um éster não identificado, portanto este composto não foi utilizado nos testes.

**Tabela 1** - Identificação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pela linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*, através da SPME-GC-MS (FIALHO, 2008)

Pico	Composto	Tempo de retenção (min)	Área (unidades)	% relativa	Fórmula molecular	Massa molecular
1	Etanol	2.10	21.478	85,3	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	44
2	Éster não identificado	2.91	376	1,5	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88
3	Acetato de etila	3.05	450	1,8	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88
4	3-metil-1-butanol	5.15	1.736	6,9	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88
5	2-metil-1-butanol	5.23	611	2,4	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88
6	Feniletalcolol	27.15	181	0,7	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122
7	Octanoato de etila	28.30	362	1,4	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172

Quando se utilizou a mistura dos compostos ela permaneceu na concentração de 98,5 %, descontando-se 1,5 % da mistura em relação a quantidade do composto não identificado (Tabela 2).

**Tabela 2** - Compostos orgânicos voláteis disponíveis comercialmente, obtidos a partir da identificação dos voláteis produzidos por *S. cerevisiae*, utilizados individualmente ou em mistura nos experimentos

Pico	Composto	Procedência	Identificação do produto pelo fabricante	% relativa
1	Etanol	Sigma - Aldrich	493546	85,3
2	Acetato de etila	Sigma - Aldrich	270989	1,8
3	3-metil-1-butanol	Sigma - Aldrich	309435	6,9
4	2-metil-1-butanol	Sigma - Aldrich	133051	2,4
5	Feniletalcolol	Sigma - Aldrich	P13606	0,7
6	Octanoato de etila	Sigma - Aldrich	112321	1,4
Total da mistura artificial				98,5

#### 4.2.1 Obtenção do fungo *G. citricarpa*

O fungo *G. citricarpa* foi isolado a partir de lesões do tipo mancha dura, em meio ágar – água, e posteriormente repicado em meio BDA. As placas foram mantidas sob fotoperíodo de 12 h a temperatura de 25° C, sendo que este isolamento ocorreu de frutos provenientes da área onde ocorreu a coleta para os ensaios *in vivo*. Este isolado foi utilizado para os testes *in vitro*.

#### 4.2.2 Efeito dos compostos voláteis identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre o crescimento micelial de *G. citricarpa*

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente e divididas ao meio (existe um espaço para trocas gasosas entre um lado e outro da placa). Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi colocado um disco de micélio (5 mm) do fungo *G. citricarpa*, e do outro lado da placa foi adicionado um algodão contendo 50 µL de um dos seis compostos. Posteriormente, as placas foram vedadas e armazenadas em fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25° C. A testemunha foi representada apenas pela presença do algodão, enquanto os demais tratamentos com os compostos relativos aos picos de 1 a 7, com exceção do pico 2. Foram realizadas avaliações de dois em dois dias através da medição do crescimento radial do fungo sobre o meio BDA.

Foi utilizada a concentração de 50 µL de cada composto, pois em experimento prévio foi produzida uma mistura artificial dos compostos orgânicos voláteis, utilizando-se padrões disponíveis comercialmente. A mistura continha todos os componentes positivamente identificados (picos de 1 a 7, com exceção do pico 2). A concentração de cada composto presente na mistura foi baseada na proporção relativa (%) estimada através da área em relação a todos os outros componentes da mistura (Tabela 1). Foram utilizadas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 µL da mistura utilizando a mesma metodologia acima, porém, eram adicionados os compostos juntos (no algodão), nas suas respectivas concentrações.

### **4.2.3 Efeito dos compostos voláteis identificados sobre a germinação e formação de apressório por *G. citricarpa***

Foram utilizadas as placas de poliestireno, como descrito em 4.2.2, sendo que em um dos lados da placa foram colocadas duas gotas de 40  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos de *G. citricarpa* ( $1 \times 10^5$  esporos mL), e do outro lado da placa foi adicionado um algodão contendo 50  $\mu\text{L}$  de um dos seis compostos. A seguir, as placas foram seladas com filme PVC e incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 25 °C, com luminosidade alternada (12 h claro 12 h escuro) por 24 h. Após este período, a porcentagem de germinação foi avaliada através da observação em microscópio óptico (aumento de 200 x). Foram considerados como germinados os esporos com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento dos esporos não germinados. A testemunha foi representada apenas pela presença do algodão, sem conter nenhum composto, enquanto os demais tratamentos continham os seis compostos disponíveis comercialmente (Tabela 2).

## **4.3 Efeito dos compostos voláteis, disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre frutos de *C. sinensis* var. Valência apresentando sintomas de mancha preta dos citros, quando tratados em pós-colheita**

### **4.3.1 Obtenção dos frutos**

Os frutos foram colhidos em estágio de maturação adequado para exportação, em pomar comercial de laranja Valência no Estado de São Paulo (Fazenda Oriçanga, Mogi-Guaçu). Após a coleta dos frutos, estes foram selecionados visando um lote de tamanho médio e estágio de maturação uniformes, sendo que todos apresentavam lesões características de mancha preta dos citros. Os frutos foram desinfestados superficialmente utilizando hipoclorito de sódio (200 ppm). Os sintomas de *G. citricarpa* já existentes foram assinalados, com caneta para retroprojektor, para não serem computados com os desenvolvidos posteriormente aos tratamentos.

#### **4.3.2 Efeito dos compostos voláteis sobre os frutos de *C. sinensis* var. Valência apresentando sintomas de mancha preta dos citros**

Nestes experimentos foram utilizados os compostos que mais se destacaram nos testes *in vitro*, os quais foram 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol e octanoato de etila (caprilato).

Um chumaço de algodão contendo 637,6  $\mu\text{L}$  de cada um dos três compostos citados acima foram colocados separadamente no fundo de recipientes de vidro de 3 L com tampa plástica de rosca, sendo que este volume foi utilizado com base nos resultados obtidos *in vitro*. O volume de volátil inicial foi de 1912,8  $\mu\text{L}$ , três vezes acima do utilizado, volume esse equivalente a 50  $\mu\text{L}$  do composto em uma placa de poliestireno de 20 cm de diâmetro. Quando se testou o volume duas ou três vezes acima do inicial, os frutos quando em contato com os voláteis durante 7 dias, apresentaram odor característico de fermentação. Na sequência foram colocados os frutos sintomáticos (8 frutos), ficando os mesmos acima do algodão. Os experimentos consistiram de 5 repetições de 8 frutos totalizando 40 frutos por tratamento. Sendo a testemunha representada apenas pelo algodão sem nenhum composto. Os recipientes foram mantidos em temperatura controlada de 25° C e os frutos permaneceram dentro dos potes durante 7 dias. Após a retiradas dos frutos dos recipientes, os mesmos continuaram em temperatura de 25° C e umidade relativa de 85%. As avaliações foram realizadas de 7 em 7 dias, totalizando 21 dias, sendo feita uma avaliação logo após a retirada dos frutos dos recipientes de vidro e duas com os frutos fora do recipiente, sendo assim realizadas três avaliações por experimento. Foram realizados diversos experimentos, seguindo esta mesma metodologia. As avaliações foram feitas através da contagem do aparecimento de novas lesões em comparação com a testemunha, verificando se existe efeito dos compostos voláteis.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Potencial dos extratos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes*, *A. blazei* e da suspensão de *S. cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros em frutos de *C. sinensis* var. Valência quando associados a baixa temperatura

O principal sintoma observado nos frutos em pós-colheita foi a lesão do tipo mancha sardenta, sendo estas lesões de coloração pardo-avermelhadas, pequenas, circulares que, normalmente, não exibem frutificações do fungo (Figura 4). Essas lesões originam-se de infecções latentes formadas nas fases de desenvolvimento dos frutos, sendo que sua ocorrência dá-se principalmente quando os frutos encontram-se armazenados em ambiente de temperatura mais elevada. Do ponto de vista comercial, essas lesões constituem-se em problema de importância relevante quando o alvo desejado é principalmente o mercado externo, uma vez que as mesmas frequentemente tornam-se mais evidentes alguns dias após a colheita, coincidindo com o tempo de chegada ao local de destino (FUNDECITRUS, 2004).



**Figura 4** - Lesão do tipo mancha sardenta, causada por *G. citricarpa*, em fruto de laranja Valência. Principal sintoma observado em pós-colheita.

Com base nos resultados do primeiro e do segundo experimento, é possível observar o número de lesões nos frutos em relação ao tempo e em cada tratamento (Figuras 5 e 7). No sétimo, no décimo-quarto e no vigésimo primeiro dia de avaliações,

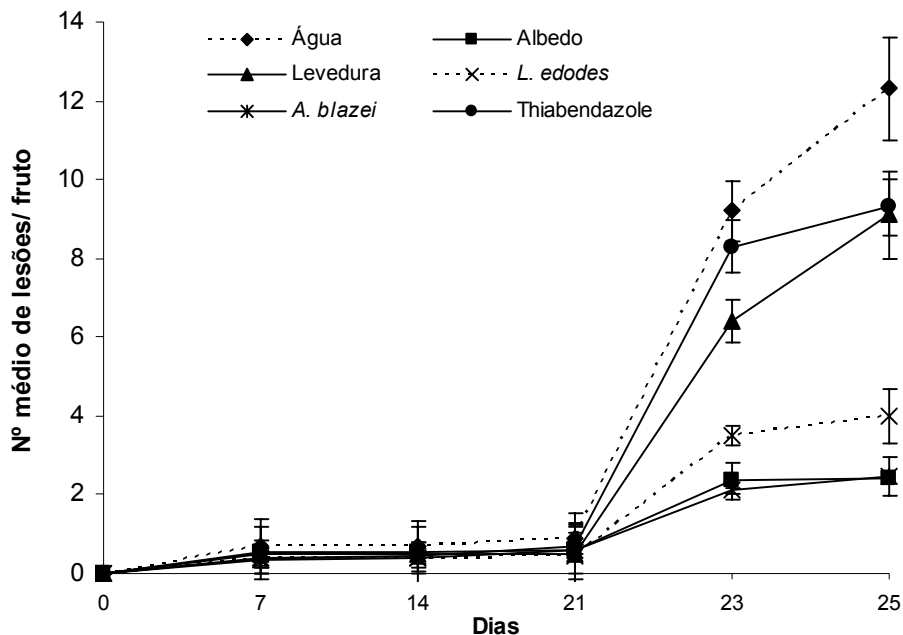
não foi possível observar diferenças entre os tratamentos, período no qual os frutos permaneceram em temperatura de 3 °C. Porém, a partir do vigésimo primeiro dia até o final do experimento (última avaliação), período no qual os frutos permaneceram em temperatura de 25 °C, foi possível observar que os três agentes bióticos (albedo, *L. edodes* e *A. blazei*) reduziram o aparecimento de novas lesões nos frutos, sendo que os extratos do albedo e do *A. blazei* apresentaram um desempenho melhor do que o de *L. edodes*. Os resultados mostrados nas Figuras 6 e 8, relacionados ao último dia da avaliação (vigésimo quinto), evidenciam que os três agentes (albedo, *L. edodes* e *A. blazei*) demonstraram maior inibição no aparecimento de novas lesões, quando comparados com a água, o Thiabendazole e o extrato aquoso da levedura *S. cerevisiae*. Os tratamentos com o albedo de *C. sinensis* var. Valência e o cogumelo *A. blazei* proporcionaram os melhores resultados, quando comparados com os outros agentes, porém os mesmos não diferiram do *L. edodes*, o qual diferiu da levedura do fungicida e da água. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Toffano (2005), onde foi possível observar a inibição no aparecimento de novas lesões causadas por *G. citricarpa* em frutos de laranja tratados com os extratos aquosos do albedo de laranja Valência, *L. edodes* e *A. blazei*. Portanto, foi possível observar que mesmo após a refrigeração, continuou a inibição no aparecimento de novas lesões. Porém, em todo o período em que os frutos permaneceram sob baixa temperatura (21 dias), praticamente não houve o aparecimento de novas lesões, mostrando que a refrigeração inibe o desenvolvimento da doença (Figuras 5 e 7).

A literatura mostra inúmeros trabalhos, onde frutos cítricos, em pós-colheita, têm mecanismos de resistência ativados, como as fitoalexinas (escoparona e escopoletina), em resposta a diferentes tipos de agentes bióticos e abióticos (ARRAS, 1996; RODOV et al., 1994; ALI; LEPOIVRE; SEMAL, 1991), levando a uma redução nos sintomas das doenças. Contudo, nesses trabalhos, os frutos foram tratados primeiramente com os agentes, metodologia que difere da empregada neste ensaio, onde os frutos foram tratados depois que o patógeno estava estabelecido, pois os frutos vieram com inóculo de campo (presença de lesões). Dessa maneira, não se pode afirmar se houve alteração no metabolismo dos frutos ou se ocorreu ação direta dos agentes sobre o patógeno. Neste trabalho, o extrato foi de origem aquosa, havendo uma diluição do

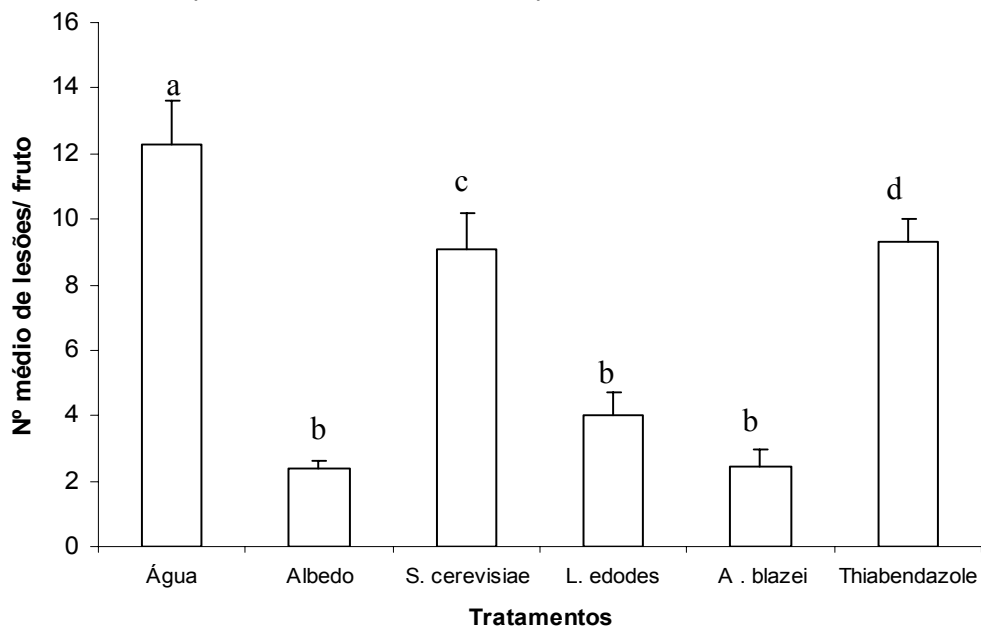
albedo moído em água, porém era possível observar algumas partículas deste material suspensas na água. Assim não é possível afirmar que os mesmos compostos que atuaram no extrato metanólico sejam os mesmos que estariam atuando no extrato aquoso. Porém, em trabalho realizado por Toffano (2005), foi possível observar que o extrato etanólico extraído do albedo de laranja Valência apresentou atividade inibitória *in vitro* no crescimento micelial germinação e formação de apressório por *G. citricarpa*. Cardoso Filho (2003) demonstrou que o extrato etanólico do albedo de laranja Pêra, apresentou inibição na germinação e formação de *G. citricarpa*, indicando que provavelmente ocorreu ação direta do extrato do albedo sobre o patógeno. Quanto aos extratos dos cogumelos, existem trabalhos, porém, realizados em plantas como fumo, pepino e maracujá, (PICCININ, 2000; DI PIERO; PASCHOLATI 2001), onde demonstrou-se aumentos na quantidade de proteínas relacionadas a patogênese ( $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase e peroxidase) quando as plantas foram tratadas. Assim, os extratos aquosos de *A. blazei* e *L. edodes* poderiam ter ativado mecanismos de defesas nos frutos de laranja. A refrigeração mostrou-se eficiente, no controle da mancha preta dos citros, e os extratos aquosos do albedo, do *L. edodes* e *A. blazei* complementaram este controle, mesmo após os frutos estarem em temperatura ambiente.

Em estudos futuros seria interessante que houvesse a identificação e possível estudo das alterações dos compostos presentes no albedo de *Citrus sinensis*, já que o albedo de laranja é um produto de fácil acesso e aparentemente um agente sem perigo ao meio ambiente. Quanto aos cogumelos, seria interessante a identificação de proteínas e compostos que são produzidos.

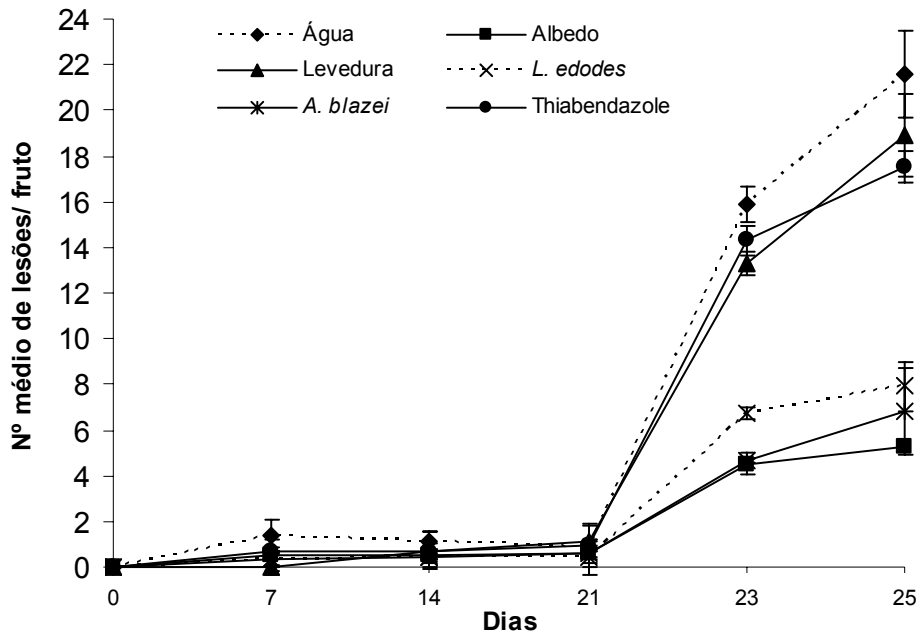




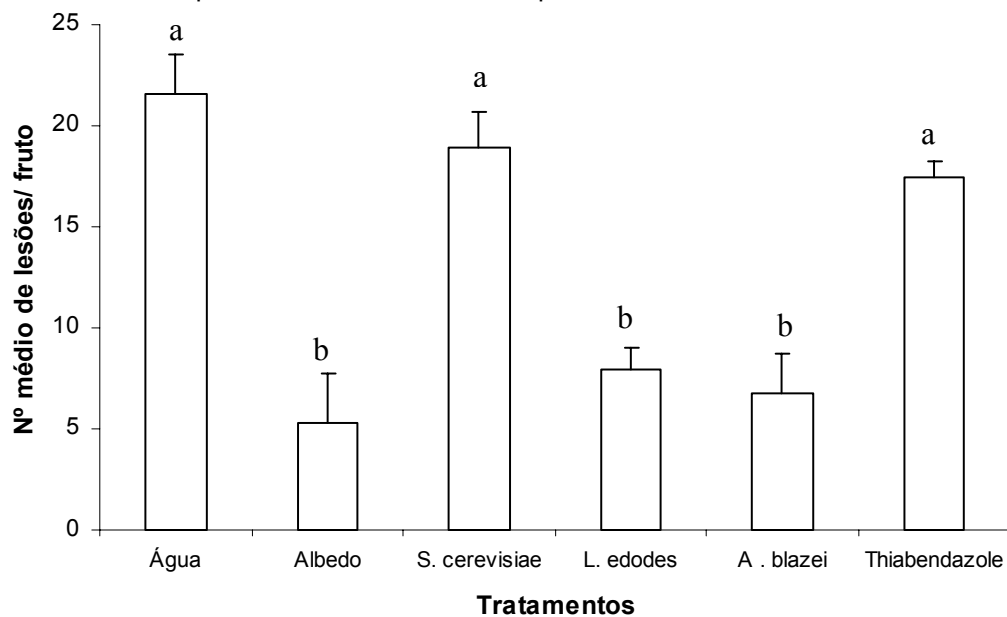
**Figura 5** - Efeito dos extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes*, *A. blazei* e da suspensão de *S. cerevisiae*, aplicados em frutos de *C. sinensis* var. Valência, na expressão dos sintomas causados por *G. citricarpa* (1º experimento). Até o vigésimo primeiro dia os frutos permaneceram a 3º C e posteriormente a 21º C. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 6** - Efeito dos extratos aquosos do albedo de *C. sinensis* var. Valência, *L. edodes*, *A. blazei*, e da suspensão de *S. cerevisiae*, aplicados em frutos de *C. sinensis* var. Valência na expressão dos sintomas causados por *G. citricarpa* (1º Experimento). Último dia de avaliação. Barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P = 0,05$ ).



**Figura 7** - Efeito dos extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes*, *A. blazei* e da suspensão de *S. cerevisiae*, aplicados em frutos de *C. sinensis* var. Valência, na expressão dos sintomas causados por *G. citricarpa* (2º experimento). Até o vigésimo primeiro dia os frutos permaneceram a 3º C e posteriormente a 21º C. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 8** - Efeito dos extratos aquosos do albedo de *C. sinensis* var. Valência, *L. edodes*, *A. blazei*, e da suspensão de *S. cerevisiae*, aplicados em frutos de *C. sinensis* var. Valência na expressão dos sintomas causados por *G. citricarpa* (2º Experimento). Último dia de avaliação. Barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P = 0,05$ ).

## 5.2 Efeito dos compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* sobre *G. citricarpa* em frutos de *C. sinensis* var. Valência em pós-colheita

O principal sintoma observado nos frutos em pós-colheita também foi a lesão do tipo mancha sardenta (Figura 4).

Com base nos resultados obtidos tanto do primeiro experimento como do segundo, é possível observar o aparecimento de novas lesões nos frutos em relação ao tempo e em cada tratamento (Figuras 9 e 10). Vale ressaltar que até o sétimo dia de avaliação, os frutos permaneceram dentro dos potes e em contato com os voláteis, nas outras duas avaliações (aos 14 e 21 dias) os frutos estavam apenas em temperatura e umidade controlada (25° C e 85% U.R.) e sem contato com os voláteis. Na primeira avaliação (7 dias) já foi possível observar nos dois experimentos que os tratamentos que continham o fungo *S. cerevisiae* apresentaram inibição no aparecimento de novas lesões. A partir da segunda avaliação (14 dias) e na terceira (21 dias) foi possível observar que o tratamento no qual a levedura havia sido repicada na hora em que ela foi colocada no pote, apresentou maior inibição no aparecimento de novas lesões, quando comparada com a levedura que havia sido repicada 24 h antes da mesma ser colocada nos potes, indicando que os voláteis de maior interesse para o controle do fitopatógeno são produzidos na fase inicial, nas primeiras 24 h, de crescimento da levedura (Figuras 9 e 10).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Fialho (2004), onde foi possível observar que esta mesma linhagem da levedura utilizada a CR-1, apresentou efeito na inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa in vitro*.

Existem diversos trabalhos utilizando leveduras *in vitro*, as quais inibiram o desenvolvimento de vários microrganismos. Walker et al. (1995) demonstraram atividade inibitória de 17 isolados de leveduras contra diversos fungos de importância agrônômica, ambiental e clínica. Dentre estes, as três linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas tiveram forte ação antagônica contra fungos deterioradores de madeira (*Serpula lacrymans*, *Postia placenta*, *Lentinus lepideus* e *Ophiostoma ulmi*) e fungos fitopatogênicos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *Botrytis fabae* e *Phytophthora infestans*).

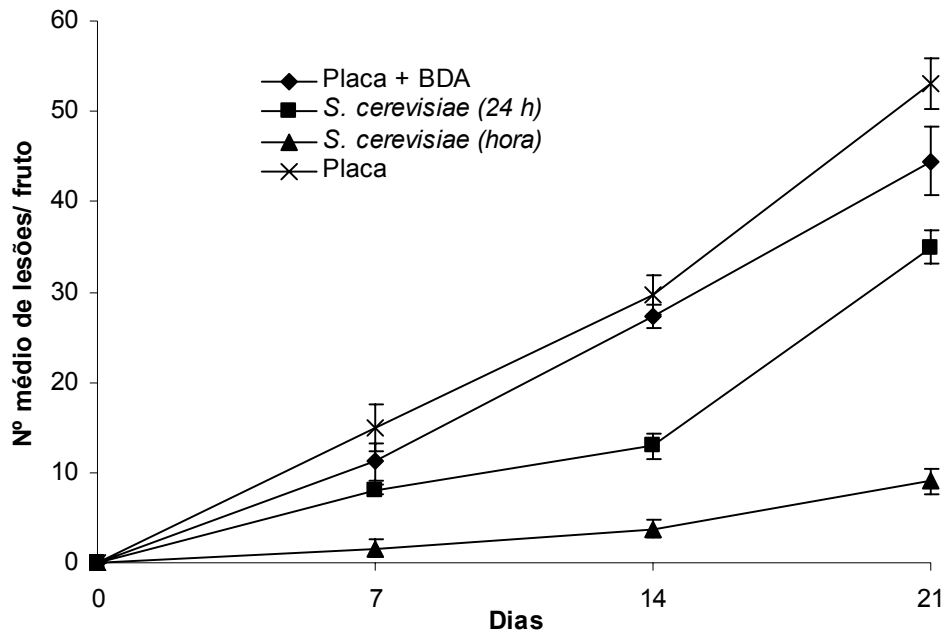
As espécies de levedura epífitas isoladas de abacaxi e identificadas como *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus albidus*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodoturula aurantiaca* e *Rhodoturula glutinis* inibiram (25-50%) o crescimento micelial *in vitro* de *Ceratocystis paradoxa*, agente causal da podridão negra em abacaxi em pós-colheita e também diminuíram a severidade da doença quando a mistura de leveduras foi aplicada nos frutos (REYES et al., 2004). Ensaio em placa, utilizando quatro isolados da levedura *Metschnikowia pulcherrima*, mostraram redução do crescimento vegetativo de patógenos de maçãs em pós-colheita, sendo a inibição de até 31,3 e 18,8% para *Alternaria* sp. e *Botrytis cinerea*, respectivamente, e 20,8% para *Penicillium expansum* e *Monilia* sp. (SPADARO et al., 2002). Desta forma, pode-se admitir, simplesmente, que na concentração e tempo de exposição avaliado, a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de inibir o aparecimento de novas lesões nos frutos.

Alguns trabalhos mostram que o uso de leveduras em pós-colheita é efetivo no controle de infecções ocorridas através de ferimentos, durante a colheita (IPPOLITO E NIGRO, 2000). Entretanto, falham no controle de infecções previamente estabelecidas, como no caso das infecções latentes (JANISIEWICZ, 1998). Além disso, existe uma tendência na literatura, que no caso das infecções latentes, o uso de agentes de controle seria mais eficaz quando aplicados na pré-colheita, na fase do florescimento, antes do estabelecimento do patógeno (LIMA et al., 1997; WITTIG et al., 1997; IPPOLITO E NIGRO, 2000).

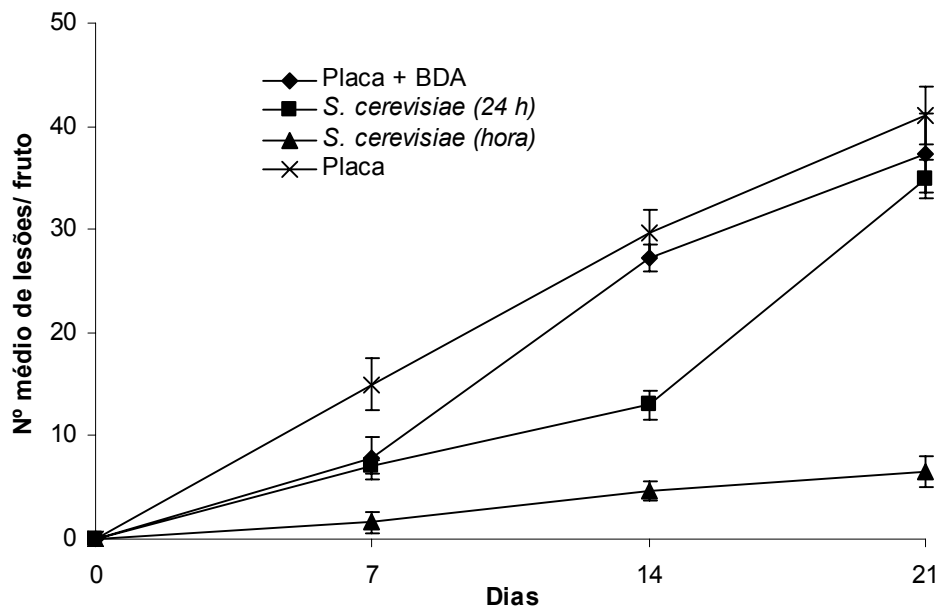
A literatura mostra que uma variedade de indutores bióticos e abióticos podem induzir respostas de defesas em pós-colheita, entretanto, são estudos isolados, enfatizando um ou outro mecanismo de indução de resistência (WILSON et al., 1994). Porém, muitos autores (WISNIEWSKI E WILSON, 1992; WILSON et al., 1994) acreditam que a combinação de diversos agentes bióticos e abióticos, aplicados simultaneamente, seja a chave para o biocontrole de fitopatógenos em pós-colheita.

Apesar da suspensão de *S. cerevisiae* não ter apresentado inibição no aparecimento de novas lesões quando comparada com a testemunha, tanto no último dia de avaliação quanto ao longo das avaliações em frutos de *C. sinensis*, os compostos voláteis produzidos pela mesma apresentaram inibição no surgimento de

novas lesões, indicando que existem compostos de origem volátil produzidos pela *S. cerevisiae* que inibem o desenvolvimento da doença.



**Figura 9** - Efeito dos compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae*, na controle da mancha preta dos citros em frutos de *C. sinensis* var. Valência (1º experimento). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. (hora) levedura repicada e utilizada imediatamente; (24h) levedura repicada e utilizada 24 h depois



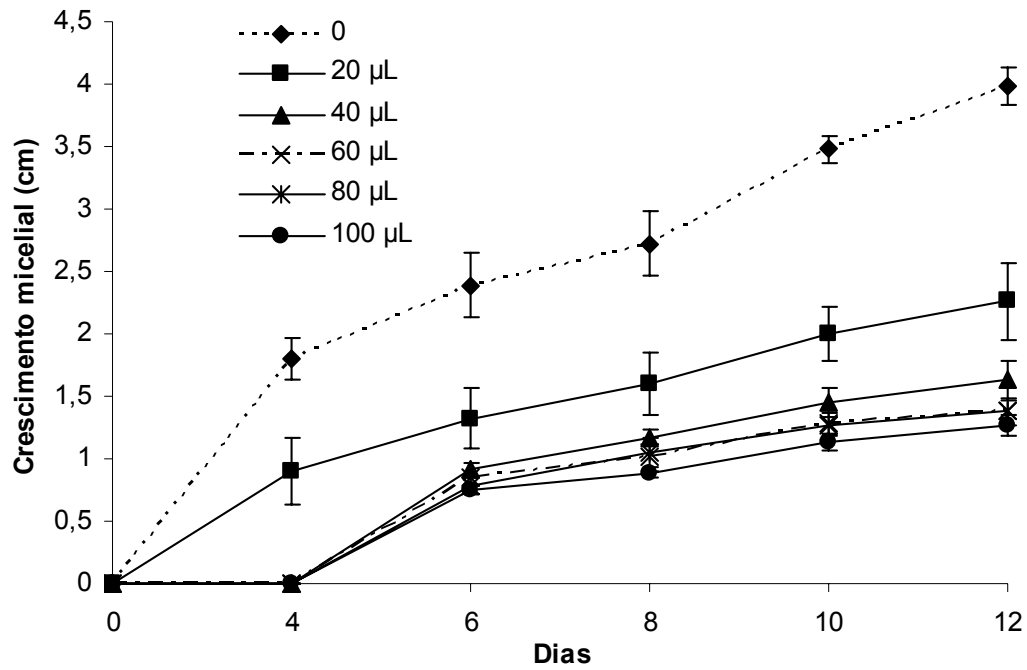
**Figura 10** - Efeito dos compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae*, no controle da mancha preta dos citros em frutos de *C. sinensis* var. Valência (2º experimento). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. (hora) levedura repicada e utilizada imediatamente; (24h) levedura repicada e utilizada 24 h depois

### **5.3 Efeito dos compostos voláteis identificados a partir de *S. cerevisiae* sobre *G. citricarpa* *in vitro* e em frutos de *C. sinensis* var. Valência em pós-colheita**

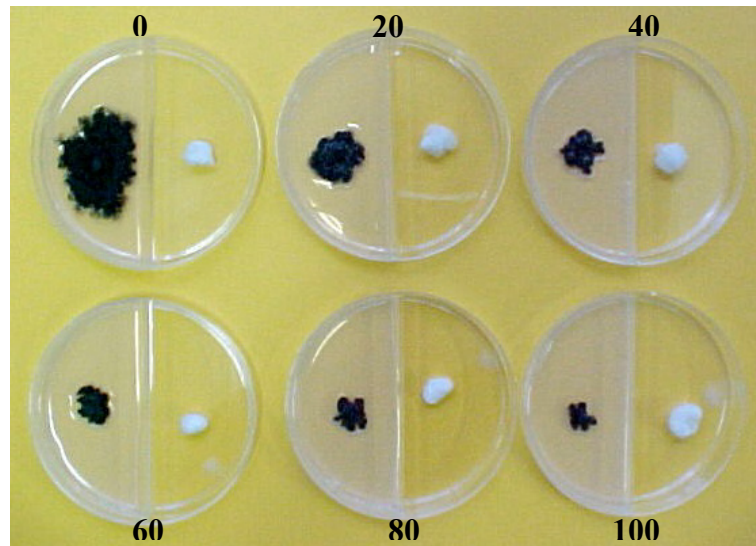
#### **5.3.1 Efeito *in vitro* da mistura artificial dos compostos voláteis, disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae* sobre *G. citricarpa***

Em função da identificação dos componentes presentes na atmosfera gasosa, produzida por *S. cerevisiae*, através de SPME-GC-MS (*Solid Phase Microextraction*) – (*Gas chromatography*) - (*Mass Spectral*) (Tabela 1), foi produzida uma mistura artificial contendo todos os compostos positivamente identificados e disponíveis comercialmente (Tabela 2). A concentração de cada composto presente na mistura foi baseada na sua proporção relativa (estimada através da área) em relação a todos os outros componentes da mistura. O fitopatógeno foi exposto a essa mistura artificial e avaliada a influência da mesma. Este experimento foi realizado, pois não se tinha conhecimento de qual concentração utilizar com os compostos separados, razão por que foram testadas diferentes concentrações (Figuras 11 e 12).

Como é possível observar, a partir de 20 µL a mistura exerce redução do crescimento micelial de *G. citricarpa* (Figuras 11 e 12). Ao longo das avaliações foi possível verificar que com o aumento da concentração da mistura ocorre o aumento da inibição sobre o crescimento micelial. De acordo com o dados observados é possível determinar que nos tratamentos contendo 60, 80 e 100 µL, houve uma alta inibição quando comparados com a testemunha (0 µL). Em vista destes resultados foi escolhida a concentração de 60 µL, para uso nos experimentos subsequentes, pois a mesma apresentou inibição significativa no crescimento do fungo.



**Figura 11** - Efeito da mistura artificial em diferentes concentrações dos voláteis ( $\mu\text{L}$ ) identificados a partir da *S. cerevisiae* sobre o crescimento micelial *in vitro* de *G. citricarpa*. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 12** - Efeito da mistura artificial, 12 dias após a repicagem, em diferentes concentrações dos voláteis (0, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{L}$ ) identificados a partir da *S. cerevisiae* sobre o crescimento micelial *in vitro* de *G. citricarpa*

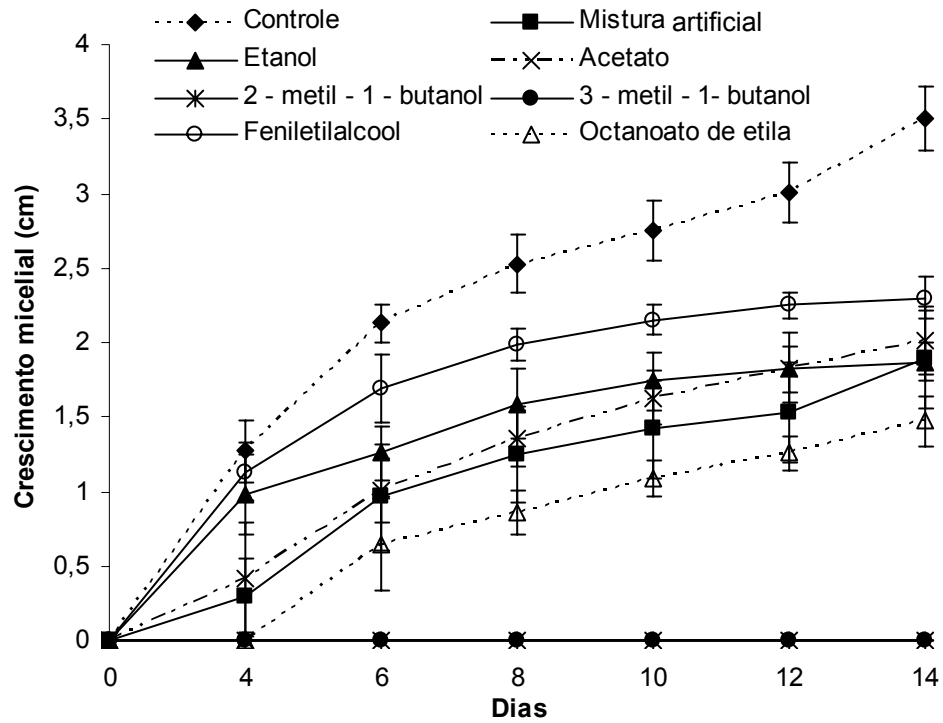


### **5.3.2 Efeito dos compostos voláteis, disponíveis comercialmente, sobre o crescimento micelial, germinação e formação de apressório por *G. citricarpa***

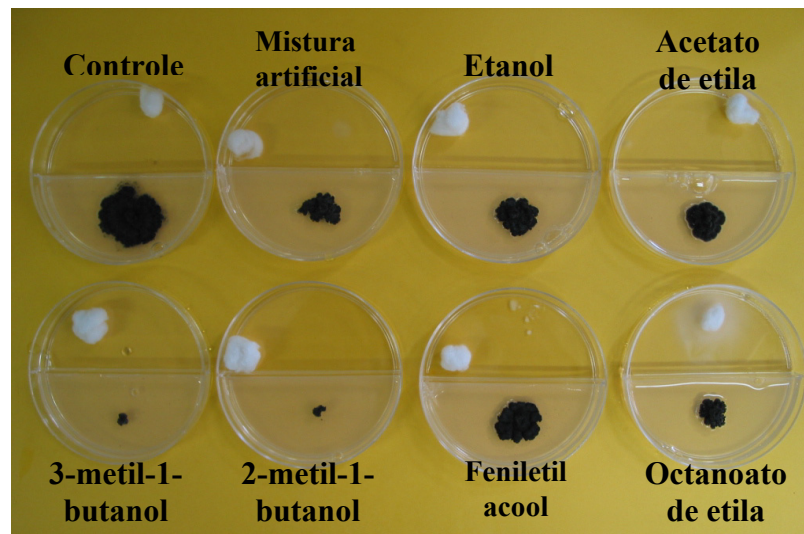
De acordo com as Figuras 13 e 14, os compostos 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol apresentaram inibição total do crescimento micelial de *G. citricarpa*, sendo que de acordo com o gráfico, em todas as avaliações o crescimento micelial do fungo exposto a estes dois compostos foi zero. Seguindo do 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, o octanoato de etila também apresentou inibição, embora menor, no crescimento micelial. Finalmente, esses compostos foram seguidos pela mistura dos mesmos, pelo etanol e feniletil álcool, os quais também apresentaram alguma inibição quando comparados com o controle.

Quanto a germinação e formação de apressórios, os compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol inibiram em 100% a germinação e conseqüentemente a formação de apressórios (Figuras 15 e 16). Os demais tratamentos diferiram do controle, porém, o octanoato de etila, acetato de etila, feniletil álcool e a mistura artificial não diferiram entre si. Em vista deste resultados, foram escolhidos três compostos para serem testados *in vivo*, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butano e octanoato de etila (caprilato).

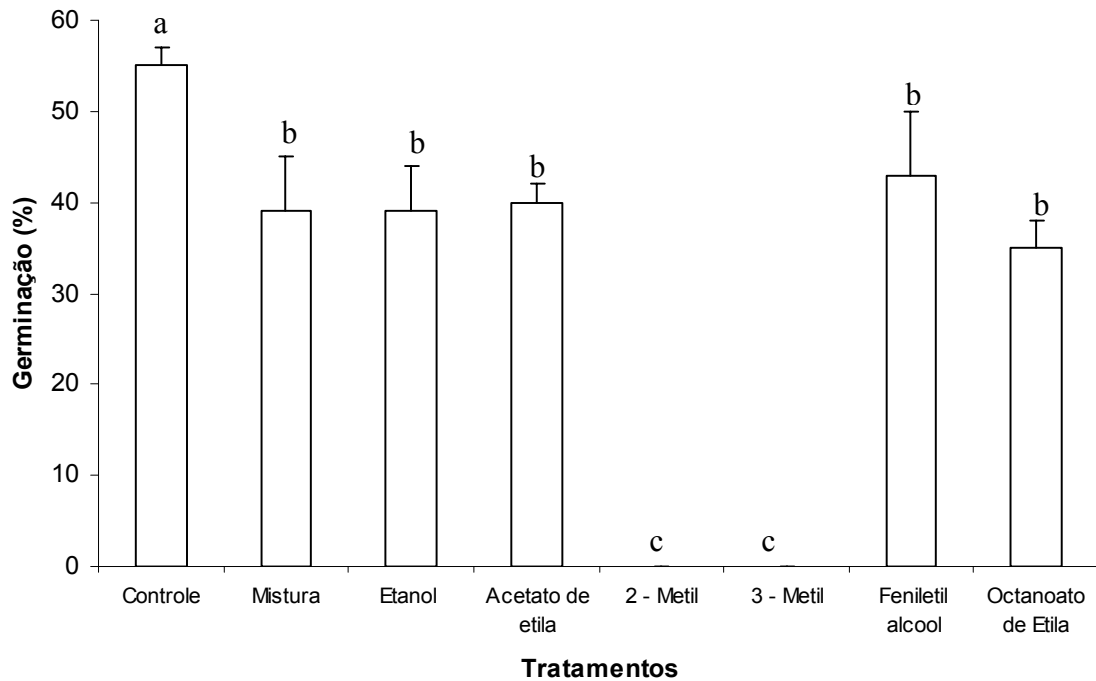
Em trabalho realizado por Fialho (2008), foi verificado que os compostos voláteis 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, apresentaram inibição sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*. Portanto este trabalho está de acordo com os resultados obtidos, porém, estudos envolvendo concentrações menores poderiam ser realizados.



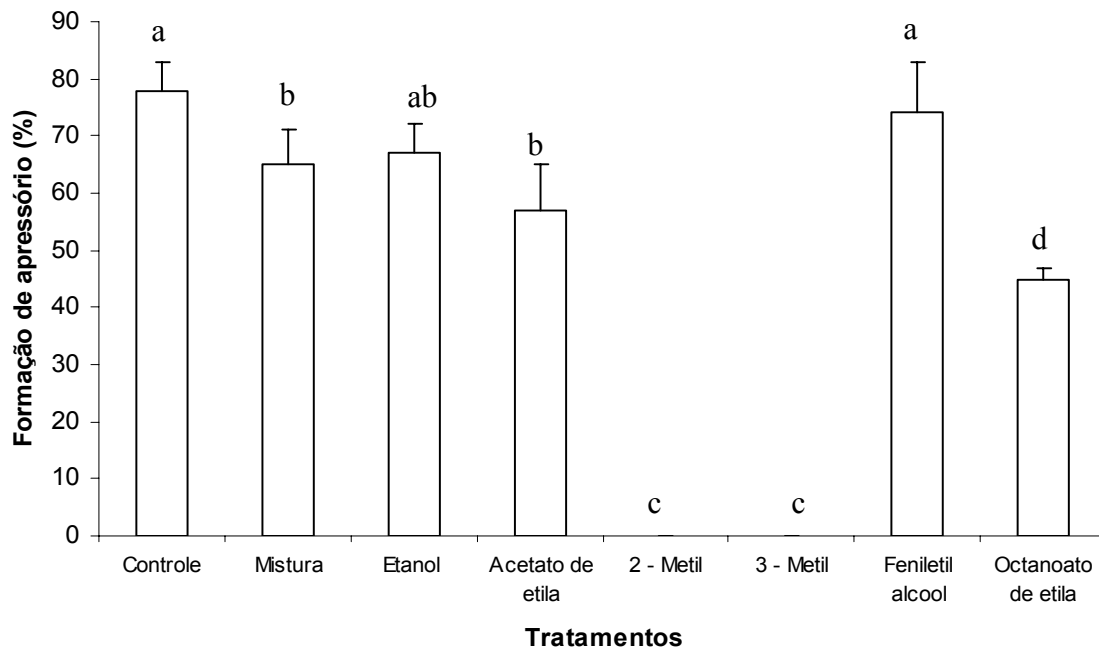
**Figura 13** - Efeito dos compostos voláteis (60  $\mu$ L), identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre o crescimento micelial *in vitro* de *G. citricarpa*. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 14** - Efeito dos compostos voláteis (60  $\mu$ L), identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre o crescimento micelial de *G. citricarpa*. Foto obtida 14 dias após a repicagem.



**Figura 15** - Efeito dos compostos voláteis disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre a germinação de esporos de *G. citricarpa*. Avaliação efetuada após 24 h. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P = 0,05$ ).



**Figura 16** - Efeito dos compostos voláteis disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre a formação de apressório por *G. citricarpa*. Avaliação efetuada após 24 h. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P = 0,05$ ).

### **5.3.3 Efeito dos compostos voláteis identificados e disponíveis comercialmente, obtidos a partir da levedura *S. cerevisiae*, na redução dos sintomas da mancha preta dos citros sobre frutos de *C. sinensis* var. Valência**

O composto 3-metil-1-butanol foi o que apresentou maior inibição no aparecimento de novas lesões, sendo que essa inibição foi possível de ser observada desde a primeira avaliação (7 dias) até a última (21 dias) (Figuras 17 e 18). O 2-metil-1-butanol também controlou o aparecimento da novas lesões nas três avaliações. Os frutos permaneceram expostos aos voláteis até a primeira avaliação (7 dias), sendo que depois até o vigésimo primeiro permaneceram uma câmara com temperatura de 25 °C e 85% UR. O composto octanoato de etila (caprilato) se comportou da mesma forma que a mistura, onde os frutos apresentaram um menor número de lesões em todas as avaliações quando comparados com o controle. No segundo experimento, os resultados foram semelhantes ao primeiro, destacando-se os compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, os quais inibiram o aparecimento de novas lesões nos frutos de laranja Valência (Figuras 19 e 20).

Apesar dos compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol terem apresentado inibição no crescimento micelial de *G. citricarpa* e inibição no aparecimento de novas lesões em frutos de laranja, não existem trabalhos mostrando o uso destes compostos para o controle de doenças em frutos em pós-colheita. Porém, existem diversos trabalhos envolvendo voláteis no controle de microrganismos fitopatogênicos.

Mercier e Jiménez (2004) verificaram que os voláteis de *Muscodor albus* inibiram o desenvolvimento *in vitro* de *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *Colletotrichum acutatum* e *C. coccodes*. A fumigação de maçãs por 7 dias, com culturas de *M. albus*, crescendo em grãos de centeio autoclavados, controlaram completamente *P. expansum* e *Botrytis cinerea*. Por sua vez, *M. albus* também controlou significativamente *P. digitatum* em limões, após biofumigação dos frutos durante 24-72h (MERCIER; SMILANICK, 2005).

A atividade antimicrobiana de *Pichia anomala* (levedura) sobre *P. roqueforti*, em grãos de trigo, se deu através da produção de etanol e acetato de etila (DRUVEFORS; PASSOTH; SCHNURER, 2005). Os compostos orgânicos voláteis oriundos de plantas,

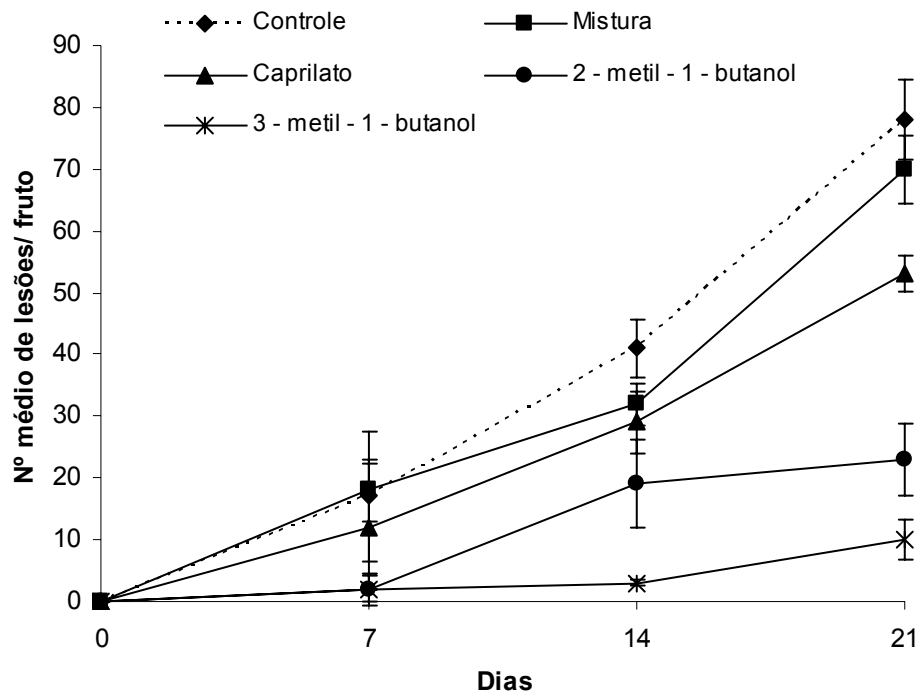
carvacrol, alil-isotiocianato e cinamaldeído inibiram o desenvolvimento de *P. notatum* e foram mais eficientes do que o etanol e dióxido de enxofre. Os mesmos autores verificaram sinergia entre os três compostos de forma que a combinação permitiu a redução da concentração individual dos mesmos (TUNC et al., 2007).

Os voláteis produzidos por *M. albus* e sua mistura artificial inibiram totalmente o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*, no entanto, também não foram letais para o fitopatógeno (ATMOSUKARTO et al., 2005).

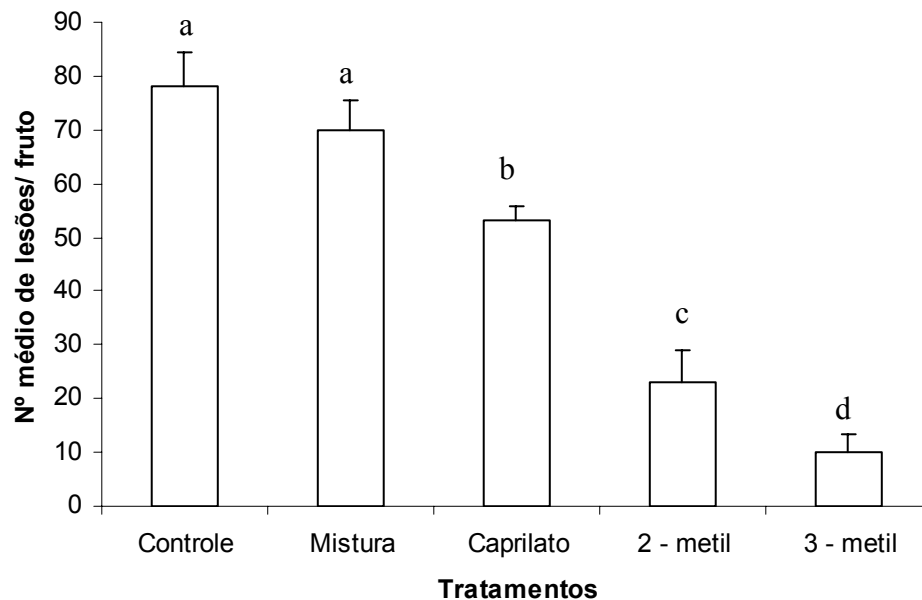
Foi relatado por Mercier e Jimenez (2004) que diversas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, além de outros gêneros de fungos, foram inibidos pelos compostos voláteis produzidos por *M. albus*. No entanto, *Trichoderma viride* foi o único fungo que não foi afetado. Os autores sugeriram que pelo fato desse fungo também ser um produtor de voláteis antimicrobianos, é provável que ele possua mecanismos de resistência contra voláteis, entre eles os produzidos por *M. albus*.

O cianeto de hidrogênio (HCN) é provavelmente o exemplo mais conhecido de composto volátil envolvido no biocontrole (HAAS; KEEL; REIMMANN, 2002). Estudos empregando mutantes de *Pseudomonas fluorescens*, defectivos na biosíntese de HCN, demonstraram que o volátil possui papel na supressão de *Thielaviopsis basicola*, agente causal da podridão parda da raiz em plantas de fumo (VOISARD et al., 1989). Com relação às estratégias de defesa em fungos contra HCN, foi sugerido que a exposição prolongada a agentes de biocontrole produtores de HCN podem selecionar patógenos contendo vias de respiração resistentes ao volátil (HANDELSMAN; STABB, 1996). Além disso, Osbourn (1996) relatou que uma ampla gama de fitopatógenos fúngicos pode tolerar HCN e para alguns desses fungos, incluindo *Microcyclus ulei*, essa tolerância é atribuída à respiração resistente ao HCN.

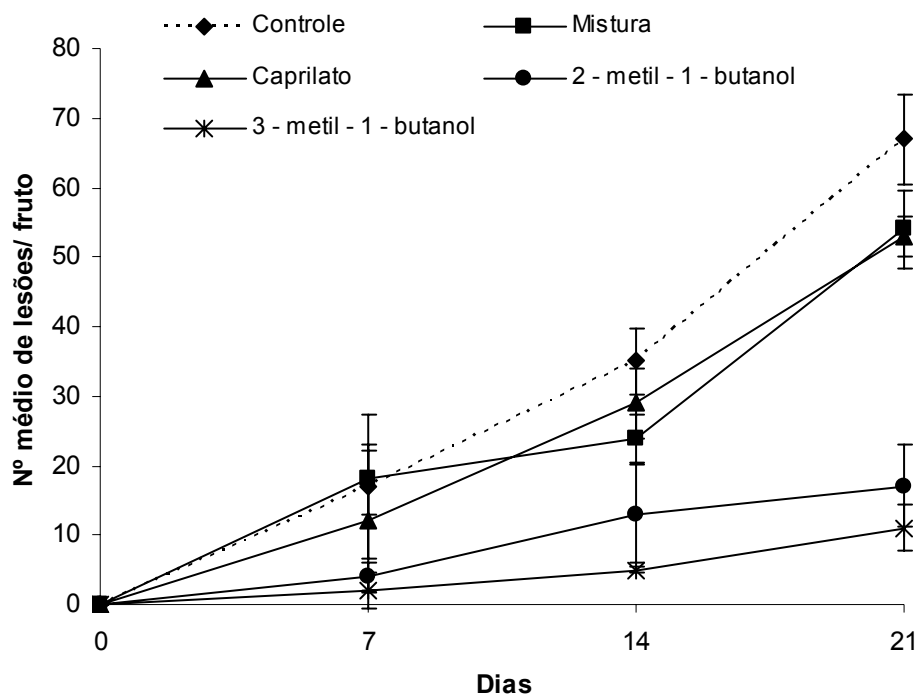
Em vista dos resultados obtidos, estudos envolvendo níveis tóxicos para o manuseio e os locais aonde estes compostos poderiam ser utilizados, devem ser conduzidos. Assim, existem possibilidades de se utilizar estes gases em containeres durante o transporte de frutos para exportação, e até mesmo, tratamento dos frutos em casas de embalagens. Além disso, estudos devem ser realizados para se verificar qual seria a melhor maneira para disponibilização destes gases (líquido, sólido ou em pastilhas).



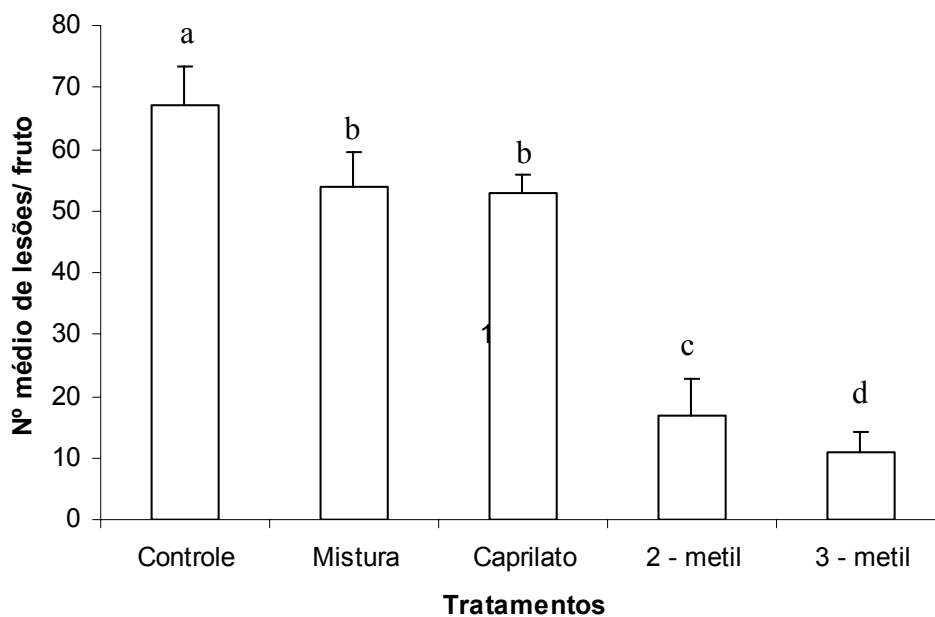
**Figura 17** - Efeito dos compostos voláteis disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre frutos de laranja Valência, no aparecimento de sintomas de mancha preta (1º experimento). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 18** - Efeito dos compostos voláteis disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre frutos de laranja Valência, no aparecimento de sintomas de mancha preta (1º experimento). Dados referentes ao último dia de avaliação (21 dias). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P = 0,05$ ).



**Figura 19** - Efeito dos compostos voláteis disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre frutos de laranja Valência, no aparecimento de sintomas de mancha preta (2° experimento). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 20** - Efeito dos compostos voláteis disponíveis comercialmente, identificados a partir da levedura *S. cerevisiae*, sobre frutos de laranja Valência, no aparecimento de sintomas de mancha preta (2° experimento). Dados referentes ao último dia de avaliação (21 dias). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P = 0,05$ ).

## 6 CONCLUSÕES

Os extratos aquosos do albedo de *C. sinensis*, *L. edodes* e *A. blazei* apresentam potencial como agentes de controle sobre a mancha preta dos citros em frutos de laranja (*C. sinensis* var. Valência), quando associados a refrigeração.

Os compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* inibiram a expressão de sintomas em frutos de *C. sinensis* var. Valência, quando tratados em pós-colheita.

Os compostos 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, identificados a partir de *S. cerevisiae*, apresentaram inibição sobre *G. citricarpa in vitro* e atuaram como agentes de controle sobre a mancha preta dos citros em frutos de laranja Valência, quando aplicados em pós-colheita.





## REFERÊNCIAS

ADASKAVEG, J.E.; FÖRSTER, H.; SOMMER, N.F. Principles of post harvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Oakland: University of California Publication, 2002. p. 163-195.

AGROFIT - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS**. Brasília. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons). Acesso: Junho 2009

ALCOBA, N.J.; VIGIANI, A.R.; BEJARANO, N.V.; ALVAREZ, S.E.; SERRANO, M.A.; BONILLO, M.C. **La mancha negra de los cítricos**. Jujuy: Ed. Universidad Nacional de Jujuy, 2000. 56p.

ALI, M.K.; LEPOIVRE, P.; SEMAL, J. Fosetyl-AI treatment of *Phytophthora citrophthora* releases a higher scoparone elicitor activity from fosetyl-AI sensitive strain mutant than from an insensitive mutant. **Fruits**, Parc d'activites de Courtaboeuf, v. 46, p. 51-55, 1991.

ALMEIDA, J.G.F. Barreiras às exportações de frutas tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.7-10, 2002.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Port Talbot, v. 109, p.195-200, 2007.

ARRAS, G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 8, p. 191-198, 1996.

ATMOSUKARTO, I.; CASTILLO, U.; HESS, W.M.; SEARS, J.; STROBEL, G. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. **Plant Science**, Amsterdam, v. 169, p. 854-861, 2005.

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 15, p. 668-674, 1940.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN der Aa, H.A.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI Jr., W.; de BLANCO, C.G.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 464-477, 2002.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.F. Freeman, 1974. 433p.

BALDASSARI, R.B. **Influência de frutos sintomáticos de uma safra na incidência da *Guignardia citricarpa* na safra subsequente e período de suscetibilidade de frutos de laranjeira 'Natal' e 'Valência'**. 2001. 60p. Dissertação (M.S.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001.

BALDASSARI, R.B.; GOES, A.; SANTOS, J.M.; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, n.1, p.88-92, 2001.

BENATO, E.A.; CIA, P.; SOUZA, N.L. Manejo de doenças de frutas pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 403-441, 2001.

BRODRICK, H.T. Toxicity of limonene and citrus peel extracts to *Guignardia citricarpa* (Kiely). **Phytophylactica**, Pretoria, v. 3, p. 69-72, 1971.

BROWN, G.E.; DAVIS, C.; CHAMBERS, M. Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 18, p. 57-65, 2000.

BROWN, G.E. Resistance of decay fungi to benzimidazole fungicides used in Florida citrus packinghouses. **Proceedings of the Florida State Horticulture Society**, Winter Haven, v. 95, p. 239-242, 1982.

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

CALAVAN, E. C. Black spot of citrus. **California Citrograph**, Los Angeles, v. 46, p. 22-24, 1960.

CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acibenzolar-S-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHITARRA, M.I. F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manejo**. Lavras: ESA/FAEPE, 1990. 320p.

COHEN, E. Methods of degreening satsuma mandarin. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Berkeley, v. 2, p. 748-750, 1983.

COOK, R.J.; BAKKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 615p.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.205, 2003. Suplemento.

DEISING, H.B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S.F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 286-295, 2008.

DI PIERO, R.M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos**. 2003. 157p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Atividade de quitinase induzida por Shiitake (*Lentinula edodes*) em folhas de pepino protegidas contra *Colletotrichum lagenarium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, suplemento, p. 391, 2001. Resumo.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 58-63, 2004a.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 243-250, 2004b.

DI PIERO, R.M.; GARCIA, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CALVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 29-50. 2005.

DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal of Science**, Pretoria, v.26, p.320-325, 1929.

DONAHAYE, E.J. Current status of non-residual control methods against stored product pests. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 571-576, 2000.

DRUVEFORS, U.A.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J. Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 1865-1869, 2005.

ECKERT, J.W. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. In: GREEN, M.B.; LE BARON, H.M.; MOBERG, W.K. (Ed.). **Managing Resistance to Agrochemicals. American Society Symposium**, Washington, v. 421, p. 286-302, 1990.

EL-TOBSHY, Z.; SINCLAIR, J. B. Inhibition *in vitro* of *Phomopsis citri* by extracts from orange and by fungicides. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 48, p. 925- 27, 1964.

FAGAN, C.; GÓES, A. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranja 'Natal' e 'Valência'. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, n.1, p.122, 2000.

FAO. **Oranges; tangerines, mandarins, clementines and satsuinias; lemons and limes, grapefruit and pumelos**. Roma. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em : maio 2009.

FEICHTENBERGER, E. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.17, p.93-108, 1996.

FEICHTENBERGER, D.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO M.B.; BELASQUE J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 475-476.

FIALHO, M.B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FIALHO, M.B. **Mecanismo de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos produzidos por *Sacharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 69p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

FNP - CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus. In: \_\_\_\_ **Agrianual 2009: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2009. p. 267-300.

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

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre Pinta Preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 2003. 10 p. (Boletim Técnico, Edição especial).

FUNDECITRUS. Nova avaliação. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, n. 122, p. 8-9, 2004.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 78p.

GÓES, A. de; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (Mc.Apl.) Van der Aa. (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p.138, 1993. Suplemento. /Apresentado ao 26., Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Aracaju, 1993. Resumo.

GÓES, A. de; GRAÇA, J.; BARROS, J. M. de; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina "Rio" (*Citrus deliciosa*) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 122. 1988 Suplemento. /Apresentado ao 21., Congresso De Fitopatologia, Salvador, 1988. Resumo.

GÓES, A. de; GRAÇA, J.; BARROS, J. C. S. M; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina Rio (*Citrus deliciosa*) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, p. 73-75, 1990.

GÓES, A. de; BARROS, J. C. S.M. de; GRAÇA, J.; CASTRO, N. G.; MARTINS, S. P. Determinação da época de produção de infecções latentes produzidas por *Phyllosticta citricarpa* em frutos de tangerina "Rio". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 34, 1991. Suplemento. /Apresentado ao 24., Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Rio de Janeiro, 1991. Resumo.

GRIGELMO-MIGUEL, N.; MARTIN-BELLOSO, O. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. **Food Research International**, Ontario, v.31, n.5, p.355-361, 1999.

GULLINO, M.L.; KUIJPERS, L.A.M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, 559-579, 1994.

HAAS, D; KEEL, C; REIMMANN, C. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 385-395, 2002.

HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

HENZ, G.P. Doenças de pós-colheita de hortaliças. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.14-16, 2002.

HUMPHRIS, S.N.; BRUCE, A.; BUULTJENS, T.E.J.; WHEATLEY, R.E. The effects of volatile secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 210, p. 215-219, 2002.

HOUCK, L.G. Problems of resistance to citrus fungicides. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Winter Haven, v. 1, p. 263-269, 1977.

IPPOLITO, A.; NIGRO, F. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, p. 715-723, 2000.

JANISIEWICZ, W, J. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits. Challenges and opportunities. In: BOLAND, G. J.; KUYKENDALL, L. D. (Ed.). **Plant-microbe interactions and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.171-197.

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

KAWAGISHI, H.; KANAO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1→6)-β-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of resulting products. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 12, n. 4, p. 393-403, 1990.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New SouthWales**, Sydney, v.93, p.249-292, 1948.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial and non-parasitic diseases and injuries originating in the seed, nursery, and orchard. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1978. 66 p.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, New York, v. 65, p. 945-950, 1981.



KOTZÉ, J.M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 1988. p. 10-12.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L. de; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v.2, cap.8, p.263-304.

MAZZUZ, C.F. **Calidad de frutos cítricos**: manual para sugestion desde la recolección hasta la expedición. Barcelona: Ediciones de Horticultura, 1996. 317p.

McLAUGHLIN, R.J.; WISNIEWSKI, M.E.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 456-461, 1990.

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

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

MERCIER, J.; WILSON, C.L. Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 6, p. 9-15, 1995.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889 -2896, 1990.

NARDO, E.A.B. de; CAPALBO, D.M.F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1998. v.1, cap.8, p.231-262.

OSBOURN, A.E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1821-1831, 1996.

PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A.; PACUMBABA, R.O. Shiitake mycelial leachate upresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean *in vitro*. **Plant Disease**, New York, v. 83, n. 1, p. 20-23, 1999.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123p. Tese (Livredocência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; PICCININ, E. **Cogumelos: cultivo e comercialização (Shiitake e Cogumelo do Sol)**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1998. 78 p. (Coleção Agroindústria, v. 17)

PETRACEK, P.D.; MONTALVO, L. The degreening of ‘Fallglo’ tangerine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.122, n. 4, p. 547-552, 1997.

PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível shiitake (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. 2000. 162p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

PIŠKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, p.183-186, 2006.

PRATES, H.S.; NOGUEIRA, N.L. Controle químico da pinta preta (*Phyllosticta citricarpa*) em laranjeiras pêra. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 20. São Paulo. **Programas e resumos**. São Paulo: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1996. p. 89.

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. **Shiitake growers handbook**: the art and science of mushroom cultivation. Dubuque: Kendall; Hunt Publ., 2007. 217 p.

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

RAGSDALE, N.N.; SISLER H.D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.32, p.545-557, 1994.

REYES, M.E.Q.; ROHRBACH, K.G.; PAULL, R.E. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.33, p.193-203, 2004.

RODOV, S.; BEN-YEHOSHUA, D.; D'HALLEWIN, G.; CASTIA, T. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 381, p. 517-523, 1994.

SAN ANTONIO, J.P. Cultivation of the shiitake mushroom. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.2, p.151-156, 1981.

SANTANA, M.F.S. **Caracterização físico-química de fibra alimentar de laranja e maracujá**. 2005.168p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SASAKI, S.H. **Protoplastização de *Lentinula edodes* e seu antagonismo sobre o vírus VSA e sobre fungos filamentosos**. 1997. 69 p. Dissertação (Mestrado na área de Ciências) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.

SILVA, S.R.; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 99, p. 159-167, 1992.

SINGER, R. **Mushrooms and truffles: botany, cultivation and utilization.** London: Leonard Hill, 1961. 272p.

SONG, JUN; BEAUDRY, R.M.; FAN, L.; DENG, W.; LEEPIATTANAWIT, R. (United States). **Method for the inhibition of fungal growth in fruits and vegetables U.S. 6045844.** 4 Apr. 2000.

SOUZA, A.C. Frutas cítricas: singularidades do mercado. **Preços Agrícolas,** Piracicaba, 2001. p. 8 –10.

SPADARO, D.; VOLA, R.; PIANO, S.; GULLINO, M.L. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology,** Amsterdam, v.24, p.123-134, 2002.

SPÓSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros.** 2003. 112 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 20, p. 16-21, 1994.

STROBEL, G.A.; MANKER, D.C.; MERCIER, J.; JIMENEZ, J.; LIN, J.; THURSTON, J.; KERSTING, B. (United States) **Compositions related to a novel endophytic fungi and methods of use. U.S. 20040141955.** 22 Jul. 2004.

STROBEL, G. *Muscodor albus* and its biological promise. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** Heidelberg, v. 33, p. 514-522, 2006.

SUTTON, B.C.; WATERSON, J.M. ***Guignardia citricarpa*.** Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1966. 2 p. (Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 85).

SUZUKI, H.; ILYAMA, K.; YOSHIDA, O.; YAMAZAKI, S.; YAMAMOTO, N.; TODA, S. Structural characterization of the immunoactive and antiviral watersolubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). **Agricultural and Biological Chemistry,** Tokyo, v.54, n.2, p.479-487, 1990.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 5, p. 1409-1413, 2001.

TEWARI, S.N.; NAYAK, M. Activity of four-plant leaf extracts against three fungal pathogens of rice. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 68, p. 373-375, 1991.

THEBAUDIN, J.Y.; LEFEBVRE, A.C.; HARRINGTON, M.; BOURGEOIS, C.M. Dietary fibres: Nutritional and technological interest. **Trends in Food Science & Technology**, Redwood City, v.8, p.41-48, 1997.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2<sup>nd</sup> ed., St. Paul: APS Press, 2000. 92p.

TOCHIKURA, T.S.; NAKASHIMA, H.; OHASHI, Y.; YAMAMOTO, N. Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. **Medical Microbiology and Immunology**, Heidelberg, v.177, n.5, p.235-244, 1988.

TOFFANO, L. **Doenças pós-colheita em citros: potencial do *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência**. 2005. 85p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TUNC, S.; CHOLLET, E.; CHALIER, P.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum* **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 263-270, 2007.

TUSET J. J. **Podredumbres de los frutos cítricos**. Conselleria d' Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia, 1987. 206 p.

VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E.L; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, p. 143-148, 2006.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 8, p. 351-358, 1989.

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

WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, Houston, v.19, n.1, p.65-96, 1999.

WHEATLEY, R.E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 357-364, 2002.

WHITE, N.A.; BODDY, L. Extracellular enzyme location during interspecific fungal interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 98, p. 75-79, 1992.

WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. **Compendium of citrus disease**. 2<sup>nd</sup> .ed. St. Paul: APS Press, 1993. 84 p.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto , v. 27, p. 425-441, 1989.

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

WILSON, C. L.;GHAOUTH, A. E.;CHALUTZ, E.; DROBY, C.; STEVENS, C.;LU, J. Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential on induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, p. 837-844, 1994.

WITTIG,H.P.P.;JOHNSON,K.B.;PSCHEIDT,J.W. Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.383-387, 1997.

ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D' AULERIO, A.; BIANCHI, A.; ALBASIN, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 491-494, 1996.