

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**OCORRÊNCIA, DIVERSIDADE E POTENCIAL  
BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A PLANTAS  
DO CERRADO**

**Eugenio Miranda Sperandio**

**Brasília – DF  
2012**



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras  
associadas a plantas do Cerrado**

**Eugenio Miranda Sperandio**

**Brasília – DF  
2012**



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

## **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**

**Dissertação apresentada ao Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Fitopatologia.**

**Eugenio Miranda Sperandio**

**Brasília – DF  
2012**

**Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor Helson Mário Martins do Vale, e com o apoio financeiro concedido pelo Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

**Dissertação aprovada em: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ por:**

---

**Prof. Helson Mário Martins do Vale**

**(Orientador)**

**Universidade de Brasília**

---

**Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior**

**(Examinador)**

**Embrapa Cerrados**

---

**Dr. Milton Luiz da Paz Lima**

**(Examinador)**

**IFGoiano-Campus Urutai**

**Dedico este trabalho aos meus Pais e Irmãos  
pelo apoio, companheirismo e amor  
imprescindível.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pela oportunidade e pelas pessoas que me deram forças para continuar sempre caminhando sem desfalecer.

Ao orientador e grande amigo Professor Helson Mário Martins do Vale pela orientação, amizade e companheirismo a mim dispensado, tornando este trabalho mais agradável de ser realizado.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UnB, em especial ao Professor Dianese e às Professoras Mariza Sanchez e Rita de Cássia pelo carinho e colaboração neste trabalho.

Ao Professor José Elias do Departamento de Botânica pela identificação das plantas amostradas.

Aos Doutores Fábio Bueno e Milton Luiz da Paz Lima pela colaboração e por aceitarem o convite de participarem da banca examinadora.

A Dr<sup>a</sup> Cristina e Dr<sup>a</sup> Valácia, Embrapa Arroz e Feijão, por sempre me incentivarem e por me apresentar e guiar meus primeiros passos na pesquisa.

Aos funcionários José Ribamar Frazão e José César Castro por sempre estarem a disposição.

Aos amigos William Soares, Marcelo Tavares e Sandro Coelho.

Aos colegas de curso: Anna Cristina, Ana Paula Pagani, Andressa Quintana, Daniel Lage, Daniel Diego, Eliane Armando, Érica dos Santos, Maria do Desterro, Jessica da Mata, Mariana Severo, Mikail Leastro, Mônica Alves, Maíra Teixeira, Pablo Melo, Claudênia Ferreira, Justino Dias, Guilherme Lapidus, Kamila Araújo, Andressa e Professor Jansen.

Aos estagiários Pedro Antunes e Geisianny Augusta pela ajuda no decorrer do trabalho.

Aos meus Pais, Ademir Sperandio e Olenice Dias de Miranda, irmãos, Ademir Sperandio Júnior, Kellen Miranda, Gizeli Miranda de Oliveira, Luciane Sperandio, Lizandra Dias de Miranda e Luziano Batista de Miranda, cunhada Luciane Macedo, sobrinhos João Vitor, Maria Clara e afilhado Lucas, cujo amor e apoio incondicional foram, são e sempre será meu alicerce.

Ao meu segundo Pai, José Maria Sperandio, sempre prestativo e incentivador de meus estudos.

Aos trabalhadores da Comunidade Espírita Irmão José Martins, sempre ao meu lado.

A minha Família e Amigos, agradeço.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

"Nada se restaura sem que cada um limpe sua própria sujeira,  
através da reforma íntima, da luta consigo mesmo,  
para vencer suas próprias imperfeições." – Irmão José Martins.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.Cerrado.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.Microrganismos associados a plantas.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.Leveduras.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.Taxonomia convencional de leveduras.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2.Taxonomia molecular de leveduras.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.Controle Biológico.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.1.Utilização de fungos e leveduras como agentes de biocontrole.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2.Micoparasitismo.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.3.Produção de antibióticos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.4.Produção de enzimas extracelulares.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.5.Competição por espaços de colonização e nutrientes.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4.6.Indução de resistência no hospedeiro.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.Citros.....</b>	<b>19</b>
<b>1.6.Pêssego.....</b>	<b>20</b>
<b>2.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Locais de coleta.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Plantas amostradas.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Coleta.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Processamento das amostras.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1. A partir de folhas e frutos.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2. A partir da parte interna das folhas e frutos (Leveduras endofíticas).....</b>	<b>23</b>



<b>2.5. Identificação de Leveduras.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1. Caracteres Fenotípicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.2. Testes bioquímicos/fisiológicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.2.1. Teste de Fermentação.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.2.2. Assimilação de fontes de carbono.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2.3. Assimilação de fontes de nitrogênio.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2.4. Crescimento em diferentes temperaturas.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2.5. Teste de tolerância a NaCl 10%.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5.2.6. Produção de compostos amilóides.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6. Caracterização Molecular.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.1. Determinação de polimorfismo de regiões de mini e micro-satélites (MSP-PCR).....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.2. Amplificação do rDNA da LSU 26S de leveduras.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7. Teste de antagonismo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.1. Fitopatógenos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.2. Teste <i>in vitro</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.2.1. <i>Screening</i> inicial.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.2.2. Seleção de leveduras antagonicas a patógenos de pós-colheita.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.3. Teste de antagonismo <i>in vivo</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.3.1. Ajuste da concentração de inóculo.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.3.2. Teste de antagonismo <i>in vivo</i> em laranja (<i>Citrus x sinensis</i>) e pêssego (<i>Prunus persica</i>).....</b>	<b>29</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Isolamento de leveduras.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Aspecto morfológico.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Diversidade de leveduras associadas a plantas do Cerrado.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.1. Testes fisiológicos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.2. Análise do <i>fingerprint</i> gerado por meio de MSP-PCR.....</b>	<b>36</b>

<b>3.3.3. Diversidade de leveduras totais e endofíticas.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. Teste de antagonismo.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4.1. Teste <i>in vitro</i> de leveduras com fitopatógenos de pós-colheita.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4.2. Teste <i>in vivo</i> em pêsego e laranja.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4.2.1. <i>Monilinia</i> sp. e <i>Pencillium</i> sp. em pêsego (<i>Prunus persica</i>).....</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2.2. <i>Penicillium digitatum</i> em laranja.....</b>	<b>56</b>
<b>4.CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>6.ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

## RESUMO

O Cerrado é considerado um patrimônio natural e genético do país tanto pela sua extensão e diversidade como pela variedade de fitofisionomias. No entanto, o conhecimento sobre a distribuição e organização da biodiversidade, principalmente nas comunidades microbianas do Cerrado, é ainda reduzido. Leveduras em plantas do Cerrado são pouco estudadas, sendo estas, nichos em potencial para o desenvolvimento destes microrganismos. O objetivo do presente trabalho foi estudar ocorrência, densidade e diversidade de leveduras associadas a plantas do Cerrado, bem como sua aplicação no controle de doenças de pós-colheita em laranja e pêssego. Foram coletadas folhas e frutos de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado em áreas de preservação no Distrito Federal: *Anacardium humile*, *Byrsonima crassifolia*, *Eugenia dysenterica*, *Psidium pohlianum* e *Sabicea brasiliensis*. Para isolar leveduras endofíticas, as amostras de folha e fruto foram submetidas à desinfecção superficial, maceradas e a solução obtida foi então pipetada, plaqueada e incubada em meio MYGP a 25 °C por 4 dias. A mesma metodologia foi empregada para o isolamento de leveduras totais, exceto a etapa de desinfecção superficial. A densidade de leveduras endofíticas e totais foi bastante variável entre as plantas amostradas, variando de  $1,4 \times 10^1$  UFC.g<sup>-1</sup> a  $2,2 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>. Foram obtidos 322 isolados de leveduras, sendo 39 endofíticos e 283 totais. Os representantes de morfotipos diferentes foram purificados e identificados utilizando metodologia convencional e molecular. Por meio do padrão de bandas obtidos no MSP-PCR, foram agrupados utilizando o programa Bionumerics<sup>®</sup>. Um representante de cada *cluster* foi selecionado para teste de antagonismo *in vitro* e *in vivo* contra patógenos de pós-colheita. Os isolados de levedura foram pareados com *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Penicillium* sp., *Monilinia* sp., *Rhizopus* sp. Três isolados de leveduras identificados como *A. pullulans* demonstraram efeito inibitório e foram selecionados para os testes *in vivo* em pêssegos inoculados com *Monilinia* sp. e *Penicillium* sp. e laranjas inoculadas com *P. digitatum*. O isolado 276 mostrou-se efetiva no controle do bolor verde dos citros, reduziu significativamente a severidade da doença, diferindo estatisticamente da testemunha. Os resultados confirmaram a eficácia de *A. pullulans* contra *P. digitatum* e evidencia o potencial dessa levedura no controle do bolor verde dos citros.

## ABSTRACT

The Cerrado is considered a natural and genetic heritage of the country both for its size and diversity as the variety of biomes. However, knowledge about the distribution and organization of biodiversity, especially in the microbial communities of the Cerrado is still low. Yeasts in Cerrado plants are little studied, these being potential niches for the development of these microorganisms. The aim of this study was to investigate the occurrence, density and diversity of yeasts associated with plants of the Cerrado, as well as their application in disease control post-harvest orange and peach. We collected leaves and fruits of five species of native plants in Cerrado conservation areas in Distrito Federal: *Anacardium humile*, *Byrsonima crassifolia*, *Eugenia dysenterica*, *Psidium pohlianum* and *Sabicea brasiliensis*. To isolate endophytic yeast, fruits and leaves samples were submitted for surface disinfection, macerated and the obtained solution was then pipetted, incubated and plated through MYGP at 25 ° C for 4 days. The same methodology was used for isolation of total yeast, except the step of surface disinfection. The density and total yeast endophytic varied considerably among the sampled plants, ranging from  $1.4 \times 10^1$  CFU.g<sup>-1</sup> to  $2.2 \times 10^2$  CFU g<sup>-1</sup>. Was obtained 322 yeast isolates, being 39 endophytes and 283 total. The representatives of different morphotypes were purified and identified using conventional and molecular methods. By means of the band pattern obtained in the MSP-PCR, yeasts were grouped using the program Bionumerics<sup>®</sup>. A representative of each cluster was selected for antagonism test in vitro and in vivo against postharvest pathogens. The yeast isolates were paired with *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Bortytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Penicillium* sp., *Monilinia* sp., *Rhizopus* sp. Three yeast isolates identified as *Aureobasidium pullulans* that showed inhibitory effect were selected for *in vitro* and *in vivo* tests on peaches inoculated with *Monilinia* sp. and *Penicillium* sp. and oranges inoculated with *P. digitatum*. This yeast showed to be effective in controlling green mold of citrus, significantly reduced disease severity, differing from the control. The results confirm the effectiveness of *A. pullulans* against *P. digitatum* and showed the potential of this yeast in the control of green mold of citrus.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1.Cerrado

O bioma Cerrado ocorre na zona tropical do continente sul-americano, onde suas fronteiras vão desde os limites inferiores da Amazônia até os estados de São Paulo e Paraná. Juntamente com algumas pequenas áreas no Leste boliviano e nordeste paraguaio, o Cerrado se estende por uma área de mais de 2,0 milhões Km<sup>2</sup> (OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 1995) sendo o segundo maior bioma brasileiro, ficando atrás apenas da Floresta Amazônica. Atravessa, em linha reta, mais de 1.200 km de Leste a Oeste e mais de 1.000 km de Norte a Sul, no centro do Brasil. Com toda a sua exuberância, entre águas cristalinas, flores e frutos, esta é a paisagem dominante nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Tocantins, Piauí e Distrito Federal, além de ser encontrado também em outros seis estados brasileiros (RIBEIRO & WALTER, 2008). O clima é caracterizado como tropical úmido, com verão chuvoso e estação seca de abril a setembro coincidindo com o inverno. As precipitações pluviométricas variam de acordo com os locais, variando de 1100 a 1850 mm anuais com temperaturas médias anuais que variam de 19° e 24° C (GOLFARI, 1975; KLINK & MACHADO, 2005).

No Brasil, o termo Cerrado é comumente utilizado para se referir ao complexo fitofisionômico da savana brasileira que se distribui de formações campestres a florestais. Ecologicamente, o Cerrado poder ser definido como uma vegetação ecotonal (campo sujo, campo Cerrado e Cerrado *stricto sensu*) entre dois extremos de um gradiente fitofisionômico, o campo limpo e o cerradão (COUTINHO, 1978; PIVELLO & COUTINHO, 1996). O Cerrado é caracterizado por um mosaico de fitofisionomias, 11 no total, onde há uma predominância nas formações abertas ou savânicas, que variam desde campos, passando por vegetação arbustiva até matas, demonstrando que possui uma grande variabilidade estrutural e grandes diferenças em porte e densidade (EITEN, 1972; IBGE, 1992). Essa variação responde principalmente a efeitos topográficos, fatores edáficos, frequência de fogo e efeitos do impacto antrópico (COUTINHO, 1978; HARIDASAN, 2001).

O Cerrado está entre os 25 *hotspots* mundiais devido à riqueza biológica e à alta pressão antrópica a que vem sofrendo, sendo considerada a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002, SILVA & BATES, 2002). Pouco alterado até a década de

1950, o Cerrado vive atualmente forte descaracterização. O “jardim das árvores tortas” está se convertendo rapidamente em mares de soja, algodão, cana-de açúcar e eucalipto e em pastagens para crescentes rebanhos de gado. Ameaçado pela exploração desordenada da fronteira agrícola, que já ocupa quase 50% da região, o Cerrado possui até agora menos de 2% de sua área protegida por unidades de conservação (MACHADO *et al.*, 2004). Mais do que sua exuberante biodiversidade, a atual devastação põe em risco uma região que é o berço das águas das principais bacias hidrográficas brasileiras, além de base de sobrevivência cultural e material de um grande número de habitantes, que têm no uso de seus recursos a fonte de sua sobrevivência. A savana mais rica em biodiversidade do mundo, o Cerrado brasileiro reúne, em uma grande variedade de paisagens, mais de 15 mil espécies de plantas e 1.570 espécies de animais. Essa diversidade abriga comunidades de vertebrados e invertebrados, além de uma importante e expressiva diversidade de microorganismos (DIANESE *et al.*, 1997) que devido à atividade humana, podem ser extintas antes mesmo de serem catalogadas. Impressionados pela velocidade com que a paisagem do Cerrado vem se convertendo em pastagens e lavouras – atingindo 21 mil km<sup>2</sup> de desmatamento por ano – a sociedade brasileira e o governo estão revendo as estratégias de conservação para o bioma (CARRAZA & FIGUEREDO, 2010). Essas modificações levaram e continuam levando a grandes perdas da macro e micro-diversidades, essa última ainda não estimada. (CARRAZA & FIGUEREDO, 2010).

## **1.2. Microrganismos associados a plantas**

Os fungos, organismos cuja grande maioria possui dimensões microscópicas, não estão alocados na fauna e não fazem parte da flora. Estes organismos se constituem em um universo pouco explorado da biodiversidade do cerrado, representando um grande potencial biológico a ser descoberto, seja para estudos de aplicações biotecnológicas como para descrição de novas espécies (ROSSMAN, 1997).

Segundo Hawksworth (1991) o número de espécies estimadas de fungo no mundo ultrapassa 1.500.000. Desse total, estima-se que 75% são classificados como microfungos, sendo encontrados associados a plantas, principalmente em regiões tropicais (DIANESE, 2000). Em 1997, a micobiota no Cerrado tinha como representantes 875 espécies conhecidas em 301 gêneros. Todavia, levando-se em conta

a estimativa feita por Hawksworth (1991) que se baseia na proporção de seis espécies de fungos por espécie vegetal, este número pode representar menos de 4,5% das possíveis espécies existentes na região, portanto haveria ao menos 24.000 espécies de fungos no Cerrado (DIANESE *et al.*, 1997; SANTOS, 2011).

Dois terços das espécies de fungos conhecidos estabelecem íntimas relações parasíticas, comensalísticas ou mutualísticas com outros organismos (BARBIERI; CARVALHO, 2001). Uma grande parcela destes fungos vive associada às plantas, seja na superfície, no interior dos tecidos ou na rizosfera. Devido às pesquisas de isolamento de microrganismo, sabe-se que as plantas são micro-ecossistemas, e excelentes hospedeiras de diversos fungos (AGRIOS, 1997).

O filoplano é considerado um hábitat rico nas quais várias espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são rotineiramente encontrados (ANDREWS & HARRIS, 2000). A densidade populacional dos microrganismos da superfície de plantas é caracterizada pela grande flutuação, sofrendo influência das condições ambientais (FOKKEMA & HEUVEL, 1986). Rápidas mudanças de condições favoráveis (ex.: alta umidade e baixo nível de radiação) para condições desfavoráveis (ex.: altas temperaturas e níveis elevados de radiação), o que pode ocorrer num curto espaço de tempo, são seguidos por rápidas mudanças na densidade e no número de microrganismos epifíticos (LEBEN, 1988; INÁCIO *et al.*, 2005).

Folhas recém-emergidas são basicamente limpas, hidrofóbicas e muitas vezes são enrugadas devido a cristais de cera cuticulares (NEINHUIS & BARTHLOTT, 1998). Uma evidente sucessão na colonização da superfície foliar tem sido relatada por vários autores (ERCOLANI, 1991; KINKEL, 1991; BLAKEMAN, 1993). Juntamente com os fungos filamentosos, as leveduras constituem o principal grupo de microrganismos que habitam esse nicho (ANDREWS & HARRIS, 2000; INÁCIO *et al.*, 2002, 2005). Normalmente, os primeiros microrganismos encontrados são as bactérias começando a colonização da superfície foliar (BLAKEMAN, 1991). Com o passar do tempo, leveduras começam a tornarem-se mais abundantes no filoplano devido à disponibilidade de novos nutrientes como pólen e grandes quantidades de açúcares ficam disponíveis devido a atividade de afídeos e outros insetos (STADLER & MULLER, 1996). No fim de estações, especialmente em árvores decíduas, a superfície foliar é mais densamente colonizada por fungos filamentosos. Este fato deve-se a diminuição das barreiras cuticulares devido a idade das folhas.

Uma vez estabelecidos, os microrganismos epifíticos ficam fortemente ligados a superfície (ROMANTSCHUK, 1992) e podem ser removidos após sucessivas lavagens. Eles tendem a se protegerem com uma matriz extracelular (BEATTIE & LINDOW, 1999) e tem-se observado que biofilmes, contendo diferentes espécies de bactérias, podem desenvolver-se no filoplano (MORRIS *et al.*, 1997, 1998). As espécies que vivem na superfície de frutos e folhas pertencem a diversos grupos taxonômicos. Espécies bacterianas pertencentes a diversos gêneros como *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Bacillus* tem sido reportadas (ERCOLANI, 1991; MORRIS *et al.*, 1998). Espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Cladosporium* e *Alternaria* tem sido descritos e espécies de leveduras pertencentes a diferentes gêneros como *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* também já foram descritas (ANDREWS & HARRIS, 2000; BLAKEMAN, 1993; MAUTONE, 2008). Frutos tem sido uma importante fonte de isolamento de microrganismos. Leveduras como *Cryptococcus laurenti* foi isolada da superfície de peras (WILSON *et al.*, 1991), *Debaromyces hansenii* de limas-mexicanas (HERNANDES-MONTIEL *et al.*, 2010), *Candida auringienensis*, *Pichia acaciae* (SILVA *et al.*, 2000), *Pichia guilliermondii* (SILVA *et al.*, 2008), *Candida smithsonii*, *Cryptococcus flavescens*, *Meira geulakonigii*, *Pseudozyma* sp., *Sporobolomyces* sp. (VALE, 2009) e mais outras 22 espécies de leveduras foram isoladas da superfície e mucilagem de frutos de café (SILVA *et al.*, 2000).

Além dos epifíticos, fungos endofíticos têm sido isolados de quase todas as plantas vasculares estudadas e muito tem se escrito sobre seu papel e ecologia. O termo endofítico foi inicialmente proposto por De Bary e aplicado a qualquer organismo encontrado dentro de uma planta (WILSON, 1995). Segundo Wilson (1995), endofíticos são microrganismos que, por toda ou por uma parte do seu ciclo de vida, invadem o tecido de plantas vivas sem, no entanto, causarem algum dano ou doença. O papel dos microrganismos endofíticos tem sido amplamente discutido. Plantas fornecem nutrientes e condições ambientais estáveis que são vitais para o desenvolvimento dos endófitos. Leveduras também têm sido encontradas habitando o interior de plantas. Elas penetram no interior das hospedeiras através de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, e também através de microferimentos na superfície vegetal (ISAEVA *et al.*, 2010). Exemplo disso é a levedura basidiomicética *Rhodotorula minuta*, isolada do xilema de *Pinus* (PIRTTILA *et al.*, 2003) e também um representante ascomicético, a levedura *Williopsis saturnus* isolada de raízes de milho (NASSAR & EL-TARABILY,



2005). Algumas leveduras isoladas de plantas da família Poaceae são relacionadas com a produção de alcalóides fisicamente ativos, fornecendo proteção contra herbivoria (FUNK *et al.*, 1983; CLAY, 1988; CHEPLICK & CLAY, 1988; PRESTIDGE & GALLAGHER, 1988). Foi demonstrado que leveduras endofíticas aumentam a resistência de plantas a doenças e a condições de estresses (JORDAANB *et al.*, 2006). *Williopsis saturnus* atuam na produção de ácido indol acético (IAA) e ácido pirúvico (NASSAR & EL-TARABILY, 2005); estes compostos podem reduzir infecções causadas por fitopatógenos, aumenta a tolerância a estresses e a absorção de nutrientes em solos com deficiência nutricional. (LATCH *et al.*, 1985; CLAY, 1990; KIMMONS, 1990; BACON, 1993; VERMA *et al.*, 1999; BULTMAN & MURPHY, 2000). Endófitos em cultura podem produzir componentes biologicamente ativos (BRUNNER & PETRINI, 1992) tais como alcalóides (DAHLMAN *et al.*, 1991) e antibióticos (FISHER *et al.*, 1984). De um ponto de vista prático, o entendimento do papel das leveduras endofíticas é importante para uma melhor compreensão do seu papel nas hospedeiras (ISAEVA *et al.*, 2010).

### **1.3. Leveduras**

Integrantes do reino *Fungi*, as leveduras possuem características típicas dos fungos como parede celular rígida e núcleo organizado com membrana nuclear, não possuindo pigmentos fotossintetizantes tendo por isso nutrição heterotrófica por meio de absorção de nutrientes, ausência de motilidade e reprodução sexuada via células especializadas denominada esporos. Uma das características que as diferenciam dos demais fungos são possuírem um talo que é predominantemente unicelular, reproduzirem assexuadamente por brotação ou fissão binária e não formarem corpos de frutificação (KURTZMAN & FELL, 1998). Elas possuem representantes nos Filos Ascomycota e Basidiomycota. As leveduras ascomicéticas estão classificadas no subfilo Saccharomycotina e Taphrinomycotina enquanto que as basidiomicéticas estão nos subfilos Agaricomycotina e Pucciniomycotina. Características como estruturas sexuadas (ascos e basídios), aspectos fisiológicos como fermentação de açúcares, testes de assimilação de C e N, e aspectos moleculares são características importantes levadas em consideração tanto para a distinção entre leveduras dos dois grupos como também em gêneros anamórficos, cuja fase de vida sexuada do ciclo de vida é desconhecida. As

leveduras são encontradas em diversos ambientes, no ar, no solo, em águas de rios, lagos e mares; em superfícies de animais e associados a estes. Historicamente, as leveduras estão associadas a processos fermentativos sendo também encontradas em substratos contendo açúcares. Devido à síntese de açúcares simples, polissacarídeos e outros compostos de carbono, produtos esses oriundos da fotossíntese, as plantas tornam-se hábitat excelentes para as leveduras. Essa ampla gama de compostos oferece condições para colonização das plantas por esses microrganismos. Estes nutrientes constituem importantes fontes carbono para obtenção de energia, o que tem sido observado em vários ambientes (Ruivo, 2005; Rosa *et al.*, 2007; Fuentefria *et al.*, 2008) exceto o Cerrado brasileiro.

Leveduras basidiomicéticas, quando comparadas com as leveduras ascomicéticas, possuem um potencial mais amplo para assimilação de fontes de carbono (Kurtzman & Fell, 1998) e algumas ainda apresentam características que favorecem sua permanência no filoplano, tais como produção de estruturas de resistência, como clamidósporos, de cápsula mucóide, pigmentos carotenóides que são úteis na proteção à luz solar.

Segundo Santos *et al.* (1996), as leveduras ascomicéticas são mais frequentemente encontradas em substratos ricos em açúcares simples, como frutos e seus insetos polinizadores. Já as leveduras basidiomicéticas são mais encontradas em ambientes como solo e folha, onde os nutrientes disponíveis são mais complexos.

### **1.3.1. Taxonomia convencional de leveduras**

A taxonomia convencional de leveduras é baseada principalmente em métodos que utilizam testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos que incluem fermentação de diferentes fontes de açúcares, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, entre outros (KURTZMAN *et al.*, 2011). Contudo, a taxonomia convencional nem sempre alcança resultados conclusivos, não apresentando uma correta relação filogenética entre as leveduras. Para uma identificação mais segura, um conjunto de ferramentas deve ser utilizado (Taxonomia Polifásica), juntando métodos convencionais com os moleculares, tais como a amplificação de regiões conservadas do genoma via reação da polimerase em cadeia (PCR) (LANDELL, 2009).

### 1.3.2. Taxonomia molecular de leveduras

Métodos moleculares tornaram-se importantes ferramentas no auxílio na identificação de leveduras, assim como em outros microrganismos cuja visualização de estruturas morfológicas essenciais para taxonomia é difícil, sendo, portanto, uma ferramenta útil em análises filogenéticas (BOUNDY-MILLS, 2006).

A determinação do conteúdo de GC (bases guanina-citosina) do DNA foi um dos primeiros métodos utilizados no estudo taxonômico de leveduras, não sendo necessária a amplificação do DNA da amostra via PCR, porém, requer grandes quantidades de DNA (BOUNDY-MILLIS, 2006).

Pelo fato de estar presente em todos os organismos, que evoluíram de um ancestral em comum e também pela presença de regiões codificantes e não-codificantes, o rDNA tem sido bastante empregado em estudos taxonômicos (VALENTE *et al.*, 1999). Em leveduras, os genes ribossomais estão organizados em *clusters* possuindo os seguimentos 5.8S, 18S e 26S que estão presentes em várias cópias no genoma. Os espaços internos transcritos (ITS) se intercalam entre esses genes e são denominados ITS1 e ITS2 (BARNETT *et al.*, 2000). Estas regiões são menos conservadas e são utilizadas para discriminar espécies relacionadas.

Kurtzman & Robenett (1998) demonstraram que a sequência de nucleotídeos do domínio D1/D2 da LSU (large sub-unit) possui variação suficiente para identificar todas as espécies conhecidas de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas, embora em algumas leveduras basidiomicéticas seja necessário sequenciar também as regiões ITS do rDNA (FELL *et al.*, 2000).

Diversos estudos de diversidade de leveduras têm empregado a amplificação do DNA pela técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos, como *Microsatellite-primed* PCR (MSP-PCR), que é baseado na amplificação de regiões repetitivas em tandem (LANDELL, 2009; GADANHO *et al.*, 2006). Após a PCR, os amplicons são aplicados em gel de agarose a fim de serem separados. A utilização desta técnica tem crescido significativamente e, dependendo do *primer* utilizado e das bandas analisadas, tem poder discriminatório para diferenciar linhagens ou espécies (LASKER & RAN, 2004). Resultados obtidos por meio desta técnica indicam que este método é apropriado

para caracterização de grandes grupos de isolados devido a sua boa reprodutibilidade e simplicidade (GADANHO, 2001). Outros autores têm usado essa técnica com sucesso, aplicando-a na caracterização e identificação de leveduras patogênicas tais como *Candida* spp. (MEYER *et al.*, 2001) e *Cryptococcus neoformans* (MEYER *et al.*, 1993) e também para a caracterização de fungos micorrízicos (LONGATO & BONFANTE, 1997) e comunidade de leveduras em bromélias da mata atlântica (LANDELL, 2009).

Apesar de relatos de leveduras associadas a plantas de outros biomas, há aspectos pouco elucidados em leveduras isoladas de plantas do Cerrado, tais como sua taxonomia, interação com plantas nativas do Cerrado e seu potencial biotecnológico, em especial, no controle de doenças de pós-colheita em frutos.

#### **1.4. Controle Biológico**

Desde o começo da domesticação das plantas, há 10000 anos, fitopatógenos representam um problema e são até hoje um fator limitante em várias culturas, causando prejuízos significativos, reduzindo o valor e o tempo de armazenamento (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

As plantas cultivadas são consumidas frescas ou depois de passarem por processamento, sendo produzidas por meio de métodos convencionais ou orgânicos ou também em condições controladas, como casa de vegetação e ainda assim são afetadas por fitomoléstias (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

A produção de alimentos, principalmente em larga escala, por plantas cultivadas é altamente dependente de defensivos agrícolas, que na maioria das vezes são eficazes para o controle de pragas e doenças, mas apresentam, por vezes, conseqüências indesejáveis, principalmente com a desobediência dos prazos de carência. Em sua grande maioria, agrotóxicos são substâncias venenosas para o ser humano, com efeito cumulativo no organismo, com ação carcinogênico e causando mutação genética em descendentes (LIMA *et al.*, 2000).

Com uma crescente demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos e pela percepção dos consumidores em geral sobre o impacto das práticas empregadas no controle de doenças, como uso de defensivos agrícolas tanto no meio ambiente como na saúde humana, o desafio para os produtores no combate a doenças tem aumentado significativamente, forçando não só os agricultores, mas também os órgãos de

fiscalização rever os métodos utilizados, estabelecendo assim políticas governamentais que restrinjam ou diminuam o uso de agrotóxicos (GULLINO & KUIJPERS, 1994; RAGSDALE & SISLTER, 1994). Assim, produtores e pesquisadores passaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate a doenças (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

Segundo Pascholati (1998), no contexto da proteção de plantas contra fitopatógenos, o controle alternativo não inclui controle químico clássico e o melhoramento genético de plantas, englobando o controle biológico e indução de resistência. O controle biológico, como premissa básica, mantém a densidade populacional de patógenos associados à agricultura, em níveis ecologicamente e economicamente aceitáveis (LIMA *et al.*, 2000). Baker & Cook (1974) definem controle biológico 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 por meio da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas”. Cook & Baker (1983) reformularam o conceito de controle biológico como sendo “a redução da soma de inoculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

Dentre os produtos biológicos disponíveis no mercado, os biopesticidas, que tem como ingrediente ativo microrganismos, em 1995, representavam apenas 0,7% do mercado mundial de agrotóxicos, mas vem crescendo a taxas entre 10 a 25% ao ano, enquanto que os pesticidas químicos possuem taxas de crescimento situados entre 1 e 2% (NARDO & CAPALBO, 1998). São exemplos de microrganismos utilizados como princípio ativo em produtos comerciais a levedura *Candida oleophilla* no controle de fitopatógenos em pós-colheita (LAHLALI *et al.*, 2011), *Trichoderma harzianum* no controle da podridão-de-esclerócio (NARDO & CAPALBO, 2000; SHARMA *et al.*, 2009), *Agrobacterium radiobacter*, no controle da galha da coroa causada por *A. tumefaciens* (controle de doenças); bactéria *Bacillus thuringiensis*, no controle de insetos, o vírus Baculovirus anticarsia contra a lagarta desfolhadora (*Anticarsia gemmatalis*) em soja (controle de pragas); *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* utilizado como bioherbicida em culturas de arroz e soja (controle de plantas infestantes (NARDO & CAPALBO, 2000; SHARMA *et al.*, 2009).

#### 1.4.1. Utilização de fungos e leveduras como agentes de biocontrole

O conhecimento do ciclo da doença e do ciclo de vida do fitopatógeno é essencial para a elaboração de estratégias eficientes no controle de qualquer doença. A grande maioria dos agentes etiológicos de doenças em plantas que afeta várias culturas foram estudados (AGRIOS, 1997).

O controle de doenças por parte de fungos filamentosos ou unicelulares é feito pela interrupção de algum estágio da doença ou do ciclo das relações patógeno hospedeiro como o ciclo de vida do patógeno por meio de vários mecanismos. A prevenção de infecção, redução na colonização do tecido do hospedeiro, redução da esporulação ou da sobrevivência do patógeno por meio da utilização de agentes biológicos que podem proporcionar diferentes níveis de controle (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

Muitos fungos e leveduras são encontrados naturalmente no interior ou próximo às folhas, raízes, frutos e outras estruturas como epífitos ou endófitos utilizando nutrientes disponíveis sem, no entanto, causarem qualquer prejuízo a planta. Nas últimas duas décadas pesquisas com o objetivo de elucidar se estes microrganismos poderiam ser utilizados como agentes de biocontrole, possibilitaram dessa forma, o desenvolvimento e registro de diversos agentes microbianos de uso comercial utilizados no controle de doenças. Existe um caminho longo da descoberta ao desenvolvimento de agentes de controle biológico da fase laboratorial até a obtenção do produto comercial, sendo este um processo longo e burocrático. É necessário que se obtenha diversas informações a respeito do agente de biocontrole relacionadas com a eficácia, modo de ação, sobrevivência, colonização, potencial de toxicidade para espécies não-alvo, formulação, estabilidade e vida de prateleira (LUMSDEN, 1996; MATHRE *et al.*, 1999; HARMAN, 2000).

Muitos fungos têm sua eficiência comprovada como agentes de controle biológico e outros tantos são apontados como potenciais antagonistas. São exemplos de antagonistas: *Ampelomyces quisqualis* no controle de *Sphaerotheca fuliginea*; *Gliocladium roseum* no controle de *Botrytis cinerea*, *Phomopsis sclerotioides* e *Helminthosporium sativum*; *Coniothyrium minitans* hiperparasita fungos formadores de esclerócio como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis fabae*; *Talaromyces flavus* produz diversos metabólitos que podem impedir o desenvolvimento de *Verticillium dahliae*;

*Trichoderma* sp. no controle de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (MELO, 1998).

Várias leveduras antagonistas têm sido identificadas e utilizadas em frutos e vegetais para controle de doenças de pós-colheita (SHARMA *et al.*, 2009). *Aureobasidium pullulans* é utilizado para controle de *Monilinia laxa* em banana e uva (WITTING *et al.*, 1997; BARKAI-GOLAN; 2003); *Pichia guilliermondii* é aplicada em nectarina, pêsego e tomate para controle de *Botrytis cinerea* (TIAN *et al.*, 2002; SALIGKARIAS *et al.*, 2002) e *Penicillium italicum* em laranjas (LAHLALI *et al.*, 2011), *Candida oleophila* utilizada em citros controlando *P. italicum* e *P. digitatum* (LAHLALI *et al.*, 2005) e em banana para o controle de *Colletotrichum musae* (LASSOIS *et al.*, 2008), *Candida sake* utilizada no controle de *Penicillium expansum* em maçã (MORALES *et al.*, 2008) e em pêra (TORRES *et al.*, 2006), *Debaromyces hansenii* aplicado em pêsego para controlar *Rhizopus stolonifer* (MANDAL *et al.*, 2007), *Metschnikowia pulcherrima* utilizada para o controle de *Alternaria alternata*, *B. cinerea* e *P. expansum* em maçã (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2008) e *Rhodotorula glutinis* no controle de *B. cinerea* e *P. expansum* em maçã (ZHANG *et al.*, 2009) são alguns exemplos de leveduras utilizadas como antagonistas contra patógenos de pós-colheita.

Em pós-colheita, o biocontrole de fitopatógenos pode ser feito durante o ciclo da cultura ou também após a colheita. O objetivo do controle no campo é evitar a penetração dos patógenos nos tecidos de hortaliças e frutos e impedir seu posterior desenvolvimento durante o período em que estiver armazenado, evitando assim que patógenos que estão quiescentes nos tecidos causem podridões e impedindo que novas infecções aconteçam (BETTIOL & GHINI, 1995; SHARMA *et al.*, 2009).

Quando o objetivo é a proteção de frutos e hortaliças destinados ao consumo *in natura*, as leveduras têm sido os organismos que são preferencialmente usados. O motivo dessa escolha é o fato destes microrganismos não serem bons produtores de substâncias químicas, como as micotoxinas, cuja presença é indesejável em vegetais (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). Produtos cujo princípio ativo são as leveduras estão sendo desenvolvidos em diversos países, já existindo biofungicidas preparados com leveduras para uso em doenças de pós-colheita, como exemplo temos o produto *Aspire*<sup>®</sup>, registrado em Israel e EUA para utilização no controle de pós-colheita causadas por *Botrytis* e *Penicillium*, usando a levedura *Candida oleophila* como agente antagonico (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000; SHARMA *et al.*, 2009),

BoniProtect<sup>®</sup>, produto registrado na Alemanha, tem como agente microbiano *Aureobasidium pullulans* e é usado principalmente para o controle de pós-colheita em maçãs (WEISS *et al.*, 2006), Shemer<sup>®</sup> é registrado em Israel e usa levedura *Metschnikowia fructicola* como agente antagônico e é comercialmente utilizado em pós-colheita de batata-doce, uva de mesa, morangos, pimenta e cenoura (KURTZMAN & DROBY, 2001) e CandiFruit<sup>®</sup>, um produto registrado na Europa à base de *Candida sake* (SANZANI *et al.*, 2009).

Devido ao fato das leveduras serem os principais microrganismos que compõem a comunidade microbiana na superfície de frutos e folhas, elas possuem uma vantagem no biocontrole de doenças de pós-colheita (WILSON & WISNIEWSKI, 1991). Por serem fenotipicamente mais adaptadas a esses nichos, elas são agentes de controles potencialmente mais efetivos, pois são hábeis, principalmente, na colonização e competição por espaços e nutrientes na superfície de frutos e folhas (MCLAUGHLIN *et al.*, 1990; FILONOW, 1998).

Os fungos filamentosos e leveduras podem atuar reduzindo o crescimento e desenvolvimento de fungos fitopatogênicos e reduzir a doença por meio de diversos mecanismos, são eles: competição por espaços e nutrientes, indução de resistência na planta hospedeira, parasitismo, produção de enzimas extracelulares, produção de antibióticos, interferência nos fatores de patogenicidade, sendo que prováveis mecanismos diferentes de controle atuem em sinergismo durante a interação antagônica (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

#### **1.4.2. Micoparasitismo**

Na década de 30 foram feitos os primeiros relatos que demonstraram que fungos fitopatogênicos podem ser parasitados por outros fungos e a grande maioria desses estudos é referente a espécies de *Trichoderma* (HOWELL, 2003). No final dos anos 80, leveduras capazes de reduzir o crescimento micelial e a esporulação de fungos fitopatogênicos foram identificadas (AVIS & BÉLANGER, 2001; URQUHART & PUNJA, 2002). Para que haja este tipo de interação, necessário é que patógenos e antagonistas estejam próximos fisicamente. Essas observações são realizadas majoritariamente em testes *in vitro*, em placas de petri ou em tecidos destacados (EL-GHAOUTH *et al.*, 2004). O cromista *Pythium oligandrum* parasita outras espécies de



*Pythium* (BENHAMOU *et al.*, 1997; MADSEN & NEERGAARD, 1999), *Coniothyrium minitans* hiperparasita de esclerócios de *Sclerotinia* spp. (BUDGE & WHIPPS, 2001), *Ampelomyces quisqualis* parasita sobre hifas de fungos causadores de oídeos (ROTEM *et al.*, 1999), *Darluca* sp. parasita de urédias e télias de fungos causadores de ferrugem como exemplo o patossistema capim-limão-*Puccinia nakanishikii* (KOIKE & MONILAR, 1999).

A degradação de estruturas de fitopatógenos fúngicos por leveduras antagônicas tem sido observada. Leveduras produzem uma elevada quantidade de matriz extracelular representadas por glucanases que permite a aderência e destruição de estruturas fúngicas (EL-GHAOUTH *et al.*, 2004). A levedura *Pichia guilliermondii* produz uma mucilagem, aderindo ao micélio de *Botrytis cinerea* e inibindo seu crescimento micelial (WISNIEWSKI *et al.*, 1991; ZHANG *et al.*, 2010). A levedura *Cryptococcus laurentii* mostrou atividade antagônica, produzindo quitinase, quanto submetida a testes de biocontrole de *Penicillium expansum* em pêra (YU *et al.*, 2008).

### 1.4.3. Produção de antibióticos

Muitos fungos utilizados como agentes antagônicos têm como característica a produção de antibióticos. Espécies de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, bem como a levedura *Pseudozyma flocculosa* são produtores de diversos metabólitos secundários que possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana e são utilizados em produtos comerciais (PUNJA & UTKHEDE, 2003). *Pseudozyma flocculosa* produz antibióticos derivados de ácidos graxos que inibem o crescimento do organismo alvo, afetando a permeabilidade da membrana no patógeno (ÁVIS & BÉLANGER, 2001).

Segundo Droby *et al.* (1991) as leveduras não são conhecidas como boas produtoras de antibióticos. Isolados das leveduras *Aureobasidium pullulas* e *Sporobolomyces* sp. produziram antibióticos somente em situações de estresses, onde foram submetidos a condições de exaustão de nutrientes aumentando a competitividade (Mc COMARK *et al.*, 1994). Os modos de ação das leveduras no biocontrole de doenças em pós-colheita são principalmente por competição por espaço e nutrientes e produção de enzimas extracelulares; por este fato, grande interesse se tem dado as leveduras porque seu modo de ação não é baseado na produção de compostos tóxicos,

sendo uma vantagem como tática de controle sobre produtos vegetais que serão consumidos *in natura* (NUNES & MANSO, 2011).

#### 1.4.4. Produção de enzimas extracelulares

As células fúngicas têm duas paredes celulares rígidas desempenhando funções vitais para os fungos, mantendo a forma celular, fornecendo condições ideais para processos fisiológicos, atua como receptor de moléculas como os hormônios, protege a células e age como uma barreira às atividades exercidas por microrganismos antagônicos. O antagonista poderá ter êxito em suas atividades de biocontrole se conseguir lisar a parede celular ou interferir nos processos relacionado a sua síntese (LORITO *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2000). Além dos lipídeos e proteínas, os principais compostos da parede celular fúngica são os carboidratos, principalmente os polissacarídeos, tais como quitina,  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanas (SALIGKARIAS *et al.* 2002).

A produção de enzimas com atividade hidrolítica, como glucanase e quitinase, é uma característica comum em muitos agentes de biocontrole (BAEK *et al.*, 1999). A produção de enzimas possui uma grande importância comercial e as leveduras constituem um dos principais grupos produtores, sendo citado que o aproveitamento desses metabólitos e o potencial produtivo de enzimas é mais relacionado com características do isolado do que ao grupo de leveduras (MACHADO & LINARDI, 1990).

A produção e excreção de enzimas hidrolíticas por parte de leveduras dependem do organismo com o qual foi realizado o teste de antagonismo. As leveduras *Candida oleophila* e *C. guilliermondii* expressaram altos níveis de quitinase e  $\beta$ -1,3-exoglucanase em testes antagônicos para controle de *Botrytis cinerea* (SALIGKARIAS *et al.* 2002). Foi demonstrado que a levedura *Pichia anomala* produziu  $\beta$ -1,3-glucanase quando submetida a testes de antagonismo contra *B. cinerea*, lisando a ponta das hifas e provocando deformações no patógeno (JIJAKLI & LEPOIVRE, 1998). A levedura *Aureobasidium pullulans* quando submetida a testes de antagonismo *in vitro*, produziu enzimas extracelulares,  $\beta$ -1,3- glucanase e quitinases contra *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* e *Botrytis cinerea* (ZHANG *et al.*, 2010). O efeito das enzimas degradadoras de parede celular é potencializado quando os isolados de levedura fixam-se à hifa do fungo fitopatogênico (COOK *et al.*, 1997). Existem indicativos que

antibióticos e enzimas atuam em sinergismo. O crescimento de *B. cinerea* e *Fusarium oxysporum* foi reduzido significativamente na presença de antibióticos e enzimas hidrolíticas, sendo este resultado mais expressivo com a aplicação de qualquer um dos dois tratamentos sozinhos (SCHIRMBOCK *et al.*, 1994; LORITO *et al.*, 1996).

#### 1.4.5. Competição por espaços de colonização e nutrientes

De um modo geral, os fitopatógenos, inclusive os fúngicos, necessitam de sítios de entrada da planta para acessarem o interior do hospedeiro. Em parasitas obrigatórios, isso se dá através da penetração direta da hifa, geralmente produzindo apressório, através da cutícula e epiderme da planta; os parasitas facultativos, que podem ser saprófitas, entram através de ferimentos, tais como injúrias sofridas pela planta ou tecidos em senescência, e também através de aberturas naturais como estômatos ou lenticelas. Estes locais geralmente possuem uma grande quantidade de nutrientes disponíveis devido à exsudação de aminoácidos e açúcares. Microrganismos utilizados para controle que possuem a capacidade de competir por esses nichos, podem impedir de forma eficiente que estruturas do patógeno se desenvolvam e até mesmo impedir que estes estabeleçam uma relação infectiva (PUNJA & UTKHRDE, 2003).

Segundo Eparvier & Alabouvette (1994), isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos competem por fontes de nutrientes e sítios de colonização em raízes. Espécies de *Gliocladium* e *Trichoderma*, principalmente quando aplicado antes da chegada do patógeno, podem se sobressair a este (HARMAN, 2000).

Diversas leveduras têm como principal modo de ação a competição por nutrientes, tais como *Metschnikowia pulcherima* (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2008), *Aureobasidium pullulans* (BENCHEQROUN *et al.*, 2007) *Candida guilliermondii* e *Cryptococcus laurentii* contra *Botrytis cinerea* e *P. expansum* (ROBERTS, 1990; ELAD *et al.*, 1994; PIANO *et al.*, 1997; SALIGKARIAS *et al.*, 2002; VERO *et al.*, 2002; GREBENISAN *et al.*, 2008), *Pichia guilliermondii* contra *Penicillium digitatum* (DROBY *et al.*, 1989). Leveduras que controlam fitopatógenos dessa maneira podem colonizar tecidos feridos e em senescência, prevenindo o estabelecimento das relações parasitárias (FILONOW, 1998). A eficiência de *P. guilliermondii* contra *P. digitatum* foi reduzida quando houve a adição de nutrientes exógenos ao nicho de colonização (DROBY *et al.*, 1989). A competição por nutrientes é um fator provável e lógico,

entretanto, não é de fácil comprovação por ser difícil a exclusão de outros mecanismos que interferem na eficiência de controle.

#### 1.4.6. Indução de resistência no hospedeiro

Plantas superiores possuem a capacidade de defender-se contra patógenos em potencial, induzindo e acumulando diversos componentes físicos e bioquímicos, prevenindo e restringindo a penetração, crescimento e multiplicação dos fitopatógenos. A indução de resposta dos hospedeiros por leveduras e fungos filamentosos se dá por meio da colonização do tecido hospedeiro, produção de moléculas eliciadoras e compostos sinalizadores, e produção de substâncias promotoras de crescimento (BENHAMOU, 1996).

Interação entre leveduras utilizadas como agente de biocontrole pós-colheita e as hospedeiras são pouco compreendidas (DROBY *et al.*, 2009). A levedura *Pichia guilliermondii* induziu a produção de fitoalexinas em citros (RODOV *et al.*, 1994). Maçãs acumularam  $\beta$ -1,3- glucanases, quitinases e peroxidases (enzimas degradadoras de parede celular de fungos) induzidas por *Aureobasidium pullulans* e *Candida saitoana* (IPPOLITO *et al.*, 2000; EL GHAOUTH *et al.*, 2003).

Extratos filtrados de *Saccharomyces cerevisiae* em folhas de café destacadas, 72 horas antes da inoculação do agente etiológico da ferrugem do cafeeiro, *Hemileia vastatrix*, induziu a resistência ao patógeno mesmo não inibindo a germinação de uredinósporos e a formação de apressório (MARTINS *et al.*, 1986; 1991). Outros relatos descrevem a capacidade de *S. cerevisiae* de ativar mecanismos de defesa em outras plantas como eucalipto contra *Botrytis cinerea* (PICCININ, 1995), sorgo contra *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* (LOPEZ, 1991; PICCININ, 1995) e milho contra *C. graminicola* e *E. turcicum* (SILVA & PASCHOLATI, 1992; STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994). Segundo Hershkovitz *et al.* (2011) a aplicação da levedura *Metschnikowia fructicola* em uvas induziram a expressão de genes que controlam vias metabólicas de processos oxidativos relacionados com mecanismos de defesa quando *Monilinia fructicola* foi inoculada em frutos injuriados.

Embora uma conexão causal entre o acúmulo de substâncias de defesa da hospedeira e a bioproteção das leveduras antagônicas ainda não esteja claramente

estabelecida, a ocorrência de altos níveis de componentes antifúngicos nos tecidos da planta sugere sua implicação na resistência a doenças (SHARMA *et al.*, 2009).

### 1.5. Citros

Com uma produção superior a 18 milhões de toneladas, o Brasil é considerado o maior produtor mundial de citros e o maior exportador de suco de laranja. Com uma área colhida maior do que 818 mil hectares, a produção brasileira responde por um terço da produção da laranja e por mais de 47% do suco fabricado no mundo. Do total da produção nacional, 71% destina-se ao processamento industrial, 0,6% à exportação *in natura*, e 28,4% para o consumo interno (SPÓSITO & BASSANEZI, 2002; FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS, 2004).

As perdas econômicas causadas por doenças de pós-colheita representam um dos maiores entraves à citricultura mundial. Segundo Eckert (1993), a maioria das doenças de pós-colheita torna as frutas impróprias para a comercialização, onde somente durante o período de comercialização, perdas de até 50% para laranjas foram registrado. Fatores relacionados com fruto, o patógeno, o clima e as condições de armazenamento em pós-colheita é fator determinante na incidência e severidade das doenças. A probabilidade de infecção está diretamente relacionada com a quantidade de inoculo fúngico presente num ponto suscetível (ECKERT & EAKS, 1986).

Dentre as várias doenças que atacam os citros em pós-colheita, destaca-se o bolor verde, causado pelo fungo *Penicillium digitatum*, e esta representa a doença de pós-colheita das espécies de citros que apresentam maior impacto econômico em todo o mundo (ECKERT & EAKS, 1986), estando disseminada em todas as regiões produtoras mundiais, afetando todas as espécies, variedades e cultivares cítricas (TOFFANO, 2005).

O bolor verde é uma podridão mole dos frutos, cuja lesão é coberta posteriormente por um micélio branco e por uma grande quantidade de esporos fúngicos de coloração verde, muitas vezes tomando o fruto inteiro. Os sintomas iniciais são o aparecimento de uma mancha mole, circular de aspecto encharcado e uma ligeira descoloração da superfície afetada, seguido do aparecimento de um micélio branco na superfície do fruto e desenvolvimento de conídios de coloração verde no centro do micélio, sendo a cor dos esporos normalmente visíveis em lesões com mais de dois

centímetros de diâmetro (LARANJEIRA *et al.*, 2002). Frutos infectados têm seu período de armazenamento reduzido pela formação de etileno, acelerando o processo de maturação, diminuindo a vida de prateleira dos frutos.

## 1.6. Pêssego

Originário da China e pertencente à família das rosáceas, o pessegueiro (*Prunus persica*) é hoje cultivado em várias partes do mundo e, dentre as rosáceas comercialmente cultivadas, possui a fruta mais sensível ao manuseio e armazenamento devido à fina epiderme que envolve a parte comestível (MARGARIDO, 1988). Sua produção foi mais de 15 milhões de toneladas em 2004 (FAO, 2005). No mundo, os maiores produtores de pêssego são a China, Itália e EUA. O Brasil é o 14º produtor mundial, com uma produção anual de 216.000 toneladas com uma área de cultivo de 24.000 hectares (FAO, 2005), sendo o Sul e o Sudeste como as principais regiões produtoras nacionais (GUTIERREZ, 2005). Cerca de 57% da produção nacional dos pêssegos são destinados ao consumo *in natura*, sendo os 43% restantes destinados à industrialização (FERNANDEZ, 2000).

As principais dificuldades encontradas para a expansão da cultura no Brasil são a alta pericibilidade e o comportamento climatérico do fruto, apresentando alta produção de etileno e uma elevada sensibilidade a este fitormônio (DAREZZO, 1998). As doenças de pós-colheita estão entre os principais fatores da curta duração do tempo de armazenamento e de prateleira desta fruta (MARTINS & AMORIN, 2005). As estimativas de danos em pós-colheita em frutos tropicais e subtropicais variam de 10 a 50% da produção (WILSON *et al.*, 1994; BENATO, 1999; DURIGAN, 1999; GUTIERREZ, 2005).

A ocorrência de distúrbios em pós-colheita pode ser de natureza física, fisiológica e patológica, podendo se expressar desde a colheita até ao consumidor (KLUDGE *et al.*, 2001). Martins *et al.* (2005a) realizaram um estudo para quantificar os danos de pós-colheita em pêssegos comercializados na CEAGESP em 2001 e 2002, e neste trabalho, observaram que a variação nos frutos danificados foi de 5,9 a 10,6% na safra de 2001 e de 4,9 a 44,5% na safra 2002. Frutos doentes variaram de 2,4 a 8% em 2001 e de 4,3 a 15,2% em 2002, havendo um incremento na extensão da doença.

As doenças mais comuns na pós-colheita de pêssegos são a podridão parda, casada por *Monilinia fructicola*, e a podridão mole, causada por *Rhizopus stolonifer*, existindo outros patógenos que são também frequentemente relatados causando doenças em pós-colheita de pêssegos, tais como fungos dos gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Alternaria* (MARTINS *et al.*, 2005a). De um modo geral, esses patógenos têm como inóculo primário os conídios formados em frutos infectados e em restos culturais (FORTES & MARTINS, 1998) que são disseminados pelo vento, água e insetos, atingindo os frutos, penetrando, na maioria das vezes, por ferimentos (MARTINS *et al.*, 2005).

Entendendo a importância da região em estudo e a inexistência de pesquisas neste ambiente, pretendeu-se neste trabalho, fornecer maiores informações a respeito da estrutura populacional e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado. Neste contexto, este trabalho teve os seguintes objetivos:

- Estudar, por meio de métodos tradicionais de cultivo, a ocorrência, densidade e diversidade de leveduras totais e endofíticas associadas a determinadas plantas frutíferas do Cerrado de áreas preservadas;
- Analisar a diversidade genética de leveduras totais e endofíticas associadas a folhas e frutos de *Anacardium humile*, *Byrsonima crassifolia*, *Eugenia dysenterica*, *Psidium pohlianum* e *Sabicea brasiliensis* por meio de métodos moleculares;
- Descrever representantes de possíveis espécies novas nos hospedeiros em estudo;
- Avaliar *in vitro* o potencial de leveduras do Cerrado como agente de biocontrole contra vários fitopatógenos de pós-colheita e *in vivo* contra fitopatógenos de pós-colheita em frutos de laranja e pêssego.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Locais de coleta**

Os locais de coleta foram: Jardim Botânico de Brasília (Coordenadas: S 15°54'0" W 47°51'30"), Parque Nacional de Brasília (Coordenadas: S 15°47' e W 47°56') e Reserva do Centro Olímpico da UnB (Coordenadas: S 15°45'57" e W 47°51'16"), todos os locais estão localizados no Distrito Federal.

### **2.2. Plantas amostradas**

Foram coletadas amostras de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado: *Sabicea brasiliensis* (Rubiaceae), conhecida como Sangue-de-Cristo, *Psidium pohlianum* (Myrtaceae), conhecida como araçá, ambas coletadas em 21 de março de 2011 no Jardim Botânico; *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae), o muricizão, coletado em 09 de junho de 2011 na reserva do Centro Olímpico; cajuzinho-do-Cerrado, *Anacardium humile* (Anacardiaceae) e a cagaita, *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae), coletados no Parque Nacional de Brasília nos dias 23 de setembro e 07 de outubro de 2011, respectivamente. Estas plantas foram selecionadas por terem frutos carnosos e de sabor adocicado.

### **2.3. Coleta**

As amostras de plantas do Cerrado foram coletadas no período de 21 de março a 07 de outubro de 2011.

Folhas e frutos maduros sem sintomas de estresse biótico ou abiótico foram coletadas assepticamente em sacos plásticos estéreis, sendo imediatamente acondicionadas em caixas de isopor com gelo e transportadas para uma câmara fria a 4°C no Departamento de Fitopatologia (FIT), no Instituto de Biologia (IB-UnB), sendo processadas no máximo 48 horas após as coletas.



## **2.4. Processamento das amostras**

### **2.4.1. A partir de folhas e frutos**

Folhas e frutos sadios das plantas coletadas foram cortados em pedaços pequenos e, com auxílio de um cadinho e um pistilo, foram então macerados e colocados em frascos erlenmeyers com solução de água peptonada 0,8% (Tabela 1A – Anexos), numa proporção de 9 mL de solução para cada grama de folha ou fruto, e colocados sob agitação durante 25 minutos a 150 rpm. Feita a agitação, foram realizadas diluições seriadas decimais de até  $10^{-3}$  em tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada e então, alíquotas de 100  $\mu$ L foram pipetadas e, com auxílio de uma alça de Drigalski, foram então espalhadas homogeneamente na superfície do meio de cultura MYGP em placas de Petri (extrato de malte, extrato de levedura, glicose e peptona) (Tabela 1A – Anexos) acrescido de cloranfenicol ( $250 \text{ mL.L}^{-1}$ ), com três placas por diluição e incubadas numa câmara de crescimento (B.O.D.) a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 4 dias. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), e as colônias de leveduras de cada tipo morfológico foram repicadas em placas de Petri com meio MYGP.

As colônias representativas de leveduras de morfotipos diferentes que cresceram isoladamente foram repicadas em meio MYGP. As culturas de leveduras puras foram devidamente catalogadas e conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em criotubos com 700  $\mu$ l de meio MYGP líquido acrescidos de 300  $\mu$ L de Glicerol a 50% (Tabela 1A – Anexos).

### **2.4.2. A partir da parte interna das folhas e frutos (Leveduras endofíticas)**

O processamento das amostras foi realizado de acordo a técnica de desinfecção superficial com hipoclorito de sódio descrito por Araújo *et al.* (2001). As amostras foram previamente pesadas e lavadas com água destilada estéril para retirada de poeira depositada sobre a superfície das folhas e frutos. Após, foram imersos em etanol 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio (HClO) 2% de 3-5 minutos, novamente imersos em etanol a 70% durante 30 segundos, enxaguados por duas vezes em água destilada

estéril. Alíquotas de 100 µL da última água de lavagem foram adicionadas, em triplicata, em placas de Petri com meio MYGP para assegurar a eficácia do método na desinfecção superficial.

Posteriormente, foram cortadas em fragmentos e sendo realizada a maceração, diluição seriada, plaqueamento, incubação, isolamento, purificação e estocagem dos diferentes morfotipos conforme descrito acima.

## **2.5. Identificação de leveduras**

As leveduras foram agrupadas por meio suas características morfológicas, fisiológicas e moleculares de acordo com o padrão de bandas gerados pela determinação de polimorfismo de regiões de mini e micro-satélites e sequenciamento do rDNA 26s.

### **2.5.1. Caracteres Fenotípicos**

A identificação fenotípica foi realizada segundo Dias & Schwan (2010) com base em características macroscópicas, observando a morfologia da colônia. Os caracteres observados foram: crescimento, aspecto, cor, forma, tamanho, superfície, bordas e perfil (Anexo).

### **2.5.2. Testes bioquímicos/fisiológicos**

#### **2.5.2.1. Teste de fermentação**

Foi verificada a capacidade de cada levedura de fermentar glicose. Os isolados utilizados foram anteriormente crescidos em meio MYGP a fim de obter células metabolicamente ativas e então essas culturas foram posteriormente inoculadas em tubos de ensaios com meio mínimo de fermentação (MMF) (Anexo) contendo tubos de Durham invertidos no seu interior. A leitura dos tubos de fermentação foi feita no 1º, 2º, 5º, 7º, 10º e 14º dia após a inoculação. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás no tubo de Durham.

### **2.5.2.2. Assimilação de fontes de carbono**

As seguintes fontes de carbono foram testadas para verificar a capacidade de assimilação das leveduras, são elas: glicose, galactose, L-sorbose (Hexoses), maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose (Dissacarídeos), rafinose, melizitose (Trissacarídeos), inulina, amido solúvel (Polissacarídeos), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose (Pentoses), etanol, glicerol (Álcoois), eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-manitol, D-glucitol (sorbitol) (Polióis), salicina (Glicosídeo), DL-lactato, succinato, citrato de sódio (Ácidos Orgânicos), M.inositol, metanol, hexadecano, glucosamina, xylitol, acetona, etilacetato, isopropanol, gluconato, N.acetilglucosamina. O método de Barnett *et al.* (2000) foi o utilizado. Alíquotas de 400 µL de cada levedura foram adicionadas em cada um dos 21 poços do replicador de Steer e então repicadas em placas contendo o meio Yeast Nitrogen Base (YNB – Tabela 1A - Anexo) juntamente com as fontes de carbono descritas acima. As placas foram incubadas por 21 dias a 25°C.

### **2.5.2.3. Assimilação de fontes de nitrogênio**

Para a assimilação de fontes de nitrogênio foram utilizadas nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>), nitrito de potássio (KNO<sub>2</sub>) e lisina como únicas fontes nitrogenadas, utilizando a mesma técnica de réplica em placas do teste de assimilação de fontes de carbono. As leveduras foram previamente repicadas em meio ágar YEPG (Tabela 1A – Anexo) e posteriormente foram então transferidas para placas contendo meio YCB (Tabela 1A – Anexo) 1,17% com 2% de Ágar e as fontes de nitrogênio testadas na concentração de 0,078% para nitrato, 0,026% para nitrito e 0,056% para lisina. As placas foram incubadas por até 21 dias a 25°C. O resultado foi positivo quando se constatou o crescimento da levedura na superfície do meio.

### **2.5.2.4. Crescimento em diferentes temperaturas**

Para verificar o crescimento das leveduras em diferentes temperaturas utilizou-se o meio Saubouraud (Tabela 1A – Anexo) em placas em duplicata. Feita a inoculação, as placas foram incubados em estufas a 37°C e banho-maria a 40°C por até quatro dias,

realizando leituras diárias para observar o crescimento de colônias na superfície do meio sólido.

#### **2.5.2.5. Teste de tolerância a NaCl [10%]**

Durante 21 dias, avaliou-se a capacidade de crescimento das leveduras numa concentração de solução salina hipertônica de NaCl [10%]. O meio de cultura utilizado foi YEPG acrescido de cloreto de sódio na concentração citada acima. A incubação foi a 25°C por um período de três semanas. A leitura foi realizada de sete em sete dias de acordo com o crescimento na superfície do meio sólido (BARNETT *et al.*, 2000).

#### **2.5.2.6. Produção de compostos amilóides**

Para avaliar a produção de compostos amilóides, adicionou-se uma solução de lugol (iodo com iodeto de potássio 1:5) à placa com crescimento positivo da amostra em meio YNB com glicose. O resultado foi considerado positivo quando constatado a presença de um complexo esverdeado a azulado na colônia, devido a reação da solução de iodo com o composto amilóide.

### **2.6. Caracterização Molecular**

#### **2.6.1. Determinação de polimorfismo de regiões de mini e micro-satélites (MSP-PCR)**

Nessa reação de polimerização em cadeia (PCR), o *primer* M13 (5'-GAG GGT GCG GGT TCT-3') foi utilizado. Para a reação de amplificação, microtubos do tipo Eppendorf® (200 µl) sendo utilizados com um volume final de 12,5 µL, contendo 10-20 ng de DNA, 20 pmol do oligonucleotídeo iniciador, 2,5 µL de tampão 5x Promega®, 200 µL de dNTPs (dATP, ACTP, dGTP, dTTP), 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e água desionizada (*Milli-Q*) esterilizada para completar o volume final. O programa utilizado para amplificação possui as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 20

segundos a 94°, 1 minuto a 50°C e 20 segundos a 72°C, com uma extensão final de 72°C durante 6 minutos. Os amplicons resultantes foram analisados num gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 2% em tampão TBE 0,5x. Para estimativa dos tamanhos dos amplicons, foi utilizado o marcador de tamanho de 100 pb DNA Ladder (Promega<sup>®</sup>, Madison, USA). Foi usado o programa Bionumerics<sup>®</sup> (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) para realizar o agrupamento de isolados com o mesmo padrão de bandas, utilizando a média de similaridade UPGMA (“Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Average”) com o coeficiente Dice, que considera a presença de bandas, utilizando uma filtragem de banda com 5 %.

## **2.7. Teste de antagonismo *in vitro***

### **2.7.1. Fitopatógenos**

Ao todo foram utilizados 10 fungos fitopatogênicos nos testes antagônicos *in vitro*. Isolados dos fitopatógenos *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* foram obtidos do Instituto Federal de Goiás (IFG) campus Urutaí. *Botrytis cinerea* e *Penicillium italicum* são provenientes da Coleção Micológica da Universidade de Brasília, depositado sob os números 1788 e 1766, respectivamente. Os fungos *Alternaria alternata* e *Penicillium* sp. foram isolados de frutos sintomáticos de nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica*). *Penicillium digitatum* foi isolado de sintomas em frutos de laranja (*Citrus x sinensis*) e o fitopatógeno *Rhizopus* sp. foi isolado de frutos sintomáticos de jaca (*Artocarpus heterophyllus*).

### **2.7.2. Teste *in vitro***

#### **2.7.2.1. Screening inicial**

Para seleção massal de possíveis isolados de leveduras com potencial antagônico, um teste de pareamento de colônias foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Tabela 1A – Anexo) com diâmetro de 9 cm. Quatro

discos miceliais de 0,5 cm com cinco dias de idade de cada fitopatógeno foram repicados em 4 pontos equidistantes e a 2,25 cm do centro da placa. Os isolados foram repicados ao longo do o diâmetro da placa em duas retas que se cruzavam no centro da placa e fazendo um ângulo de 90° entre si e 45° em relação aos discos miceliais. O controle consistiu na placa contendo somente os discos miceliais sem as leveduras antagonistas. Foram considerados com potencial de antagonismo os isolados que cuja placa foi constatada a presença de um halo de inibição. As placas foram mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h até quando os diâmetros das colônias das testemunhas se encontrarem.

### **2.7.2.2. Seleção de leveduras antagonicas a patógenos de pós-colheita**

Com uma alça de semeadura contendo colônias da levedura antagonista, foi realizados uma estria em placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA acrescido de cloranfenicol (34 mg/mL) (Tabela 1A – Anexos) a 3 cm da borda. Um disco de micélio de 0,5 cm dos fitopatógenos (*Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Penicillium* sp., *Monilinia* sp. e *Rhizopus* sp.) foi posicionado a 3 cm da borda e a 3 cm da estria do antagonista. O controle consiste na placa contendo somente o patógeno sem a levedura. As placas foram mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h. O crescimento radial do micélio foi avaliado por meio da média entre duas medições diametralmente opostas, quando a borda das placas controle foi atingida pela colônia fúngica. Foram utilizadas cinco repetições por isolados de levedura avaliados. Os fitopatógenos que apresentaram algum efeito inibitório nos testes *in vitro* foram selecionados para o teste *in vivo*.

### **2.7.3. Teste de antagonismo *in vivo***

#### **2.7.3.1. Ajuste da concentração de inoculo**

Para obter os esporos dos fungos que sofreram alguma inibição nos testes anteriores, placas de Petri com BDA contendo os fitopatógenos com 5 dias de crescimento, que foram repicados, foram lavadas com água destilada estéril e, com

auxílio de um microscópio de luz, câmara de Neubauer e um contador manual de volumes, a concentração foi ajustada para  $10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

As suspensões de leveduras foram preparadas a partir de cultivo em meio de cultura MYGP líquido (Tabela 1 – Anexos), cujos frascos foram colocados sob agitação a 150 rpm durante 72 h a temperatura ambiente. Utilizando microscópio de luz, câmara de Neubauer e um contador manual de volumes, a concentração foi ajustada em  $10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>.

### **2.7.3.2. Teste de antagonismo *in vivo* em laranja (*Citrus x sinensis*) e pêsego (*Prunus persica*)**

Os frutos de laranja (*Citrus x sinensis*) e de pêsego (*Prunus persica*) foram obtidos em lojas que comercializam frutos em Brasília. Os frutos passaram por uma triagem para selecionar somente os aqueles sem injúrias, para utilização nos testes de antagonismo. Os frutos foram submersos em solução de hipoclorito de sódio a 2 % (v/v) por 2 minutos, enxaguados com água destilada estéril e secos a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente foram cortados com o auxílio de um bisturi estéril para fazer quatro ferimentos na parte equatorial de 2 mm de profundidade por 6 mm de comprimento na parte equatorial, sendo 5 frutos por tratamento. Uma gota de 30 µl da suspensão das leveduras foi aplicada em cada ferimento nos frutos, que foram então acondicionados em caixas plásticas e armazenadas durante 1 h e 30 minutos. Para manter a umidade elevada, papéis filtros foram acondicionados no fundo das caixas e então molhados com água destilada estéril. Após a secagem dos ferimentos realizados nos frutos, eles foram então inoculados com gotas de 20 µL da suspensão de esporos dos fitopatógenos (*Monilinia* sp. e *Penicillium* sp. em pêsego e *P. digitatum* em laranja). Os frutos foram então levados em caixas de plástico para câmara de crescimento tipo B.O.D. acondicionados sob temperatura de 25 °C com um fotoperíodo de 12 h. Os frutos utilizados como testemunha foram tratados somente com a suspensão de esporos dos fitopatógenos. A leitura do experimento foi realizada quando os diâmetros dos ferimentos das testemunhas se encontraram.

A severidade da doença nos frutos que apresentaram sintomas foi avaliada medindo os diâmetros das lesões que foram submetidos a ANOVA e um posterior teste de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o programa estatístico R versão 2.14.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Isolamento de leveduras

Foi constatado a presença de leveduras nas 5 espécies diferentes de plantas (*Sabicea brasiliensis*, *Psidium pohlianum*, *Byrsonima crassifolia*, *Anacardium humile* e *Eugenia dysenterica*) retiradas de áreas de conservação do Cerrado em Distrito Federal, utilizando meio MYGP para isolamento. Foram encontrados 215 isolados de leveduras (172 totais e 43 endofíticas) sendo estas 94 provenientes de folha e 121 de frutos. A tabela 1 compara os resultados obtidos quanto à porcentagem das leveduras totais isoladas de cada órgão de cada planta.

TABELA 1 – Porcentagem (%) de leveduras totais encontradas em folhas e frutos em cinco plantas do Cerrado.

<b>HOSPEDEIRA</b>	<b>TOTAL (100%)</b>	<b>FRUTO</b>	<b>FOLHA</b>
<i>Sabicea brasiliensis</i>	97	68,7	31,3
<i>Psidium pohlianum</i>	8	100	0
<i>Byrsonima crassifolia</i>	66	40,9	59,1
<i>Anacardium humile</i>	28	53,6	46,4
<i>Eugenia dysenterica</i>	16	31,3	68,7

Observando a Tabela 1, fica evidente que a relação de isolados de frutos e folhas não segue um padrão, variando de uma planta para outra mesmo sendo aplicada a mesma metodologia.

A contagem de UFC.g<sup>-1</sup> de fruto/folha de leveduras totais e endofíticas também obteve significativa variação entre as espécies utilizadas neste trabalho. A densidade populacional das leveduras totais e endofíticas variaram dentro da mesma hospedeira e também entre as diferentes hospedeiras (Tabela 2). Possivelmente isso se deve a diferença na composição química e disponibilidade de açúcares simples, polissacarídeos e outros compostos de carbono entre as amostras analisadas já que estes compostos permitem a colonização desses nichos por parte das leveduras que dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia.



TABELA 2 – Número de unidades formadoras de colônia de leveduras totais e endofíticas nas cinco amostras de plantas do Cerrado de diferentes áreas de preservação.

Amostra	Planta	Leveduras Totais		Leveduras Endofíticas	
		UFC.gFruto <sup>-1</sup>	UFC.gFolha <sup>-1</sup>	UFCg.Fruto <sup>-1</sup>	UFC.gFolha <sup>-1</sup>
JB01	<i>S. brasiliensis</i>	2,2.10 <sup>2</sup>	1,7.10 <sup>1</sup>	4,4.10 <sup>1</sup>	NC
JB02	<i>P. pohlianum</i>	NC	NC	NC	-
CO02	<i>B. crassifolia</i>	1,4.10 <sup>1</sup>	2,1.10 <sup>-1</sup>	NC	NC
PN01	<i>A. humile</i>	3,1.10 <sup>1</sup>	6,0.10 <sup>-1</sup>	-	-
PN02	<i>E. dysenterica</i>	NC	NC	NC	NC

NC: não calculável.

A densidade de leveduras totais variou de  $2,2 \times 10^2$  a menos de 25 unidades formadoras de colônia por grama de fruto e variou de  $6,0 \times 10^1$  a menos de 25 unidades formadoras de colônia por folha. É bem provável que isso tenha ocorrido devido a uma maior disponibilidade de açúcares simples em órgãos de reserva, no caso dos frutos, do que quando comparado com as folhas. A densidade de leveduras endofíticas nos tecidos das plantas, tanto nas folhas como nos frutos, foram significativamente menor do que as leveduras totais.

Leveduras totais foram isoladas de folhas e frutos com 100% de ocorrência entre as plantas estudadas. Com exceção de *P. pohlianum* e *E. desinterica*, em todas as outras plantas amostradas foi possível realizar as contagens de unidade formadora de colônia por grama de fruto. Nos frutos, os números de células foi de  $1,4 \cdot 10^1$ , em *B. crassifolia*, a  $2,2 \cdot 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> de fruto em *S. brasiliensis*. Quando o órgão processado foi a folha, o número obtido foi de  $1,7 \cdot 10^1$ , em *S. brasiliensis*, e  $6,0 \cdot 10^1$ .g<sup>-1</sup> em *Anacardium humile*. Quando comparado com resultados de outros autores, estes números são menores. Landell (2006) obteve valores entre 3,4 a  $1,99 \cdot 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> isolando leveduras do filoplano de bromélias. Isaeva *et al.* (2010) obtiveram  $10^5$ UFC.g<sup>-1</sup> na superfície de frutos das 29 espécies de plantas estudadas.

Os métodos utilizados para isolamento de leveduras endofíticas foram eficientes e garantiram, para todas as amostras, a ausência de crescimento de colônias microbianas em placas de Petri com meio MYGP nas quais foi pipetada a última água de lavagem dos frutos e folhas.

Os resultados obtidos demonstram que a presença e o desenvolvimento de leveduras endofíticas devem ser considerados como um fenômeno que ocorre em quase todas as espécies vegetais, visto que estas estavam presentes em quase todas as plantas amostradas.

Para leveduras endofíticas, dentre todas as hospedeira utilizadas neste trabalho, *S. brasiliensis* foi a única planta amostrada que apresentou contagem de leveduras, o que tornou possível os cálculos de densidade de UFC.g de fruto<sup>-1</sup>. Já em folhas, a densidade de leveduras endofíticas encontradas nesta mesma hospedeiras foi abaixo de 25 UFC por grama de folha. Provavelmente, isto foi devido os frutos serem órgãos de armazenamento, com um maior teor de carboidratos e açúcares simples que são preferencialmente assimilados pelas leveduras.

Em folhas e frutos de *P. pohlianum*, *E. dysenterica* e em folhas de *B. crassifolia* verificou-se o crescimento de UFCs endofíticas, entretanto por estar em quantidades inferiores a 25 colônias por placa, não foi possível realizar os cálculos de densidade de UFC por grama de amostra. Estes resultados são considerados baixos quando são comparados com os valores de leveduras endofíticas encontrados por Vale *et al.* (2009) em frutos de café (*Coffea arabica*) provenientes de cafezais de Minas Gerais, onde os valores encontrados foram de até  $6,5 \times 10^4$  UFC.fruto<sup>-1</sup>. Quando comparado estes resultados com os obtidos por Isaeva *et al.* (2010) eles são considerados baixos, onde seus estudos mostraram que o número de leveduras que estavam presentes nos tecidos internos não ultrapassaram  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de amostra. Isso mostra que a distribuição de células de leveduras nos tecidos internos das plantas estudadas foi extremamente irregular. De todas as hospedeiras, somente *A. humile* não se obteve nenhum isolado endofítico de folhas e frutos. Isso pode ser atribuído ao fato dos frutos destas hospedeiras serem mais ácidos quando comparada com outras plantas amostradas, o que contribui para um baixo pH refletindo assim na colonização das partes internas destas hospedeiras pelas leveduras.

Embora as leveduras sejam um dos grupos de microrganismos epifíticos mais comumente encontrados colonizando superfícies foliares, diversos estudos têm demonstrado que não raro são encontradas em partes internas das plantas. Ao mesmo tempo, leveduras pertencentes à mesma espécie são frequentemente encontradas na superfície e dentro de plantas que contém altas concentrações de compostos de carbonos disponíveis (ISAEVA *et al.*, 2010).

Possivelmente, a presença de leveduras tanto em partes internas como em partes superficiais de órgãos vegetais indicam que um dos principais mecanismos de entrada de células de leveduras é através de microferimentos e aberturas naturais como estômatos e lenticelas, onde os nutrientes disponíveis nestes ambientes determinam a sobrevivência da população das leveduras (ISAEVA *et al.*, 2009). Morris (2001) demonstrou que a penetração aleatória de células microbianas em tecidos vegetais é bastante usual. Elas são capazes de se reproduzirem no espaço intercelular e dentro de células sem, no entanto, causar danos às células, utilizando como fontes de energia açúcares livres, não envolvendo a hidrólise de polímeros vegetais.

Levando-se em conta estes resultados encontrados, pode-se sugerir que o crescimento de leveduras tanto endofíticas quanto epifíticas foram preponderantes em partes das plantas que possuem uma alta concentração de açúcares simples. Até a presente data, há poucas investigações sistemáticas sendo conduzidas sobre leveduras endofíticas. A grande maioria dos dados disponíveis estão fragmentados. No entanto, nosso conhecimento dos padrões de distribuição e propriedades biológicas foi de suma importância para ampliar a compreensão das características ecológicas deste grupo de fungos, bem como os processos de interesse prático como qualidade dos frutos, condições de armazenamento e biocontrole de fitopatógenos. Neste contexto, um esforço maior deve ser feito para estimar a distribuição e a diversidade de espécies de leveduras em tecidos de plantas ou mesmo em superfícies de órgãos vegetais como frutos, sementes, raízes e folhas.

Alguns fatores podem ter limitado a colonização das plantas pelas leveduras. A distribuição dos nutrientes disponíveis, níveis de umidade e radiação UV oriunda da luz solar são fatores importantes que condicionam a distribuição e sobrevivência das leveduras em superfícies e nos tecidos de plantas hospedeiras. A filosfera é um nicho que é altamente exposto a radiação solar (FONSECA & INÁCIO, 2006). Brandão *et al.* (2011) observaram que níveis de radiação UV afetam diretamente na estrutura e na diversidade da comunidade de leveduras em lagos com pouca atividade antrópica na patagônia Argentina.

### 3.2.Aspecto Morfológico

O resultado obtido do isolamento mostrou colônias de leveduras com grande diversidade morfológica (Tabela 2A - Anexos). Isolados ditos não-pigmentados representam a maioria das leveduras obtidas. Algumas leveduras pigmentadas foram isoladas dos frutos e folhas amostradas (Figura 1). Carotenóides e melanina, bem como outros pigmentos, desempenham um papel importante na proteção da radiação ultravioleta. Essas características foram atribuídas a leveduras basidiomicéticas. Segundo Fonseca & Inácio (2006), isolados produtores de pigmentos, tais como leveduras-vermelhas e leveduras-negras, foram mais comumente encontradas em nichos como filoplano e superfície de sementes quando comparado com amostras de solo. Isso é devido aos níveis de radiação que foram mais elevados na superfície de tecidos da parte aérea da planta do que no solo.

As leveduras pigmentadas foram mais frequentes em amostras que não passaram pelo processo de desinfecção superficial, não sendo constatada sua presença em tecidos internos das plantas amostradas. A ausência de pigmentos foi a característica dominante entre os isolados endofíticos e estas tiveram uma maior frequência nos frutos. Esta é uma característica comum às leveduras ascomicéticas, evidenciando assim, uma maior predominância destas leveduras na parte interna das plantas amostradas. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Santos *et al.* (1996) onde encontraram com mais frequência leveduras não-pigmentadas associadas a frutos e flores e as leveduras pigmentadas em solo e superfície de folhas de plantas na região do semi-árido do nordeste brasileiro.

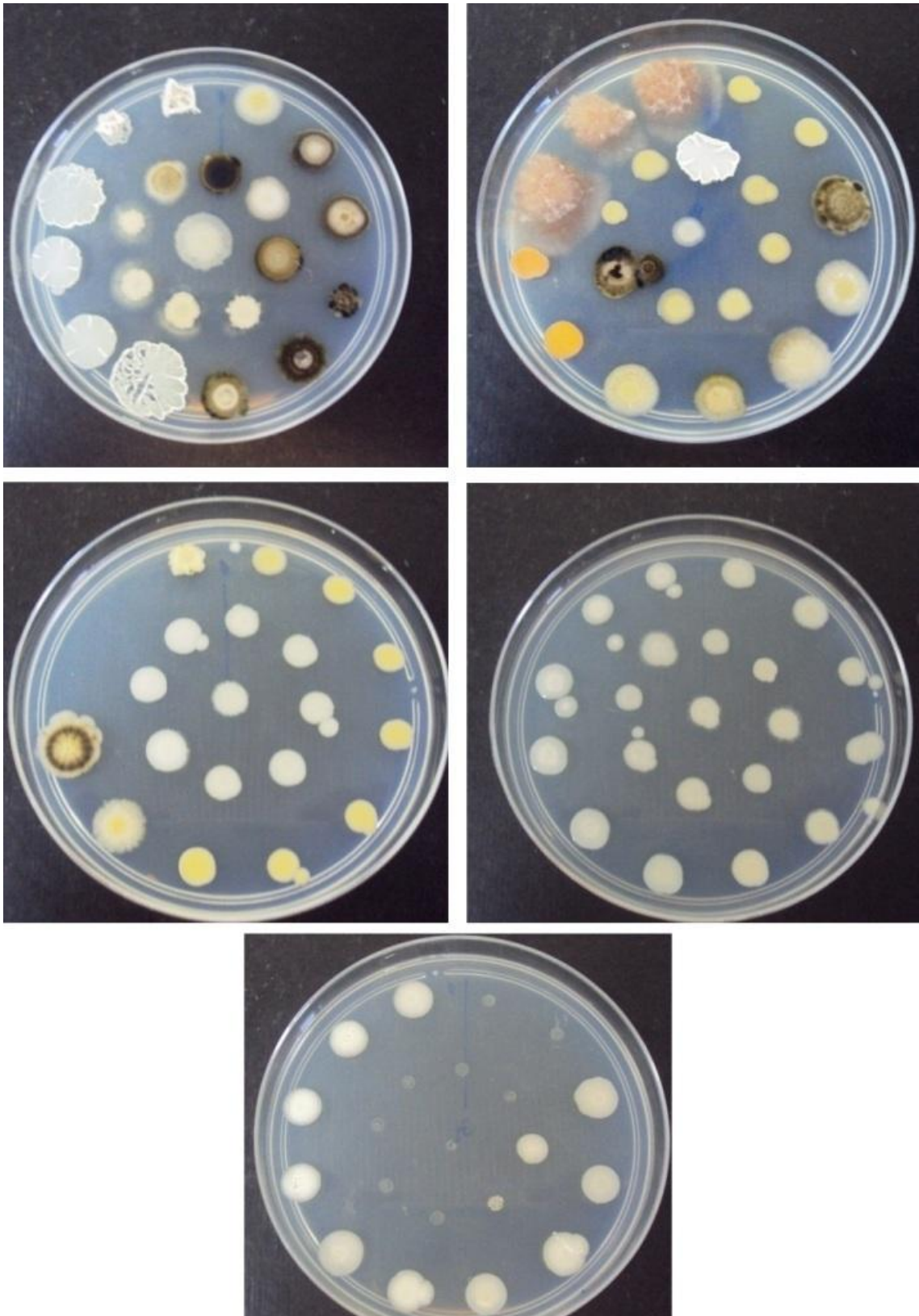


Figura 1 – Aspecto morfológico de colônias de leveduras isoladas de *Sabicea brasiliensis*, *Psidium pohlianum*, *Byrsonima crassifolia*, *Eugenia dysenterica*, *Anacardium humile*, crescidas em meio com glicose como única fonte de carbono por 7 dias a 25°C.

Leveduras nas hospedeiras estudadas não foram antes reportadas, sendo o presente trabalho o primeiro a relatar a ocorrência, densidade e diversidade de leveduras nas hospedeiras em estudo e o primeiro trabalho a constatar a presença de leveduras endofíticas em folhas e frutos de plantas do bioma Cerrado.

### **3.3. Diversidade de leveduras associadas a plantas do Cerrado**

#### **3.3.1. Testes fisiológicos**

A identificação dos isolados de leveduras por meio de característica morfológica e testes fisiológicos/bioquímicos seguindo os padrões descritos por Kurtzman & Fell (2010) mostraram a ocorrência de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Pseudozyma* e outros não identificados e que não corresponderam às descrições das espécies padrão encontradas na literatura. No entanto, para a maioria dos isolados, não foi possível identificar a nível de espécie porque estes métodos de identificação são processos longos e muitas vezes levam a resultados duvidosos, assumindo uma importância maior somente no caso de descrição de novas espécies, onde é necessário conhecer características morfológicas do organismo em estudo. Portanto, a maioria dos isolados não puderam ser identificados por meio destes testes, sendo submetidas ao seqüenciamento do domínio D1/D2 do rRNA subunidade 26S. Esta região tem sido bastante utilizada com sucesso para a identificação molecular de leveduras.

#### **3.3.2. Análise do *fingerprint* gerado por meio MSP-PCR**

Os amplicons resultantes da PCR com o *primer* M13 mostraram elevado polimorfismo. As imagens resultantes da eletroforese dos produtos de MSP-PCR em géis de agarose com a eletroforese dos produtos de MSP-PCR foram então analisadas e os 215 isolados de leveduras obtidos foram agrupados em um dendograma formando 129 *clusters* diferentes. Por meio da análise que utilizou o algoritmo UPGMA com o coeficiente Dice, que considera a presença de bandas, os 129 grupos foram agrupados em um alto nível de similaridade (100%), utilizando uma filtragem de banda com 5% (Figura 2).

Leveduras isoladas de hospedeiras diferentes foram agrupadas em um mesmo *cluster*, como o isolado 166, oriundo de *S. brasiliensis*, foi agrupado com outros três isolados, 420, 421 e 423 recuperados de *Eugenia dysenterica*. Essas hospedeiras foram coletadas em diferentes áreas de preservação; *S. brasiliensis* foi coletada no Jardim Botânico de Brasília enquanto que *E. dysenterica* foi coletada no Parque Nacional de Brasília. Estes resultados sugerem que algumas leveduras estão presentes em diferentes hospedeiras, sob diferentes locais do Cerrado. Outros isolados como 169, 170 e 171, de *S. brasiliensis* e os isolados 314, 325 e 326, de *B. crassifolia*, também foram agrupadas. Os isolados 131, 132, 133, de *S. brasiliensis*, e o isolado 187, isolada de *P. pohlianum* formaram um mesmo agrupamento. Dentre as hospedeiras utilizadas neste estudo, a planta *S. brasiliensis* foi a hospedeira com maior número de isolados e diversidade de leveduras, tendo representantes dentro da maioria dos grupos formados. Este resultado sugere que este hospedeiro seja um ótimo nicho para colonização das leveduras, evidenciando uma maior disponibilidade de compostos simples de carbono, como glicose e outros carboidratos, mostrando também que há uma nítida variação da disponibilidade desses nutrientes entre as diferentes espécies vegetais utilizadas para isolamento neste trabalho.

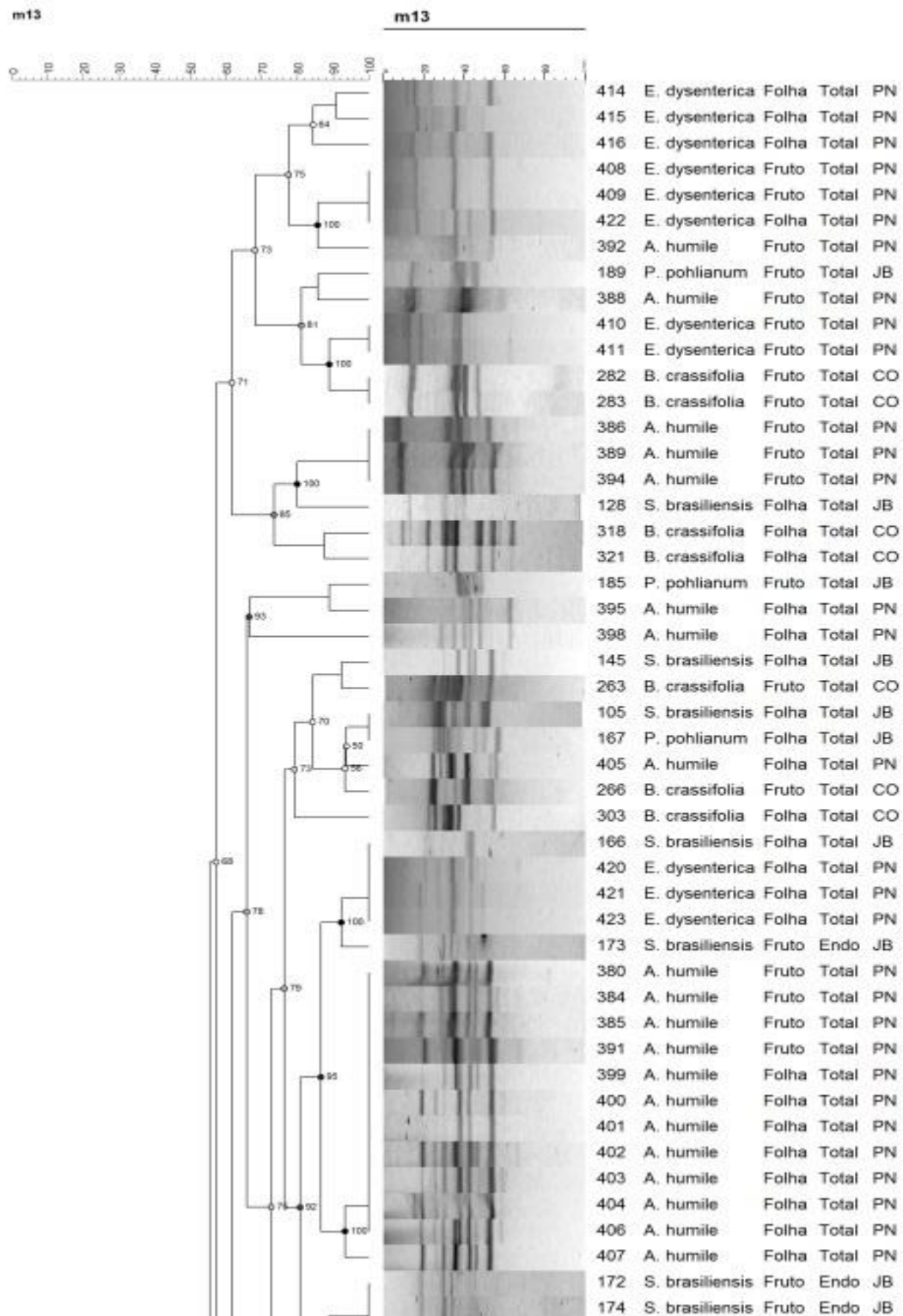


Figura 2 – Dendrograma de similaridade dos isolados de leveduras totais e endofíticas de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação de DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.



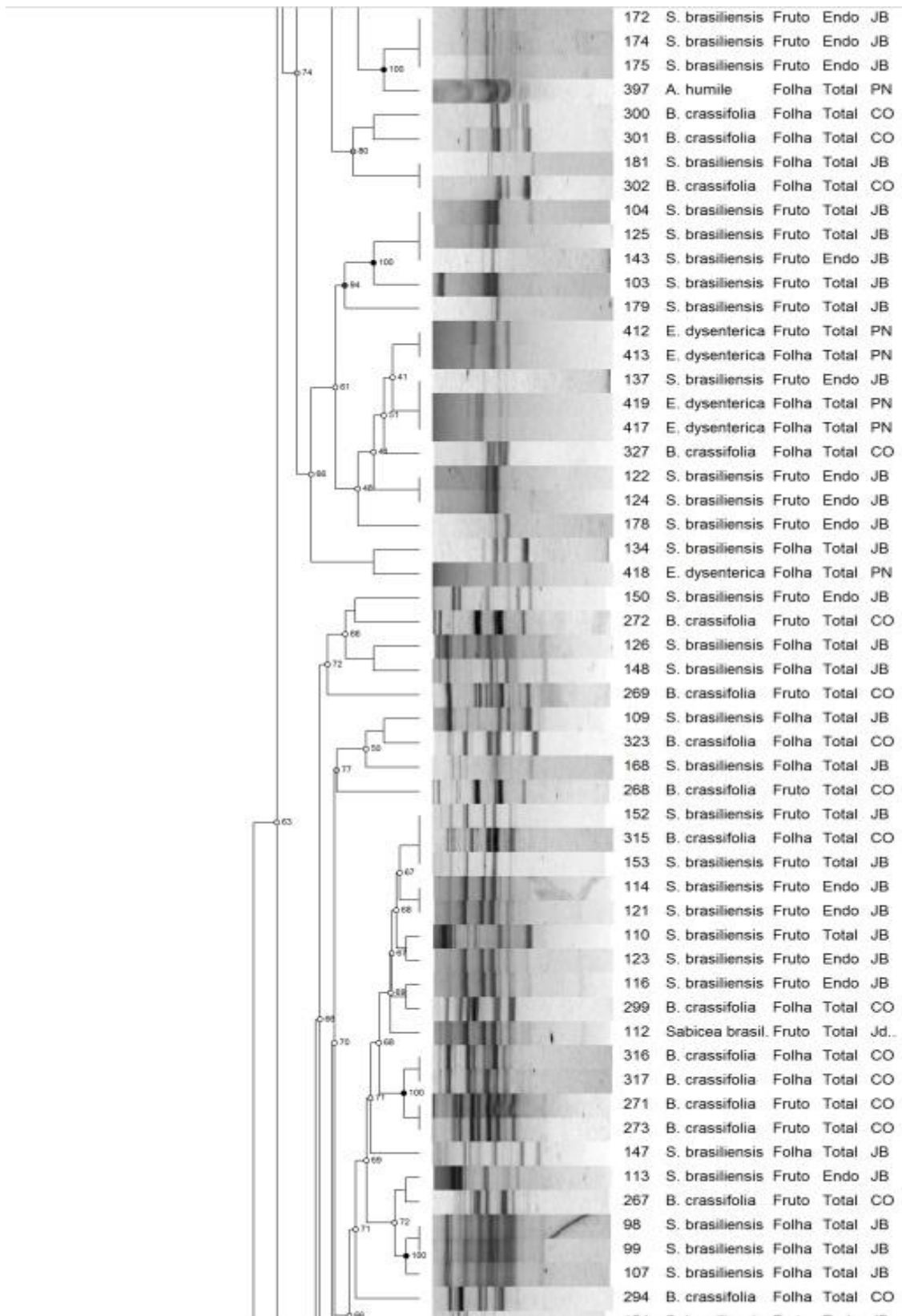


Figura 2 – Cont. - Dendrograma de similaridade dos isolados de leveduras totais e endofíticas de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação de DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

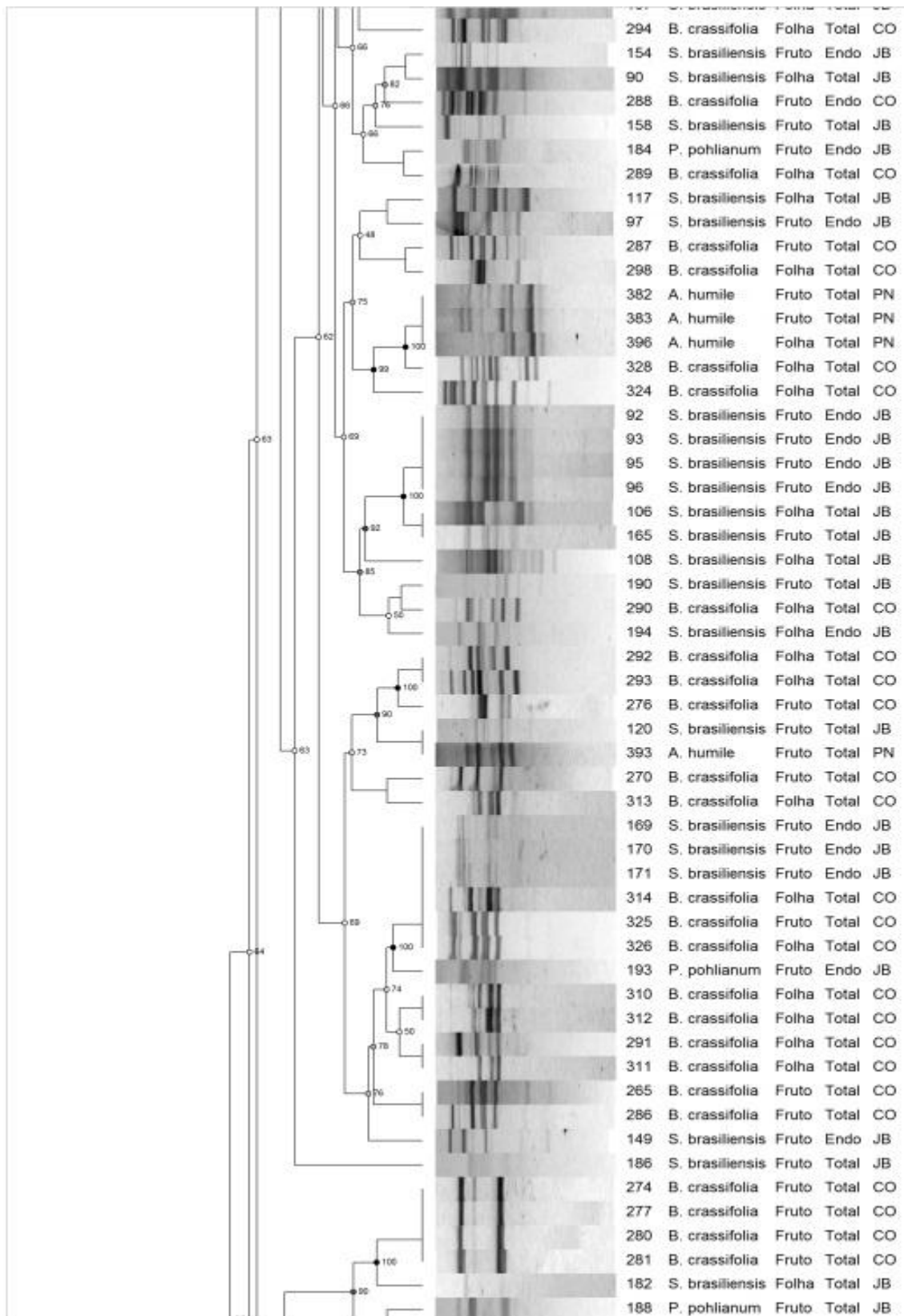


Figura 2 – Cont. - Dendrograma de similaridade dos isolados de leveduras totais e endofíticas de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação de DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

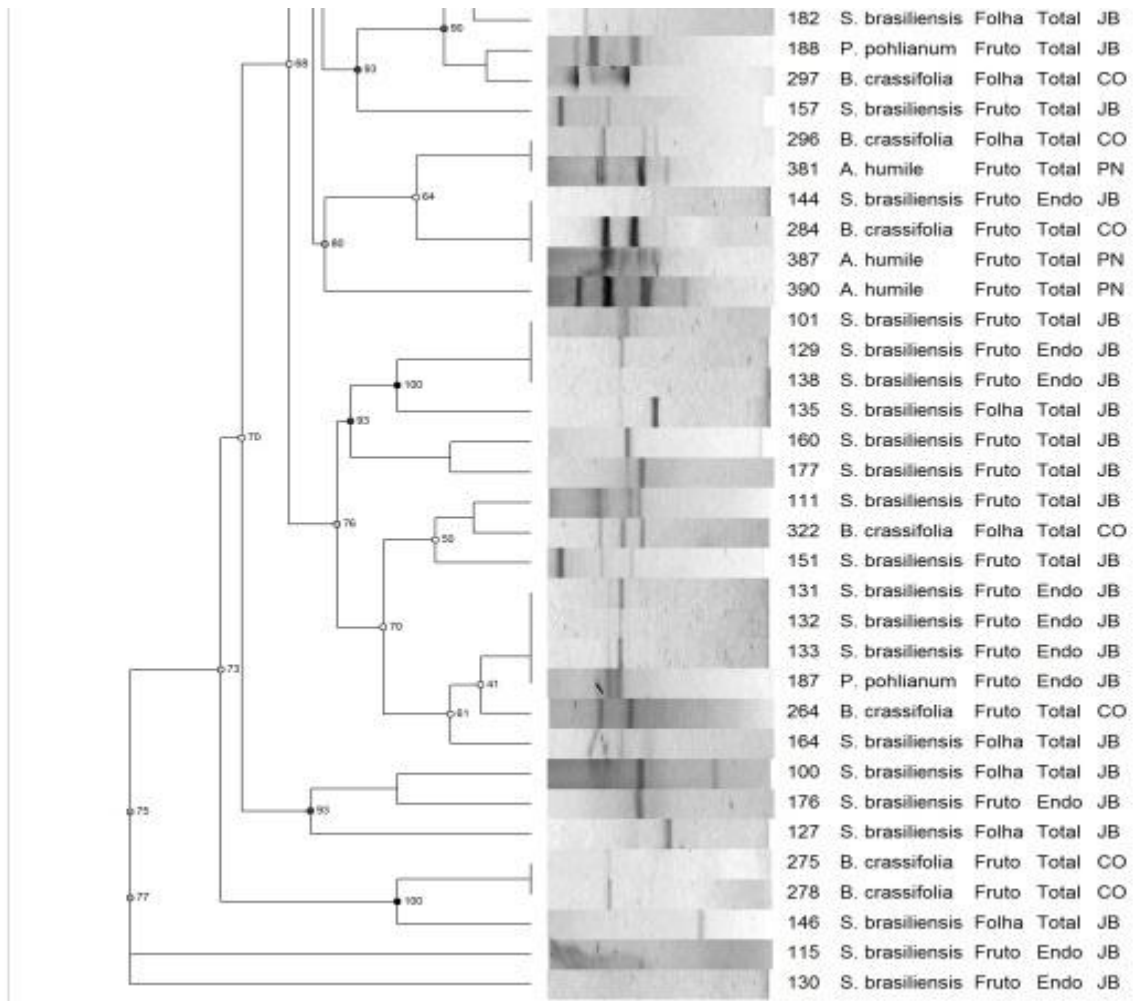


Figura 2 – Cont. - Dendrograma de similaridade dos isolados de leveduras totais e endofíticas de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação de DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram a elevada diversidade genética entre as leveduras nativas do Cerrado e confirmam que a análise por MSP-PCR é eficiente para discriminá-las. Utilizando essa mesma técnica (MSP-PCR) e com o mesmo *primer* (M13), Gadanho *et al.* (2005) encontraram dois grandes grupos de leveduras isoladas de lagos de água ácida no sudeste de Portugal, cada um constituído de 207 e 58 representantes e as agruparam em 23 e 17 classes respectivamente.

### 3.3.3. Diversidade de leveduras totais e endofíticas

No presente estudo, leveduras totais foram encontradas em folhas e frutos de todas as hospedeiras amostradas, mostrando uma alta diversidade genética entre os

hospedeiros (Figura 3). Porém, observando a figura 4, a quantidade de leveduras em partes internas das plantas foi significativamente baixa quando comparada com leveduras totais, não sendo constatada a presença em todas as plantas estudadas (Tabela 2).

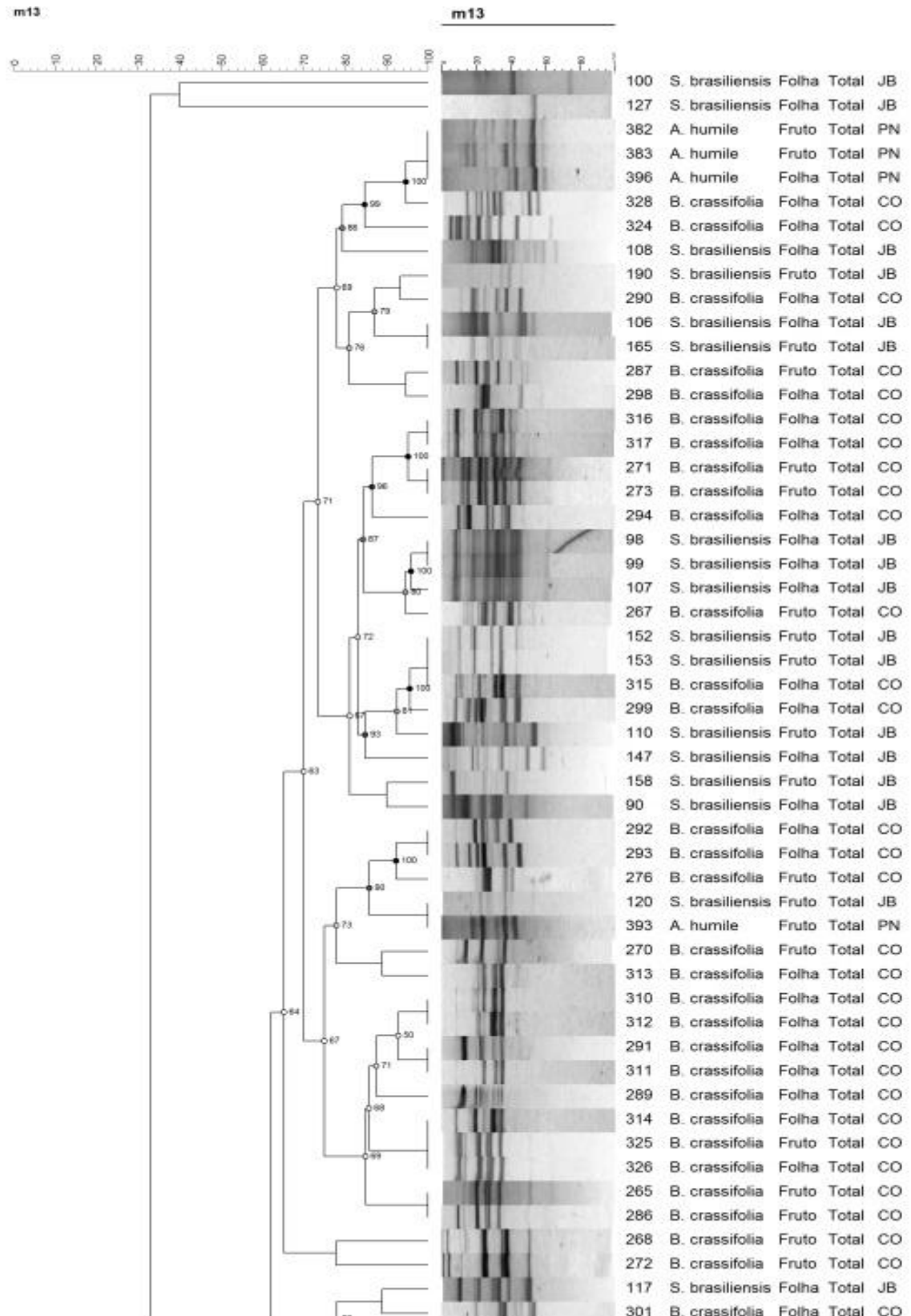




Figura 3 – Dendrograma de similaridade dos isolados de leveduras totais de folhas e frutos de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

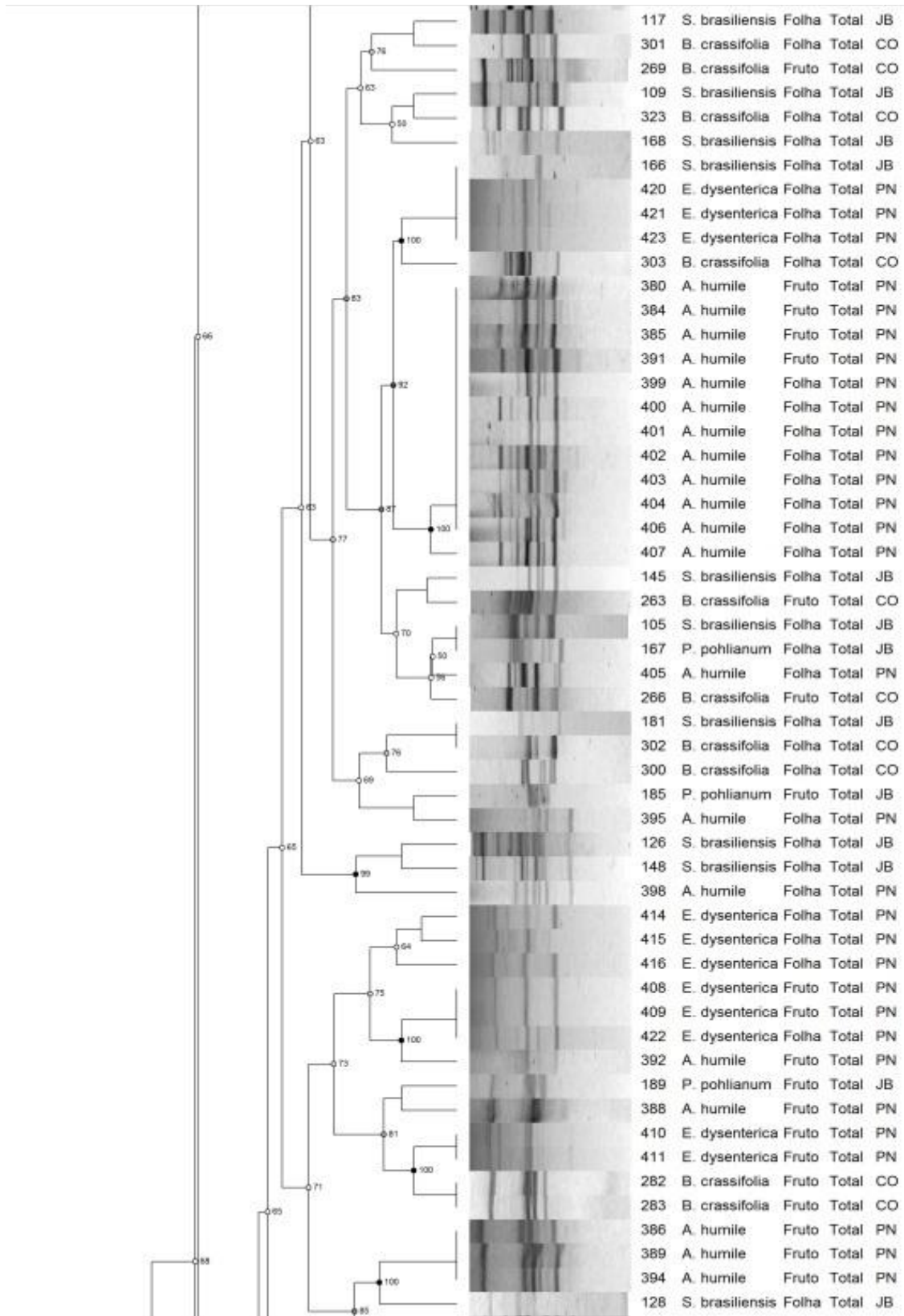


Figura 3 – Cont. - Dendograma de similaridade dos isolados de leveduras totais de folhas e frutos de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

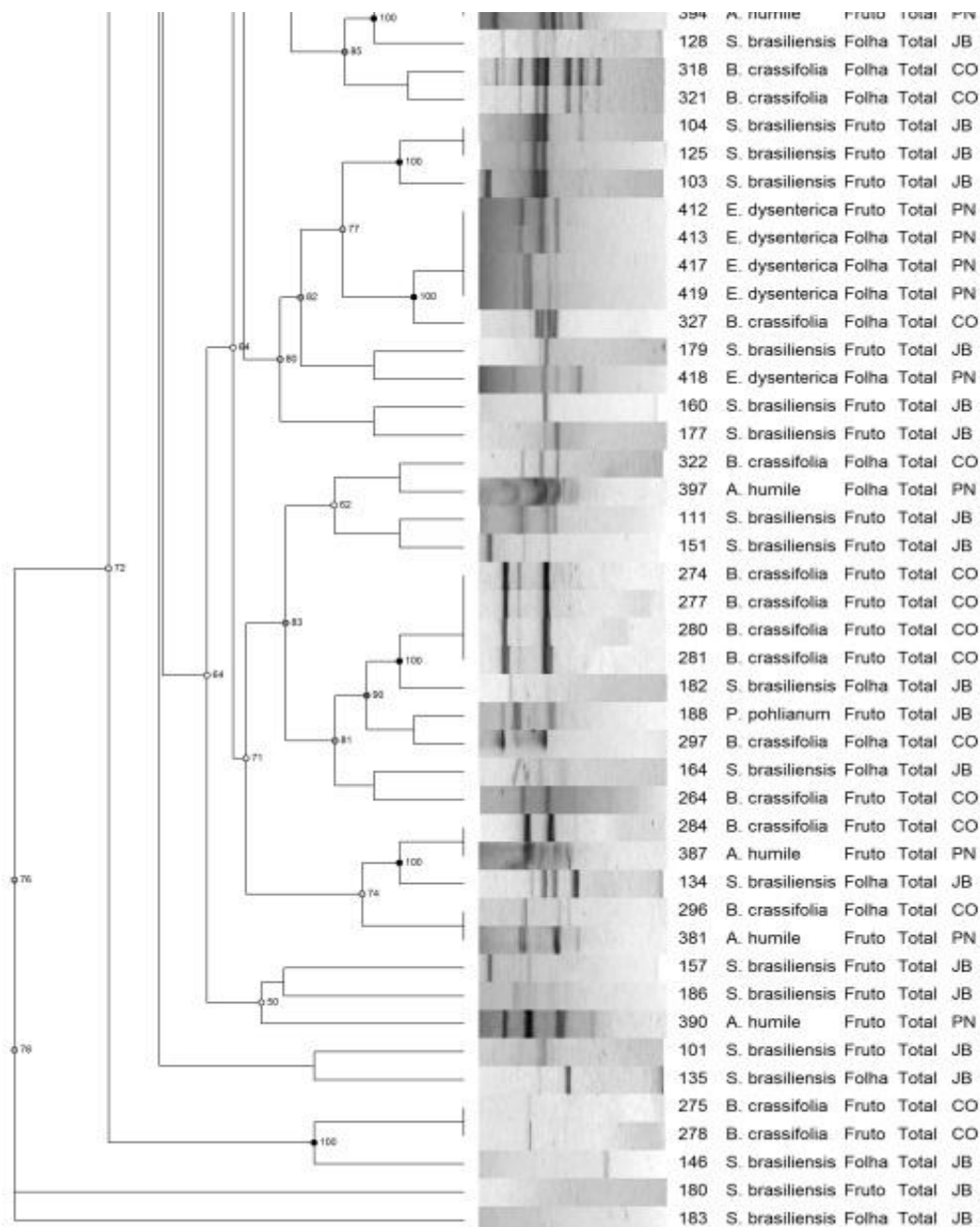


Figura 3 – Cont. - Dendograma de similaridade dos isolados de leveduras totais de folhas e frutos de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

Em *S. brasiliensis* as leveduras foram isoladas de partes internas e da superfície de folhas e frutos. Essa hospedeira foi a planta que mais se isolou leveduras entre todas

as cinco plantas amostradas. Alguns representantes de isolados totais e endofíticos foram agrupados num mesmo *cluster*. Os isolados 101, 129 e 138 foram agrupados em um mesmo *cluster*. O primeiro foi isolado sem a desinfecção superficial do fruto enquanto que os outros dois isolados, 129 e 138, foram isolados também do fruto, mas são provenientes de partes internas (Figura 5). Os isolados 104 e 125, isolados do fruto de *S. brasiliensis* sem passar pela desinfecção superficial, foram agrupados com o isolado 143, isolado de partes internas do fruto. Esse resultado está de acordo com o resultado obtido por Isaeva *et al.* (2010) onde 23 espécies de levedura foram isoladas da superfície e de tecidos internos de frutos de rosa-mosqueta (*Rosa canina*) e ameixeira-européia (*Prunus domestica*) onde 11 espécies foram encontradas tanto em partes internas como na superfície dos frutos.

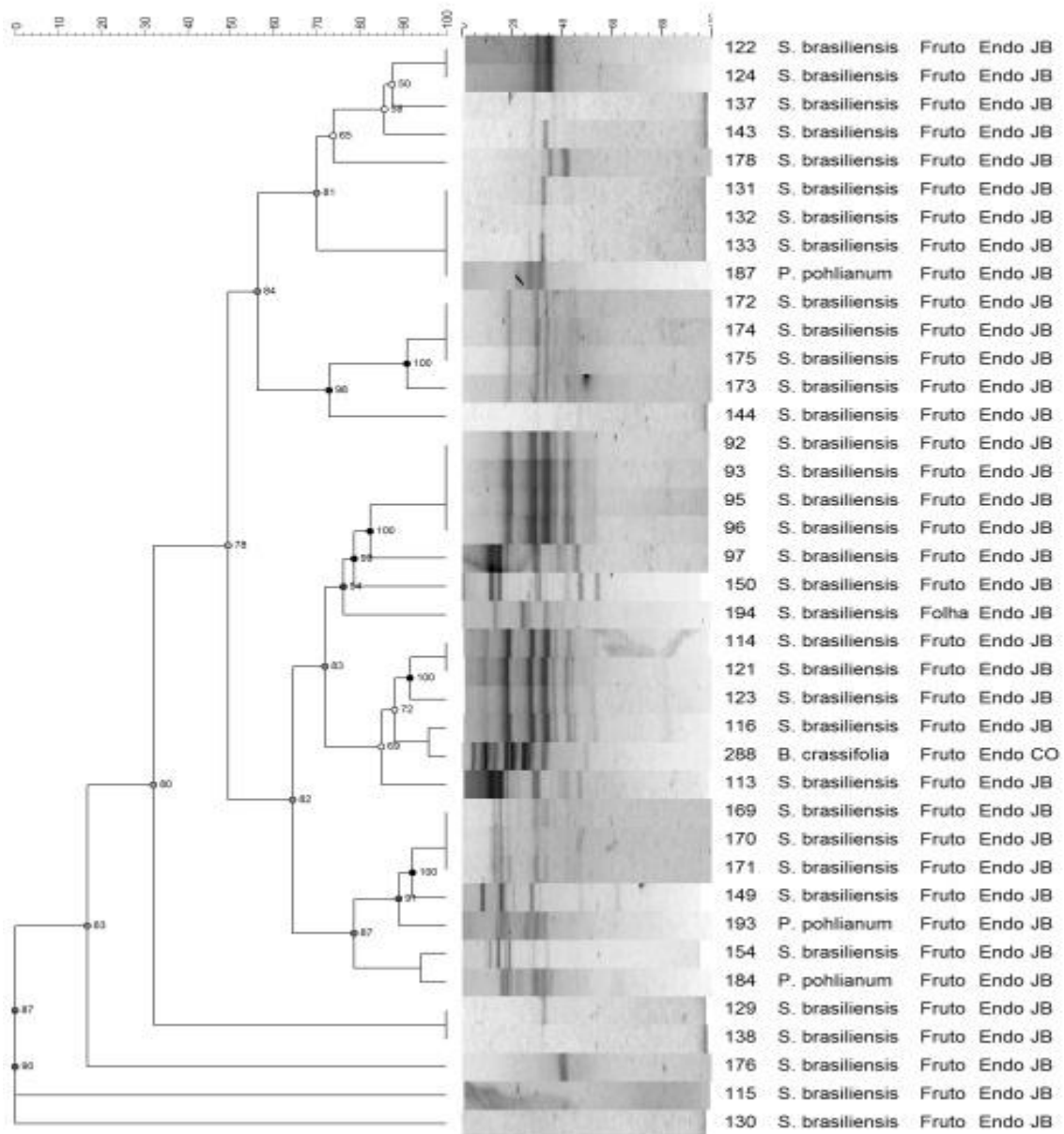


Figura 4 – Dendrograma de similaridade das leveduras endofíticas isoladas de tecidos internos de frutos e folhas cinco espécies de plantas nativas do Cerrado, após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por MSP-PCR. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.



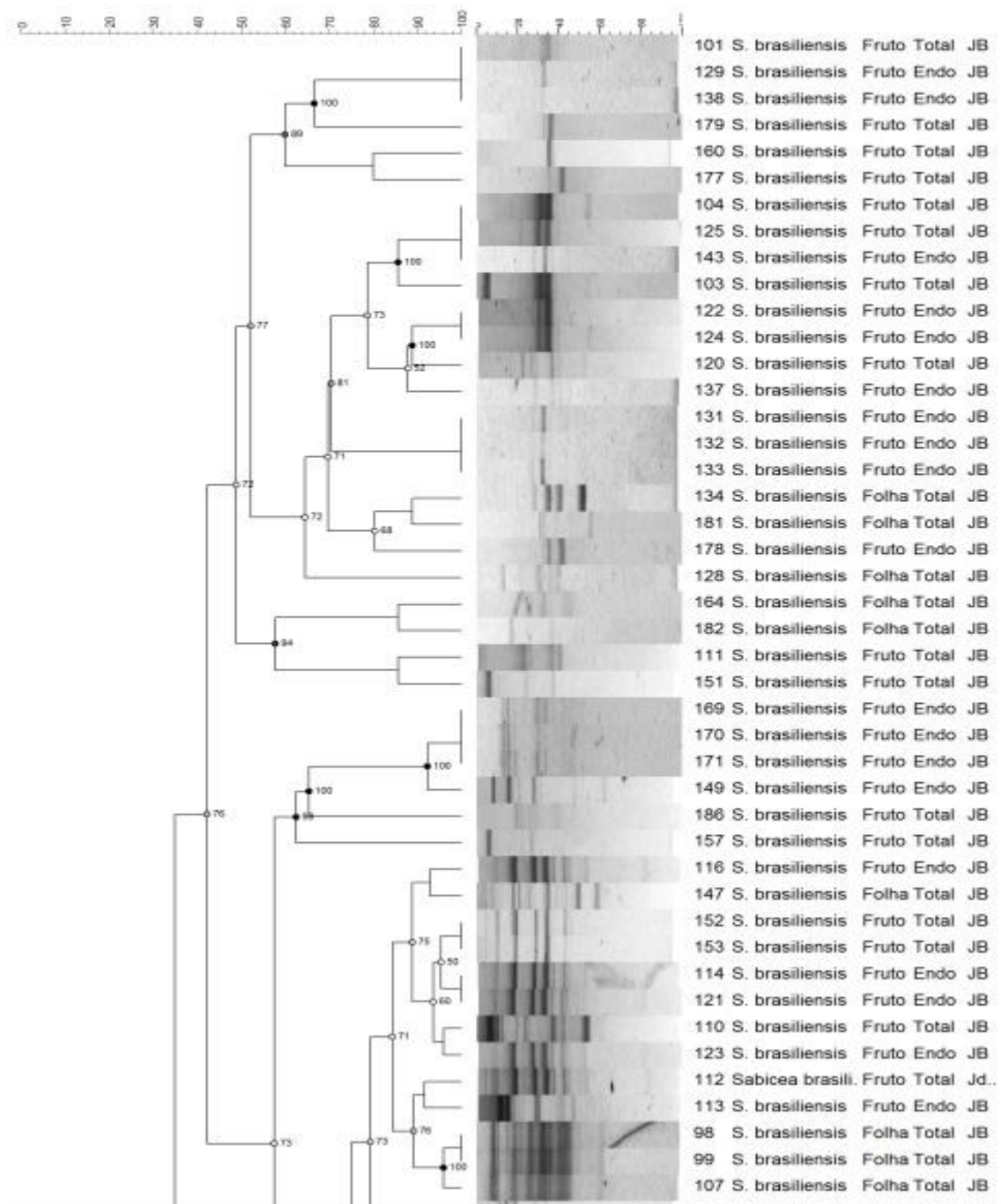


Figura 5 – Dendrograma de leveduras endofíticas e totais isoladas de *Sabicea brasiliensis*, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação de regiões microssatélites do DNA por MSP-PCR com o *primer* M13. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

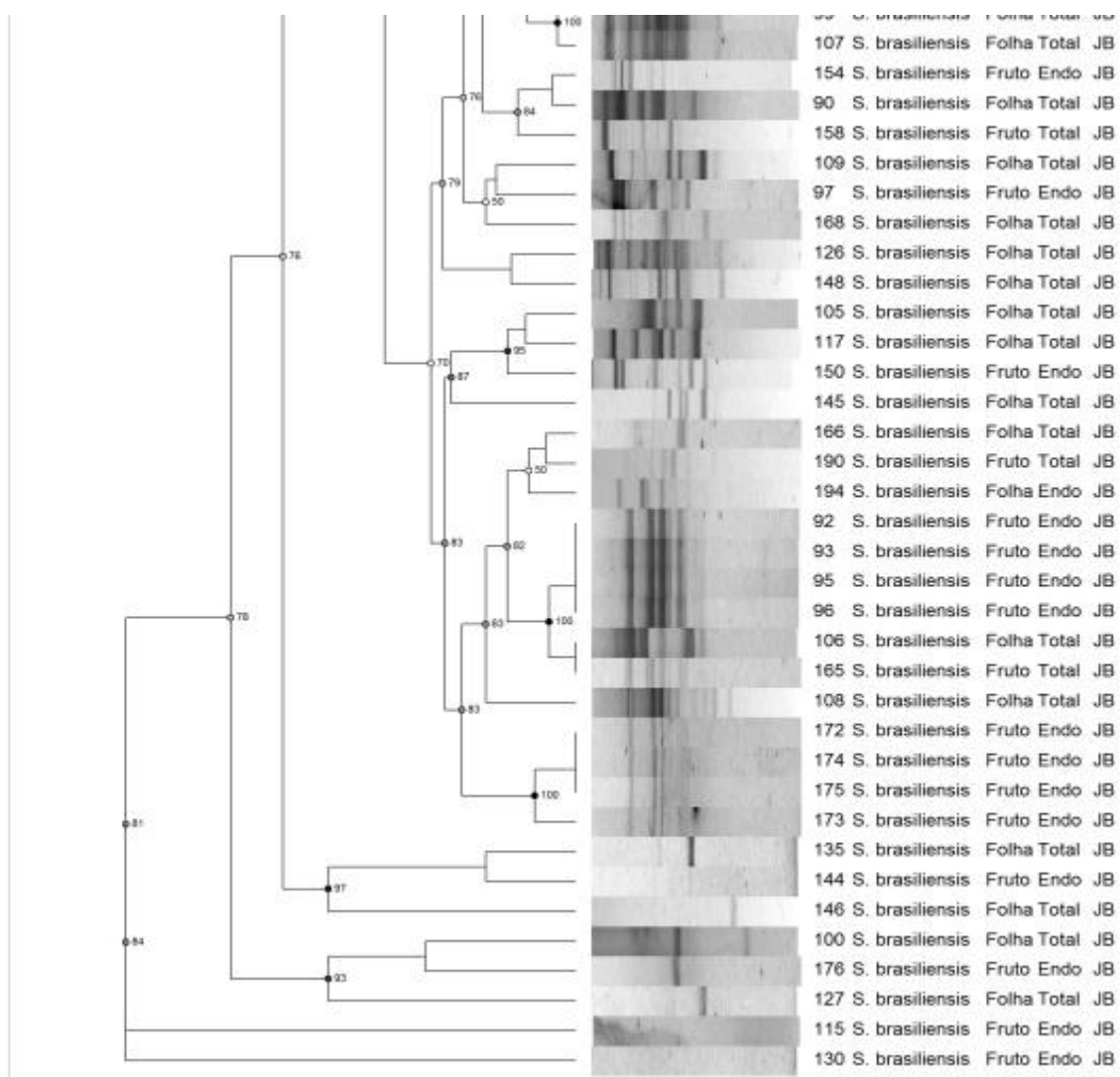


Figura 5 – Cont. - Dendrograma de leveduras endofíticas e totais isoladas de *Sabicea brasiliensis*, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação de regiões microsatélites do DNA por MSP-PCR com o *primer* M13. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

Hirano & Upper (2000) sugerem que o aparecimento, em tecidos internos, de microrganismos rotineiramente encontrados em superfícies vegetais está associado com a tentativa de estes evitarem fatores adversos, tais como radiação solar e competição por nutrientes, fatores que limitam o crescimento de microrganismos nas superfícies vegetais.

### 3.4. Teste de antagonismo

#### 3.4.1. Teste *in vitro* de leveduras com fitopatógenos de pós-colheita

Foram testadas 129 cepas de leveduras isoladas de plantas do Cerrado quanto à atividade antagônica *in vitro* quando pareadas com os fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. Níger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Monilinia* sp., *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp.

De todos os 129 isolados de leveduras utilizados no *screening* inicial, três isolados foram selecionados, 276, 278, de *B. crassifolia*, e 416, de *E. dysenterica*, que segundo os testes fisiológicos, tratam-se da levedura *Aureobasidium pullulans*. Eles mostraram alguma atividade antagônica *in vitro* contra os fitopatógenos *A. niger*, *A. alternata*, *B. cinerea*, *L. theobromae*, *Monilinia* sp., *P. digitatum*, *P. expansum*, *Rhizopus* sp., evidenciando um halo de inibição (Figura 7) sugerindo que a forma de antagonismo seja o de antibiose, produzindo compostos que interfiram no desenvolvimento *in vitro* do patógeno (Figura 7 e Tabela 3).

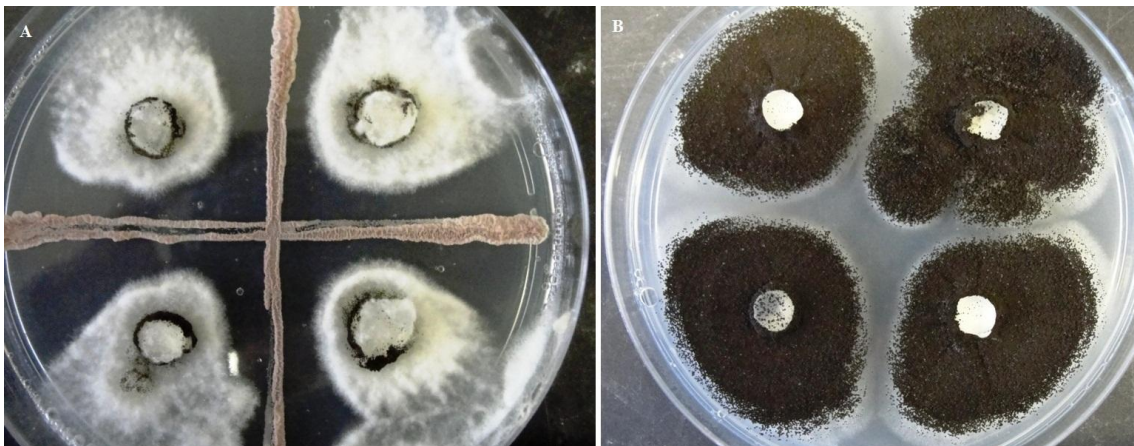


Figura 7 – Teste inicial de pareamento de colônias. Efeito antagônico do isolado 276 pareado com o fitopatógeno *Aspergillus niger* (A) e a testemunha (B).

Tabela 3 – Leveduras que exerceram inibição do crescimento micelial em testes iniciais com pareamento de colônias.

Fitopatógeno	Levedura		
	276	278	416
<i>Alternaria alternata</i>	H.I.	-	-
<i>Aspergillus Níger</i>	H.I.	-	H.I.
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	H.I.
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	H.I.	H.I.	-
<i>Monilinia</i> sp.	H.I.	H.I.	H.I.
<i>Penicillium digitatum</i>	H.I.	H.I.	H.I.
<i>P. expansum</i>	H.I.	-	-
<i>P. italicum</i>	H.I.	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	H.I.	H.I.	H.I.

H.I.: Halo de Inibição. Hífen: ausência de inibição.

Com base no *screening* inicial feito no pareamento anterior, esses três isolados (276, 278 e 416) foram então submetidos a um novo teste de antagonismo e pareados com os fitopatógenos no qual exerceram antagonismo. Desta forma, este experimento visou avaliar a inibição destes isolados de leveduras sobre os fitopatógenos no meio de cultivo BDA. Confirmou-se a inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos por todas as leveduras testadas.

Os isolados de leveduras testados não apresentaram diferença entre eles no efeito antagonístico sobre todos os fungos testados, exceto *Monilinia* sp. Quando comparados com a testemunha, todos os isolados mostraram eficiência no antagonismo dos fungos testados, diferindo estatisticamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade (Figura 8).

De modo geral, o crescimento vegetativo dos fitopatógenos mostrou-se suscetível nas proximidades das colônias da levedura formando uma nítida zona de inibição que é característica de atividades antagônicas (Figura 9).

A diferença entre as leveduras avaliadas pode refletir diferenças bioquímicas quanto à capacidade de expressar quantitativamente e qualitativamente metabólitos secundários. É possível que diferentes compostos inibitórios sejam produzidos por um único isolado de levedura em resposta a diferentes fitopatógenos (WALKER *et al.*, 1995).

A escolha do substrato no qual a levedura foi cultivada interfere diretamente no nível de controle do fitopatógeno. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* produziu compostos voláteis que promovem maiores níveis de inibição contra *Guignardia citricarpa* quando o teste de antagonismo foi realizado em placas com BDA (96%) do que no meio extrato de malte (86%) e YEPDA (25%) (Fialho, 2008). Ezra *et al.* (2004) observaram que o fungo endofítico *Muscodor albus* produziu compostos voláteis com máxima eficácia contra fitopatógenos quando cultivado em meios ricos em nutrientes.

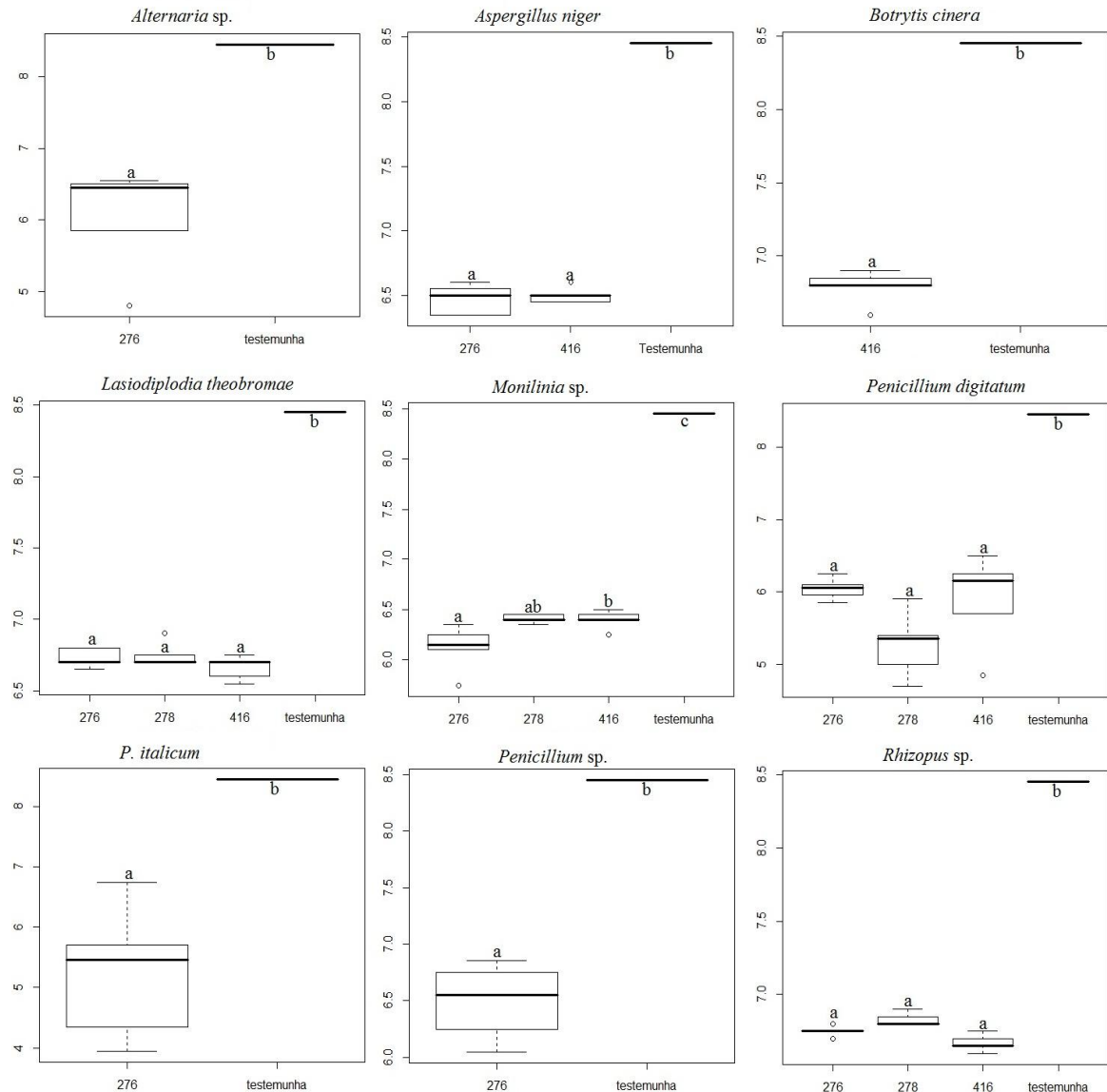


Figura 8 - Efeito antagônico *in vitro* das leveduras 276, 278 e 416 pareadas com *Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Monilia sp.*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *Penicillium sp.* e *Rhizopus sp.* Medidas em cm (eixo y) em função do tratamento (eixo x). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Ficou evidente que as leveduras antagonistas são capazes de produzir compostos inibidores do desenvolvimento do patógeno. É possível observar na Figura 9 a sensibilidade de *Monilinia* sp. quando pareada com diferentes isolados de levedura. Resultados semelhantes foram encontrados por Spadaro *et al.* (2002) onde isolados da levedura *Metschnikowia pulcherrima* inibiram, em testes *in vitro*, o crescimento micelial de *Alternaria* sp. em 31,3%, *Botrytis cinerea* em 18,8% e *Penicillium expansum* e *Monilinia* sp. em 20,8%, todos patógenos de pós-colheita em maçã. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas em testes antagônicos *in vitro* com *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros, sendo constatado efeito de biocontrole da levedura sobre o fitopatógeno (Fialho, 2004). Walker *et al.* (1995) demonstraram em testes *in vitro*, forte atividade antagônica de 17 isolados de leveduras contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *Botrytis fabae* e *Phytophthora infestans* e contra fungos deterioradores de madeira (*Serpula lacrymans*, *Postia placenta*, *Lentinus lepideus* e *Ophiostoma ulmi*). Reyes *et al.* (2004) isolaram leveduras epífitas de abacaxi, representadas por *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus albidus*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula glutinis* inibindo o crescimento micelial *in vitro*, de 25 a 50% de *Ceratocystis paradoxa*, agente etiológico da podridão negra em abacaxi em pós-colheita, diminuindo também a severidade da doença quando as leveduras foram misturadas e aplicadas nos frutos.





Figura 9 – Efeito antagônico *in vitro* das leveduras 276 (A), 278 (B) e 416 (C) pareadas com *Monilinia* sp. e comparadas com a testemunha (D). Placas incubadas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h durante 6 dias.

Os ensaios *in vitro* demonstraram o potencial das leveduras isoladas do Cerrado, 276 e 278, de *Byrsonima crassifolia* e 416, de *Anacardium humile*, no biocontrole dos fitopatógenos de pós-colheita testados. Assim, este trabalho proporciona subsídios para estudos *in vivo*, objetivando a avaliação da viabilidade e efetividade no controle de doenças de ocorrência em pós-colheita.

### 3.4.2. Teste *in vivo* em pêsego e laranja

Experimentos *in vivo* são necessários para comprovar a eficiência dessas leveduras em inibir o crescimento do patógeno nos frutos e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença, evidenciando o potencial de utilização dessas leveduras no controle biológico de doenças de pós-colheita em laranja e pêsego.

### 3.4.2.1. *Monilinia* sp. e *Penicillium* sp. em pêssego (*Prunus persica*)

Os resultados mostram que os isolados 276, 278 e 416, utilizados para o controle de *Monilinia* sp., não mostraram atividade antagônica *in vivo*, não diferiram estatisticamente segundo teste de Tukey a 5% e não inibiram o aparecimento e o desenvolvimento da podridão parda em pêssego quando comparados com a testemunha (Figura 12).

Estes dados sugerem que os três isolados de leveduras antagonistas, crescidos em meio BDA, devem produzir metabólitos que inibem *Monilinia* sp. que provavelmente são diferentes daqueles produzidos *in vivo* (Figura 12). Resultados similares foram obtidos por Spadaro *et al.* (2002) com quatro isolados de levedura *Metschnikowia pulcherrima* submetidas a testes de antagonismo contra patógenos de pós-colheita em maçãs.

A seleção de agentes de biocontrole pode ser conduzida *in vitro* e *in vivo*, embora testes *in vivo* sejam cruciais devido sua confiabilidade, facilidade e aplicabilidade de transferências desta medida de controle em condições reais de campo. A eficácia do antagonista *in vitro* e *in vivo* nem sempre pode ser comparada se o mecanismo predominante de biocontrole for competição por espaço e nutrientes porque os testes *in vitro* não refletem o ambiente nutricional no local da ferida no hospedeiro (MARI *et al.*, 2011). A natureza do meio de cultivo pode influenciar na produção de compostos com atividade antimicrobiana por parte do antagonista, onde meios ricos em nutrientes favorecem essa interação, aumentando sua eficácia no controle de fitopatógenos (EZRA *et al.*, 2004).

Resultados semelhantes foram observados por Mari *et al.* (2011) onde, em testes *in vitro*, com estirpes da levedura *Aureobasidium pullulans* isoladas da superfície de pêssegos “Red Haven”, em experimentos *in vitro*, inibiram o crescimento micelial de *M. laxa*, *M. fructicola* e *M. fructigena* em até 63,2%. Entretanto, quando submetidos a testes *in vivo* não controlaram o desenvolvimento da doença, com a severidade chegando a 100%.



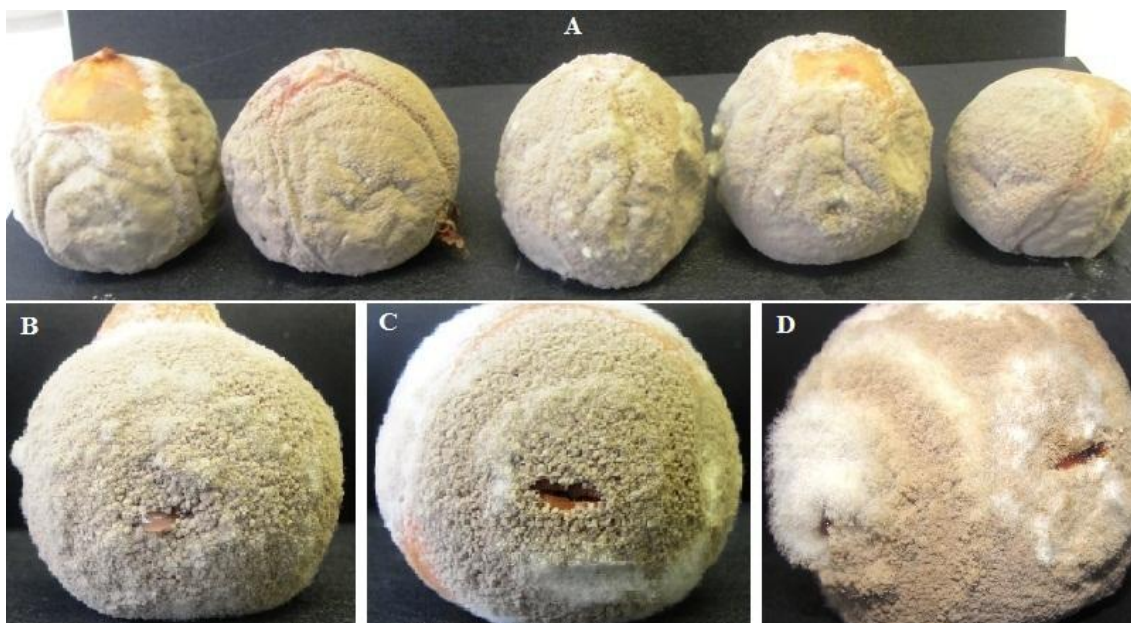


Figura 12 – Sintomas de podridão-parda em pêsego aos cinco dias após a incubação. Em todos os ferimentos houve infecção causada por *Monilinia* sp., tanto na testemunha (A) como nos demais tratamentos, 276 (B), 278 (C) e 416 (D) .

O isolado 278, submetido ao teste de antagonismo *in vivo* com *Penicillium expansum* em pêsego, não diferiu da testemunha, onde todos os ferimentos inoculados apresentaram infecção, atingindo níveis de 100% de severidade (Figura 14).

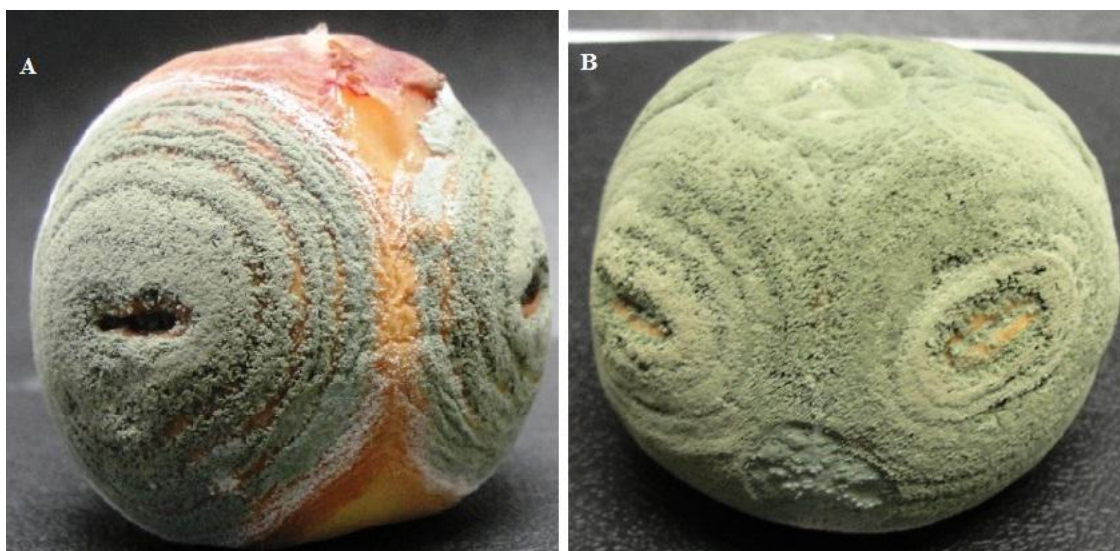


Figura 14 – Severidade de *Penicillium* sp. em pêsegos inoculados através de ferimentos com a presença da levedura 278 (A) e somente o fitopatógeno (B).

Os resultados destes experimentos *in vivo* reproduziram a mesma situação dos experimentos com *Monilinia* sp. Nos experimentos realizados para o controle de *Penicillium* sp., a levedura utilizada não foi eficiente, com a doença apresentando uma evolução quase tão rápida quanto à testemunha, o isolado 278 não diferiu significativamente da testemunha utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns agentes de biocontrole saem-se bem em testes *in vitro* onde as condições são controladas, entretanto, quando submetidos a testes *in vivo* não repetem o mesmo desempenho. Provavelmente, isto é devido à impossibilidade de se controlar as condições fisiológicas dos frutos testados. Saravanakumar *et al.* (2008) selecionaram estirpes da levedura *Metschnikowia pulcherrima*, isoladas da superfície de maçãs, em testes antagônicos contra *Botrytis cinera*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum*, fungos causadores de doenças de pós-colheita, e verificaram que os bons resultados obtidos em condições laboratoriais controladas não foram tão bons quanto os obtidos em testes *in vivo*.

### **3.2.1.2. *Penicillium digitatum* em laranja**

Os resultados mostram que todos os agentes utilizados retardaram o aparecimento do bolor verde dos citros em laranja quando comparados com a testemunha.

É fundamental que o produto retarde a incidência da doença, uma vez que a presença de sintomas e sinais desqualifica a fruta para comercialização. Trata-se de sinais facilmente reconhecidos, principalmente, devido à coloração verde característica dos esporos do patógeno, claramente visualizados pelo consumidor.

Vários relatos prévios demonstraram o valor potencial de leveduras antagonistas para controlar doenças de pós-colheita em citros, outros frutos e vegetais (JANISIEWICZ & BORS, 1995). Cepas de leveduras foram encontradas suprimindo doenças causadas por vários patógenos, incluindo espécies de *Penicillium* (ZHANG *et al.*, 2005). Estirpes de leveduras pertencentes às espécies *Cryptococcus laurentii* e *Candida sake* reduziram significativamente a incidência do bolor verde em frutos de laranja (MEKBIB *et al.*, 2011).

Os frutos apresentaram valores crescentes de severidade da doença. Depois de 5 dias de incubação, os isolados de leveduras inibiram o crescimento de *P. digitatum*, sendo que o isolado 276 diferiu estatisticamente da testemunha (Figura 10).

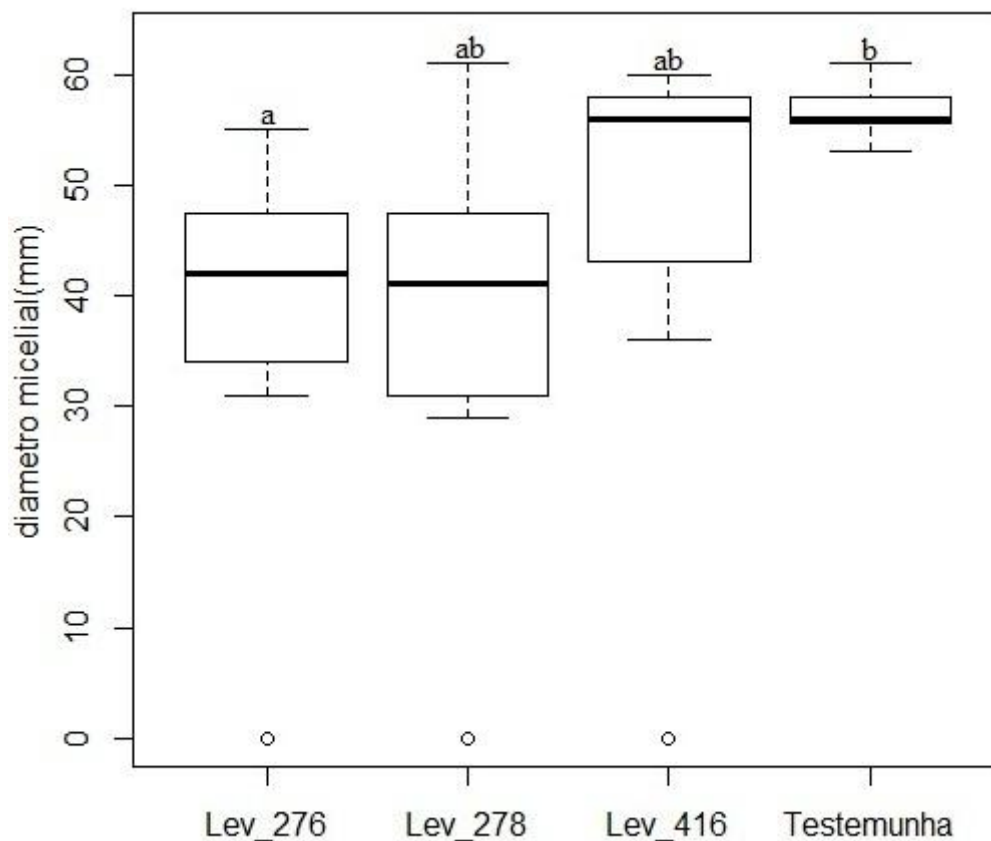


Figura 10 – Severidade da doença em laranjas inoculados com isolado de leveduras e *Penicillium digitatum* e a testemunha, incubadas por cinco dias a 25 °C. As linhas nas caixas mostram os valores médios, as barras acima e abaixo mostram o valor máximo e mínimo da severidade, respectivamente. As mesmas letras acima das barras representam tratamentos que não foram significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando avaliadas no 5º dia, as laranjas inoculadas com os isolados de leveduras 276, 278 e 416 tiveram a severidade menor (Figura 10 e 11). Dentre as leveduras utilizadas como tratamento, o isolado 276 foi o mais efetivo no controle do bolor verde, mostrando uma maior inibição no desenvolvimento da doença, seguido pelo isolados 278 e 416. No presente trabalho, a habilidade dessa levedura de suprimir o desenvolvimento de *P. digitatum* foi repetidamente observada tanto no teste *in vitro* como no teste *in vivo*, inibindo o crescimento micelial do fungo e também reduzindo significativamente o desenvolvimento da doença. Nenhuma diferença significativa foi

encontrada entre os isolados 278 e 416 no controle do bolor verde. No nono dia, os frutos foram inteiramente infectados (100% de severidade) e a esporulação foi observada em quase toda a extensão micelial do fungo.

Sugere que o modo de ação da levedura sobre o patógeno *in vivo* se dá por meio da competição por espaço e nutrientes. Entretanto, nos testes *in vitro* foi constatada a presença de um halo de inibição. Possivelmente, devido à diferença de disponibilidade de nutrientes no ambiente em que o teste é realizado. Sendo assim, o isolado 276 aplicado sobre a superfície da laranja exerceu uma atividade fungistática e não fungicida sobre *P. digitatum*, uma vez que empobreceu (limitou) os nutrientes disponíveis no local da infecção (feridas) e inibiu o desenvolvimento da doença. A fim de maximizar o uso do isolado 276 no controle do bolor verde do citros, um melhor entendimento do seu modo de ação se torna necessário.

Competição por espaço e nutriente entre os antagonistas e o patógeno é considerado com o principal modo de ação pelo qual os antagonistas reprimem os patógenos que causaram apodrecimento dos frutos. Para competir com sucesso com o patógeno no ferimento, o antagonista deve possuir as decisivas e principais ferramentas adaptativas permitindo sobreviver às várias condições ambientais e nutricionais (EL-GHAOUTH *et al.*, 2003).

O aumento do período de incubação é de grande interesse, pois prolonga a vida útil pós-colheita dos frutos e a extensão do período latente contribui para a redução do inóculo secundário, que é inicialmente produzido sobre o fruto, contribuindo dessa forma para a continuidade da doença. Segundo Santos & Matos (2006) o fitopatógeno *P. digitatum* possui uma alta capacidade de esporulação e quanto mais tempo levar para o aparecimento de estruturas do patógeno, menores serão as chances de um fruto infestado contaminar um fruto sadio. O período de armazenamento de frutos colonizados é significativamente reduzido devido à síntese de etileno, que acelera o processo de maturação do fruto, conseqüentemente diminuindo sua vida de prateleira (LARANJEIRA *et al.*, 2002).

O fungo endofítico *Muscodor albus* quando cultivado em meios ricos em nutrientes, principalmente com açúcares simples, tem a sua eficiência significativamente maior no controle de fitopatógenos *in vitro*. Adicionando-se sacarose ao meio pobre em nutrientes, eleva-se a atividade de compostos voláteis em níveis próximos de 50% (EZRA *et al.*, 2004). A competição por nutrientes é um fator provável e lógico, entretanto, não é de fácil comprovação por ser difícil a exclusão de outros



mecanismos de controle. Estudos desenvolvidos por Droby *et al.* (1989) mostraram que a eficiência de *Pichia guilliermondii* contra *P. digitatum* foi reduzida quando houve a adição de nutrientes exógenos ao nicho de colonização.



Figura 11 – Sintomas de bolor verde em laranjas aos cinco dias após a inoculação com o isolado 276 e com *P. digitatum* (A e B) e a testemunha (C e D).

Platania *et al.* (2012) apresentaram resultados semelhantes, onde alguns isolados de *Wickerhamomyces anomalus* e *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidos a testes antagônicos com *P. digitatum* em *Citrus x sinensis* e, durante os três primeiros dias após a inoculação, controlou a severidade da doença que se manteve em 30% e 18%, respectivamente. Entretanto, a partir do quinto dia, a severidade da doença aumentou significativamente equiparando-se a testemunha.

Estudos sobre a eficácia e mecanismos de ação de novos compostos antifúngicos são sempre importantes para fornecer acesso a diversas espécies de leveduras com

potencial de biocontrole. A fim de tirar proveito de suas diferentes propriedades biológicas ou evitar o aparecimento de resistência de fungos fitopatogênicos, tornando o controle biológico uma medida mais eficaz. Embora investigações sejam necessárias para elucidar melhor o mecanismo de ação destas leveduras, os resultados deste estudo destacam o potencial de aplicação destes isolados como agentes biológicos para a proteção em pós-colheita de laranja contra *P. digitatum*, tanto para aumentar o tempo de armazenamento das frutas como para reduzir as perdas econômicas devido à deterioração dos frutos causada pelo bolor verde.

Este trabalho desperta o interesse em novos estudos para a exploração comercial destes microrganismos. Alguns países não importam mais produtos tratados com agrotóxicos. Os EUA suspenderam a importação de citros de produtores brasileiros que utilizam os fungicidas carbendazim e tiofanato-metílico (FUNDECITRUS, 2012). Neste sentido, as leveduras despertam interesse por não serem não são produtoras de antibióticos ou outros metabólitos secundários tóxicos, são rotineiramente utilizadas em preparos de alimentos e, portanto, ditos seguros como agentes de biocontrole de fitopatógenos. Estes fatores contribuem para aceitação de frutos e vegetais tratados com este tipo de produto biológico, uma vez que normalmente são consumidos *in natura*.

As informações apresentadas neste trabalho surgem como primeiro relato da presença de leveduras endofíticas e folhas e frutos de plantas do Cerrado e estimulam estudos futuros mais aprofundados sobre a potencialidade destas leveduras no controle de fitopatógenos de pós-colheita e apontam caminhos para uma nova opção de biocontrole.

#### 4. CONCLUSÕES

As populações de leveduras associadas a folhas e frutos do Cerrado apresentaram imensas e variadas diversidade morfológica e das densidades populacionais, sendo que estas não expressam relação clara entre os diferentes hospedeiros e locais de coleta.

Leveduras endofíticas estão presentes nas folhas e frutos da maioria das plantas do Cerrado em estudo, porém estão em menor densidade populacional e apresentam baixa diversidade morfológica.

As plantas do Cerrado demonstraram ser um bom substrato para isolamento de leveduras epifíticas e endofíticas, sendo um nicho com potencial para a descrição de novas espécies associadas.

Eletroforese dos amplicons obtidos com o *primer* M13 possibilita a análise da diversidade genética dos isolados de leveduras totais e endofíticos e permite a formação de agrupamentos genotípicos

Leveduras endofíticas de plantas do Cerrado possuem uma baixa diversidade morfológica, porém, apresentaram uma alta diversidade genotípica demonstrada pelos amplicons produzidos pelo *primer* M13.

Isolados de leveduras oriundos de *B. crassifolia* e *E. dysenterica* foram promissores para utilização em biocontrole.

Os isolados 276, 278 e 416, identificados por meio de teste fisiológicos /bioquímicos, foram indentificados como *Aureobasidium pullulans*, e mostraram maior atividade antagônica contra todos os patógenos testados *in vitro*.

O isolado 276, recuperado de *B. crassifolia*, mostrou-se efetivo no controle *in vivo* do bolor verde dos citros.

Os resultados obtidos são promissores, todavia, é necessária uma continuidade nos trabalhos para de elucidar o(s) modo(s) de ação dessas leveduras na célula fúngica ou na interação patógeno-hospedeiro, a fim de se obter uma maior eficácia no controle de doenças de pós-colheita em laranja e pêssego.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. (Ed.) **Plant Pathology**. London: Academic Press, 1997. p.245-406.
- ANDREWS, J. H.; HARRI, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 38, p.145-180, 2000.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.
- AVIS, T. J.; BÉLANGER, R. R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.956-960, 2001.
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. Stain, media and procedure for analyzing endophytes. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (eds). **Biotechnology of endophytic fungi of grasses**, CRC Press, Boca Raton, p.47-56, 1994.
- BAEK, J. M.; CHARLES, R.; CHARLES, M. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv 29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v.35, p.41-50, 1999.
- BAKER, R. & COOK, J. **Biological control of plant pathogens**, San Francisco. W. H. Freeman, 1974.
- BARBIERI, R.; CARVALHO, I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, p.79-83,2001.
- BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control**. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands, 2001.
- BARNETT, J.A. **Yeast, Characteristics and Identification**, 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811p.
- BEATTIE, G. A. & LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.33, p.145-172, 1999.
- BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutos tropicais. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.25, p.90-93, 1999.
- BENCHEQROUN, S. K.; BAJJI, M.; MASSART, S.; LABHILILI, M.; JAAFARI, S. E.; JIJAKLI, M. H. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol



by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. **Postharvest Biology and Technology**, v.46, p.128-135, 2007.

BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, v.7, p.233-240, 1996.

BENHAMOU, N.; REY, P.; CHERIF, M.; HOCKENHULL, J.; TIRILLY, Y. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. **Phytopathology**, v.87, p.108-122, 1997.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1 cap.36, p.717-728.

BLAKEMAN, J. P. Foliar bacterial pathogens: epiphytic growth and interactions on leaves. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.49-59, 1991.

BLAKEMAN, J. P. Pathogens in the foliar environment. **Plant Pathology**, v.93, p.293-299, 1993.

BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: BAILEY, R. (Ed.). **Global warming and other eco-myths**. p.29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. 2002.

BOUNDY-MILLS, K. Methods for Investigating Yeast Biodiversity. In: ROSA, C. A.; PETER, G. eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p.67-100.

BRUNNER, F.; PETRINI, O. Taxonomic studies of *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. **Mycological Research**, v.96, p.723-733, 1992.

BRANDÃO, L. R.; LIBKIND, D.; VAZ, A. B. M.; SANTO, L. C. E.; MOLINÉ, M.; GARCIA, V. de; BROOCK, M. V.; ROSA, C. A. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **Microbiology Ecology**. v.76, p.1-13, 2011.

BUDGE, S. P.; WHIPPS, J. M. Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minutans* and reduced fungicide application. **Phytopathology**, v.91, p.221-227, 2001.

BULTMAN, T. L.; MURPHY, J. C. Do fungal endophytes mediate wound-induced resistance? In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Eds) **Microbial endophytes**, Marcel Dekker, New York, 2000.

CARRAZZA, L. & FIGUEREDO, I. **Cerrado Que Te Vivo! – Produtos e Meios de Vida Sustentáveis Apoiados pelo Programa de Pequenos Projetos Ecosociais (PPP-**

ECOS). Brasília. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 2010. ISBN: 978-85-63288-00-4.

CLAY, K. (1988) Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: co-evolution and change from parasitism to mutualism. In: PYROZYNSKI, K. .A.; HAWKSWORTH, D. L. (Eds) **Co-evolution of fungi with plants and animals**. Academic Press. New York, p. 79–105, 1988.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review Ecological System**, v.21, p.275–297, 1990.

CHEPLICK, G. P.; CLAY, K. Acquired chemical defenses in grasses: The role of fungal endophytes. **Oikos**, v.52, p.309–318, 1988.

COOK, D. W. M.; LONG, P. G.; GANESH, S.; CHEAH, L. H. Attachment of microbes antagonistic against *Botrytis cinerea*: biological control and scanning electron microscope studies *in vivo*. **Annals of Applied Biology**, v.131, p.503-508, 1997.

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

COUTINHO, L. M. 1978. O conceito de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica** v.1, p.17-23.

DAHLMAN, D. L.; EICHENSEER H., SIEGEL, M. R. Chemical perspective on endophyte grass interactions and their implications to insect herbivory. In: BARBOSA, P.; KRISCHIK, V. A.; Jones, C. G. (eds) **Microbial mediation of plant herbivore interactions**. Wiley. New York, p. 227–252, 1991.

DAREZZO, H. M. **Conservação pós-colheita de pêssegos 'Aurora-1' e 'Biuti' acondicionados em diferentes embalagens e armazenados sob condições de ambiente e refrigeração**. 1998. 129 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 1998.

DETMANN, K. S. C. **Fungos Micorrízicos Arbusculares e Endofíticos do Tipo *Dark Septate* em Plantas Nativas do Cerrado**. Tese (Doutorado). Viçosa, 2007. 56p. Universidade Federal de Viçosa.

DIANESE, J.C. (2000). Micodiversidade associada a plantas nativas do Cerrado. In: T. B. Cavalcanti; B.M.T. Walter. (Org.). **Tópicos atuais em Botânica**. 1 ed. Brasília: Sociedade Brasileira de Botânica, EMBRAPA, p. 109-115.

DIANESE, J.C.; Medeiros, R.B.; Santos, L.T. 1997. Biodiversity of Microfungi Found on Native Plants of the Brazilian Cerrado. In: Hyde, K. D. **Biodiversity of Tropical Microfungi**. Hong Kong University Press. 367-417.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 794-800, 1989.

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

DURIGAN, J. F. Uso da modificação da atmosfera no controle de doenças. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.25, n.1, p.83-88, 1999.

ECKERT, J. W. Post-harvest diseases of citrus fruits. **Agriculture Outlook**, Washington, v.54, p. 225-232, 1993.

ECKERT, J. W.; EAKS; I. L. Postharvest citrus diseases and their control. In: WARDOWSKI, W. F.; NAGY, S.; GRIERSON, W. (Ed.). **Fresh Citrus Fruits**. Westport, CT: AVI Publishing, 1986. p.315-360.

EITEN, G. The Cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**, v.38, n.2, p.201-341, 1972.

ELAD, Y.; KOHL, J.; FOKKEMA, N. J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. **Phytopathology**, v.84, p.1193-1200, 1994.

EL GAHOOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: NAQVI, S. A. M. H. (Ed.) **Diseases of Fruit and Vegetables**. v.2, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. p.511-535, 2004.

EL GAHOOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, v.93, p.344-348, 2003.

EPARVIER, A.; ALABOUVETTE, C. Use of ELISA and GUS transformed strains to study competition between pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. **Biocontrol Science and Technology**, v.4, p.35-47, 1994.

ERCOLANI, G. L. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. **Microbial Ecology**, v.2, p.35-48, 1991.

EZRA, D.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. **Microbiology**, Reading, v.150, p.4023-4031, 2004.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 08 jan. 2012.

FELL, J. W. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.50, p.1351-1371, 2000.

FERNANDEZ, M. A. F. **Influência da modificação atmosférica e de armazenamento sobre a qualidade de pêssego cv. Marli**. 2000. 188p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

FIALHO, M. B. **Mecanismos de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2008. 120p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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.

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

FISHER, P. J.; ANSON, A. E; PERTINI, O. Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptosporiopsis* sp. isolated from *Vaccinium myrtillus*. **Transaction of the British Mycological Society**, v.83, p.145–148, 1984.

FNP CONSULTORIA COMÉRCIO. **Agrianual 2003**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, p.295-314: laranja, 2003.

FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, V. D. **Microbiology of the phyllosphere**. Academic Press, New York, 1986.

FONSECA, A. & INÁCIO, J.; Phylloplane yeasts, in: **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, G. Peter & C.A. Rosa (Eds). Springer-Verlag, Berlin, p.263-301, 2006.

FORTES, J. F.; MARTINS, O. M. Sintomatologia e controle das principais doenças. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: CPACT, 1998. cap.9, p.243-260.

FUENTEFRÍA, A.M. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycological Research**, London, v.112, p.93-99, 2008.

**FUNDECITRUS**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/Noticias/19.03.12---Fundecitrus-reune-empresas-de-defensivos-em-busca-de-novos-fungicidas,257>. Acesso em: 23 março, 2012.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 08 jan. 2012.

FUNK, C. R. , HALISKY, P. M.; JOHNSON, M. C.; SIEGEL, M. R.; STEWART, A. V.; AHAMAD, S.; HURLEY, R. H.; HARVEY, I. C. An endophytic fungi and resistance to Sod Webworms: association of *Lolium perenne* L. **Nature Biotechnology**, v.1, p.189–191, 1983.

GADANHO, M. L. D. & SAMPAIO, J. P. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. **Microbial Ecology** v.52 p.552–563, 2006.

GADANHO, M. Polyphasic taxonomy of taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospirium*: *R. azoricum* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, p.213-227, 2001.

GOLFARI, L., **Zoneamento ecológico do estado de Minas Gerais para reflorestamento**. PNUD/FAO/IBDF – BRA/71/545, 1975. 65p. (Série Técnica no 3).

GREBENISAN, I.; CORNEA, P.; MATEESU, R.; CIMPEANU, C.; OLTEANU, V.; CANPENN, G. H; STEFAN, L. A.; OANCEA, F.; LUPA, C. *Metschnikowia pulcherrima*, a new yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. **Acta Horticulturae**. v.767, p.355-360, 2008.

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

GUTIERREZ, A. S. D. **Danos mecânicos pós-colheita em pêssego fresco**. Piracicaba, 123p. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, n. 6, p.641-655, 1991.

HARIDASAN, M. 2001. Solos. Pp: 12-17. *In*: Felfili, J. M. & Silva Júnior, M. C (orgs). **Biogeografia do bioma Cerrado**: estudo fitofisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco. Brasília, Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal. Diss GALIANA.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol-changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

HERNANDES-MONTIEL, L. G.; OCHOA, J. L.; TROYO-DIÉGUES, E.; LARRALDE-CORONA, C. P. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaromyces hansenii* isolates. **Postharvest Biology and Technology**. v.56, p.181-187, 2010.

HERSHKOVITZ, V.; BEN-DAYAN, C.; RAPHAEL, G.; CHOR-PASMANIK, M.; LIU, J.; BELAUSOV, E.; ALY, R.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent

*Metschnikowia fructicola*. **Molecular Plant Pathology**. 2011. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00750.x.

HIPPOLITO, A.; EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, v.19, p.265-272, 2000.

HIRANO, S.S. & UPPER, C.D. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.64, n.3, p.624–653, 2000.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the story and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1992. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, IBGE. 92p. Diss GALIANA.

INÁCIO, J.; PEREIRA, P.; CARVALHO, M.; FONSECA, A.; SPENCER-MARTINS, I. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, New York, v.44, p.344-353, 2002.

INÁCIO, J.; PORTUGAL, L.; SPENCER, I.; and FONSECA, A. 2005. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. **FEMS Yeast Research** v.5, p.1167-1183.

IPPOLITO, A.; EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. A. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**. v.19, p.265-272, 2000.

ISAEVA, O. V.; GLUSHAKOVA, A. M.; GARBUZ, S. A., KACHALKIN, A.V.; CHERNOV, I. Y. Endophytic Yeast Fungi in Plant Storage Tissues. **Biology Bulletin**, v.37, p.26-34, 2010.

JANISIEWICZ W.J. & BORS B. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. **Applied Environmental Microbiology** v.61, p.3261-3267, 1995.

JIJAKLI, M. H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, v.88, p.335-343, 1998.

JORDAAN, A. TAYLOR, J. E.; ROSSENKHANA, R. Occurrence and Possible Role of Endophytic Fungi Associated with seed Pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. **South African Journal of Botany**. v.72, p.245-255, 2006.

- KIMMONS, C. A. Nematode reproduction on endophyte infected and endophyte free tall fescue. **Plant Disease** v.74, p.757–761, 1990.
- KINKEL, L. L. Microbial population dynamics on leaves. **Annual Review Phytopathology**. v.35, p.327-347. 1991.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**. v.1, p-147-155. Belo Horizonte, 2005.
- KLUDGE, R. A.; SCARPARE FILHO, J. A.; JACOMINO, A. O.; PEIXOTO, C. P. **Distúrbios fisiológicos em frutos**. Piracicaba: FEALQ, 2001. 58p.
- KOITE, ST., MOLINAR, RH, Rust Disease on Lemongrass in California. **Plant Disease**, v.83 n.3, 304 p. 1999.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a taxonomic study**. 5. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v.2, 1062 p., 2011.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a taxonomic study**. 4. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1088 p., 1998.
- KURTZMAN, C. P. & ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek** v.73, p.331-371, 1998.
- KURTZMAN, C. P.; DROBY, S. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast effective for biocontrol of postharvest fruit rots. **Systematic and Applied Microbiology**. v.24, p.395-399, 2001.
- LAHLALI, R.; HAMADI, Y.; GUILLI, M. E.; JIJAKLI, M. H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**. v.56, p.217-224, 2011.
- LAHLALI, R.; SERRHINI, M. N.; JIJAKLI, M. H. Development of a biological control method against postharvest diseases of citrus fruit. **Communications on Agriculture and Applied Biological Sciences**. v.70, p.47-58, 2005.
- LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no parque de Itapuã-Viamão/RS**. Porto Alegre, 2009. 187p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- VALE, H. M. M. **Diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.) e sucessão durante a seca natural**. Viçosa, 2009. 88p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.
- LARANJEIRA, F. F.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em citros. In: ZAMBOLIM,

L.; RIBEIRO do VALE, F. X.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas frutíferas**, Viçosa, v.2, p.141-214, 2002.

LASKER, B. A.; RAN, Y. Analysis of Polimorphic Microsatellite Markers for Typing *Penicillium marneffe* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p.1483-1490, 2004.

LASSOIS, L.; De BELLAIRE, L.; JIJAKLI, M. H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. **Biological Control**. v.45, p.410-418, 2008.

LATCH, G. C. M.; HUNT, W. F.; MUSGRAVE, D. R. Endophytic fungi affect growth of perennial rye grass. New Zealand.. **Journal of Agricultural Research**. v.28, p.165–168, 1985.

LEBEN, C. Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with bulbs and leaves of cucumber plants. **Phytopathology**, v.78, p.179-185, 1988.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas n 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.

LONGATO, S.; BONFANTE, P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatelite regions. **Mycological Research**. v.101, p.425-432, 1997.

LOPEZ, A. M. Q. **Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. em sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench)**. Rio Claro, 1991. 203p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

LORITO, M.; WOO, S. L.; D’AMBROSIO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; KUBICEK, C. P.; SCALA, F. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. **Molecular Microbe Interactions**, v.9, p.206-213, 1996.

LUMSDEN, R. D. Development of *Gliocladium virens* for damping-off disease control. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.18, p.463-468, 1996.

MACHADO, K. M. G.; LINARDI, V. R. Production of amylase and beta-galactosidase by yeasts. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.33, p.247-253, 1990.

MACHADO, R.B., RAMOS NETO, M.B.; PEREIRA, P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.; SANTOS, N.; TABOR, K.; STEININGER, M. *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro*. **Conservation International of Brazil**, Brasília, DF, 2004.



MADSEN, A. M.; NEEGAARD, E. Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.761-768, 1999.

MANDAL, G.; SINGH, D.; SHARMA, R. R. Effect of hot water treatment and biocontrol agent (*Debaromyces hansenii*) on shelf life of peach. **Indian Journal of Horticulture**. v.64, p.25-28, 2007.

MARI, M.; MARTINI, C.; GUIDARELLI, M.; NERI, F. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. **Biological Control**, 2011, doi:10.1016/j.biocontrol.2011.10.013

MARGARIDO, S. M. F. **Pêssego e nectarine: beleza e delícias no pomar**. São Paulo: Ícone, 1988. 104p.

MARTINS, E. M. F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: Embrapa, 1991. Cap.24, p. 345-363.

MARTINS, E. M. F.; MARIA, A. C. de; GRÜNEWALDT-SÖCKER, G.; MORAES, W. B. C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.899-909, 1986.

MARTINS, M. C.; LOURENÇO, S. A.; GUITIERREZ, A. S. D.; JACOMINO, A. P.; AMORIN, L. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Botucatu, v.30, n.6, p.587-592, nov/dez. 2005a.

MARTINS, M. C.; AMORIN, L. Doenças das rosáceas de caroço. **Informe Agropecuária**, Belo Horizonte, v.26, n.228, p. 44-48, 2005.

MARTINS, M. C.; BETTI, J. A.; LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIN, L. Doenças das rosáceas com caroço. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005b. v.2, Doenças das Plantas Cultivadas, cap. 62, p.545-557.

MATRHE, D. E.; COOK, R. J.; CALLAN, N. W. From discovery to use – traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. **Plant Disease**, v.83, p.972-983, 1999.

MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do parque de Itapuã, RS**,

**Brasil.** Porto Alegre, 2008. 124p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Mc CORMACK, P. J.; WILDMAN, H. G.; JEFFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplanne inhabiting yeasts and yeast-like fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.927-931, 1994.

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

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

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos.. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v.1, cap.1, p.17-60.

MEYER, W.; MASZEWSKA, K.; SORREL, T. C. PCR finger-printing: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Medicine Mycology**. v.39, p.185-193, 2001.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.31, p.2274-2280, 1993.

MORALES, H.; SANCHIS, V.; USALL, J.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, p. 61-67, 2008.

MORRIS, C., Phyllosphere, in: **Encyclopedia of Life Sciences**, Chichester: Wiley, 2001.

MORRIS, C. E.; MONIER, J. M.; JACQUES, M. A. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, 63: 1570-1576, 1997.

MORRIS, C. E.; MONIER, J. M.; JACQUES, M. A. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.4789-4795, 1998.

NARDO, E. A. B. de; CAPALB, 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.

NASSAR, A. H. & EL-TARABILY, K. A. Promotion of plant growth by an auxinproducing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**. v.42, p.97–108, 2005.

NEINHUIS, C. & BARTHLOTT, W. Seasonal changes of leaf surface contamination in beech, oak, and ginkgo in relation to leaf micromorphology and wettability. **New Phytologist**, v.138, p.91-98, 1998.

NUNES, C.; MANSO, T. *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**. v.61, p.64-71, 2011.

OLIVEIRA-FILHO A. T. e RATTER J. A. (1995). A study of the origin the Central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**, v.52, p.141-194, 1995.

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

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILI, S.; CIRVILLERI, G. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**, v.30, p.219-225, 2012.

PIANO, S.; NEYROTTI, V.; MIGHELI, Q.; GULLINO, M. L. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.11, p.131-140, 1997.

PICCININ, E. **Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos**. Piracicaba, 1995. 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PIRTILLA, A.; POSPIECH, H.; LAUKKANEN, H. Two Endophytic Fungi in Different Tissues of Scots Pine Buds *Pinus sylvestris*, L. **Microbial Ecology**. v.45, p.53-62, 2003.

PIVELLO, V. R.; COUTINHO, L. M. A qualitative successional model to assist in the management of Brazilian Cerrados. **For Ecology Management**, v.87, p.127-138, 1996.

- PRESTIDGE, R. A.; GALLAGHER, R. T. Endophyte fungus confers resistance to rye grass: Argentine stem weevil larval studies. **Ecology Entomological** v.13, p.429–435, 1988.
- PRAKICHAIWATTANA, C.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**. v.4, p.865-877, 2004.
- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, 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**, 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**, v.33, p.193-203, 2004.
- RIBEIRO, J.F. & WALTER, B.M.T. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In Cerrado: ecologia e flora. SANO, S. M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (Eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina. p.151 -212.
- ROBERTS, R. G. Postharvest biological control gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. **Phytopathology**, v.80, p.526-530, 1990.
- RODOV, V.; BEN-YEHOSHUA, S.; FANG, D.; D’HALLEWIN, G.; CASTIA, T. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. **Acta Horticulturae, Natural Phenols in Plant Resistance**, v.381, p.517-523, 1994.
- ROSA, C. A.; LACHANCE, M.A., TEIXEIRA, L. C. R S.; PIMENTA, R. S. and MORAIS, P. B. *Metschnikowia Cerradonensis* sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitidulid beetles in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Berks**, v.57, p.161-165, 2007.
- ROSSMAN, A. Y. Biodiversity of tropical microfungi: an overview. p.1-10. In: HYDE, K. D. (Ed.). **Biodiversity of Tropical Microfungi**. University press, Hong Kong. 1997.
- ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.225-243, 1992.
- ROTEM, Y.; YARDEN, O.; SZTEJNBERG, A. The mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* express *exgA* encoding an exo- $\beta$ -1, 3-glucanase in culture and during mycoparasitism. **Phytopathology**, v.89, p.631-638, 1999.
- RUIVO, C. C. C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais nativas da Mata Atlântica, Parque Estadual Da Serra Do Mar – Núcleo Picinguaba, São Paulo**. Tese (Doutorado). Rio Claro, 2005. 80p. Universidade Estadual Paulista.

SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTONA, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida Oleophila* strain I-182: II. a study on mode of action. **Biological Control**. v.25, p.151-161, 2002.

SANTOS, E. A., De OLIVEIRA, R. B., MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Review of Microbiology**, v.27, p.33-40, 1996.

SANTOS, H. P. S. F.; MATOS, A. P. Doenças dos Citros. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F. & TAVARES, S. C. C. H.; (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília-DF: Embrapa Informações Tecnológica, 2006.

SANTOS, L. T. P. **Micobiota foliícola de *Salacia crassifolia***. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília, 2011.

SANZANI, S. M.; NIGRO, F.; MARI, M.; IPPOLITO, A. Innovations in the control of postharvest diseases of fresh fruit and vegetables. **Arab Journal of Plant Protection**. v.27, p.240-244, 2009.

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

SCHIRMBOCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y. L.; HAYES, C. K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p.4364-4370, 1994.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v.25, p.951-957, 2008.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p. 251-260, 2000.

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

SILVA, J.M.C. Da; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience** v.52, p.225-233, 2002.

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

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**, v.24, p.123-134, 2002.

SPÓSITO, M. B.; BASSANEZI, R. B. Problemas sanitários na pós-colheita para a exportação de frutas cítricas e métodos de controle. In: **Simpósio de controle de doenças de plantas: patologia pós-colheita de frutos e hortaliças 2**. 2020, Lavras. **Anais**: Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. p. 79-83.

STADLER, B., MULLER, T. Aphid honeydew and its effect on the phyllosphere microflora of *Picea abies* (L.) Karst.. *Oecologia*, v.108, p.771-776, 1996.

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

TIAN, S. P.; FAN, Q.; XU, Y.; QIN, G. Z.; LIU, H. B. Effect of biocontrol antagonists applied in combination with calcium on the control of postharvest diseases in different fruit. **Bulletin-OILB/SROP**. v.25, p.193-196, 2002.

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**. Piracicaba, 2005. 85p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.

TORRES, R.; TEIXIDO, N.; VINAS, I.; CASALINI, L.; GIRAUD, M.; USALL, J. Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. **Journal of Food Protection**. v.69, p.2703-2711, 2006.

TUSET, J. J. Enfermedad durante la conservación. In: DURAN-VILA, N.; MORENO, P. **Enfermedades de los cítricos**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2000. p. 99-114.

URQUHART, E. J.; PUNJA, Z. K. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.219-229, 2002.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, cap.2, p.41-56.

VALE, H. M. M. **Diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.) e sucessão durante a seca natural.** Viçosa, 2009. 88p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

VALENTE, P.; RAMOS, J. P.; LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.45, p. 949-958, 1999.

VERMA, A.; VERMA, S.; SUDHA, SAHAY, N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth promoting root endophyte. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.2741–2744, 1999.

VERO, S.; MONDINO, P.; BURGUENO, J.; SOUBES, M.; WISNIEWSKI, M. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.26, p.91-98, 2002.

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

WEISS, A., MÖGEL, G., KUNZ, S. Development of “Boni-Protect” – a yeast preparation for use in the control of postharvest diseases of apples. In: **Ecofruit – 12<sup>th</sup> International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing**. Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Obst- und Weinbau in Weinsberg (Baden-Württemberg), Germany. v.31, p.1-22, 2006.

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

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E.; BILES, C. L.; McLAUGHLIN, R.; CHALUTZ, E.; DROBY, E. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. **Crop Protection**, v.10, p.172–177, 1991.

WILSON, D. Endophyte – the evolution of term, a classification of its use and definition. **Oikos**, v.73, p.274–276, 1995.

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

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

YU, T.; WANG, L.; YIN, Y.; WANG, Y.; ZHENG, X. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, p.44-48, 2008.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. **Biological Control**. v.54, p.172-180, 2010.

ZHANG, H.; WANG, L.; MA, L.; DONG, Y.; JIANG, S.; XU, B.; ZHENG, X. Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p.167-171, 2009.

ZHENG, X. D., ZHANG, H. Y., SUN, P. Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. **European Food Research and Technology**, v.220, p.353-357, 2005.



## 6. ANEXOS

**Tabela 1A** – Listagem dos meios de culturas e soluções utilizados.

Ágar YEPG	2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura; 2% ágar
Água Petonada	0,1% peptona
BDA	39% batata-dextrose-ágar
Meio 10% de NaCl	5,0% glicose, 10% NaCl, 2% ágar, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura.
MMF (meio mínimo de fermentação)	0,75% peptona, 0,45% extrato de levedura, 2% de glicose
MYGP	0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 1% glicose, 2% ágar.
YCB (assimilação de fonte de carbono)	0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB); 2% ágar; 0,5% fonte de carbon (1% quando utilizada rafinose)
YNB (assimilação de fonte de nitrogênio)	1,17% Yeast Carbon Base (YCB); 2% ágar; fonte nitrogenada nas diferentes concentrações

**Tabela 2A – Características morfológicas**

<b>Características culturais dos isolados de leveduras totais e endofíticas em Meio de Cultura MYGP pH 5.6</b>										
<b>Hospedeira</b>	<b>Nº</b>	<b>Crescimento</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Contorno</b>	<b>Borda</b>	<b>Superfície</b>	<b>Perfil</b>	<b>Tamanho</b>	<b>OBS</b>
<i>Sabicea brasiliensis</i>	90	48h	Creoso	Salmão	Circular	Lisa	Estrias concêntricas	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	92	48 h	Creoso	Creme	Circular	Lisa	Estrias concêntricas	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	97	48h	Creoso	Creme	Circular	Lisa	Estrias concêntricas	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	98	48h	Creoso	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	101	48h	Creoso	Bege	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	103	48h	Creoso	Bege	Circular	Lisa	Elevada	Lisa, convexa e cume central	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	105	48h	Pastoso	Bege	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	106	48h	Seca	Branco	Irregular	Franjeada	Granulosa	Convexa	Médio	-

								e pregueada		
<i>S. brasiliensis</i>	107	48h	Cre moso	Branco	Circular	Lisa	Estrias concêntricas	Lisa, convexa e cume central	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	108	48h	Cre moso	Branco	Irregular	Filamentosa	Elevada	Franjeada	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	109	48h	Cre moso	Crème	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Franjeada	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	110	48h	Cre moso	Crème	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	111	48h	Cre moso	Crème	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	112	48h	Cre moso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	113	48h	Cre moso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	-
<i>S. brasiliensis</i>	115	48h	Cre moso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa, convexa e cume central	Medio	-
<i>S. brasiliensis</i>	117	48h	Cre moso	Branco	Circular	Lisa	Estrias	Lisa e	Médio	-

							radiais	convexa		
<i>S. brasiliensis</i>	122	48h	Cremoso	Branco	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa, convexa e cume centra	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	126	48h	Cremoso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	127	48h	Brilhante	Amarelo	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	128	48h	Cremoso	Bege	Irregular	Filamentosa	Elevada	Franjeada	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	129	48h	Brilhante	Amarelo	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	Colônia translúcida
<i>S. brasiliensis</i>	131	48h	Cremoso	Branco	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa, convexa cume central	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	134	48h	Pastoso	Bege escuro	Circular	Filamentosa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	Cor escurece, tente p/ preto
<i>S. brasiliensis</i>	135	48h	Cremoso	Branco	Circular	Lisa	Elevada	Lisa	Médio	

<i>S. brasiliensis</i>	137	48h	Cremoso	Branco	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	138	48h	Cremoso	Branco	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	144	48h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	145	48h	Cremoso	Branco	Irregular	Filamentosa	Elevada	Franjeada	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	146	48h	Cremoso	Creme	Circular	Filamentosa	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	147	48h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	148	48h	Cremoso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	149	48h	Cremoso	Amarelo claro	Irregular	Lisa	Plana	Achatada	Médio	Muito translúcida
<i>S. brasiliensis</i>	150	48h	Cremoso	Branco	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa, convexa e cume central	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	152	48h	Cremoso	Creme	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	

<i>S. brasiliensis</i>	154	48h	Cremoso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa, convexa e cume central	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	157	48h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	158	48h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	164	48h	Cremoso	Bege	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa, convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	166	48h	Cremoso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	168	48h	Pastoso	Creme	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Franjeada	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	169	48h	Cremoso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	172	48h	Cremoso	Branco	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	176	48h	Cremoso	Creme	Circular	Pregueada	Estrias radiais	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	177	48h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	

<i>S. brasiliensis</i>	178	48h	Cremoso	Branco	Circular	Lisa	Estrias radiais	Lisa, convexa e cume central	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	179	48h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	181	48h	Cremoso	Bege	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Lisa e convexa	Médio	
<i>S. brasiliensis</i>	182	48h	Pastoso	Creme	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Franjeada	Médio	
<i>Psidium pohlanum</i>	184	48h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Estrias concentr.	Lisa e convexa	Médio	
<i>P. pohlianum</i>	185	48h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Estrias concentr.	Lisa e convexa	Médio	Cor translúcida
<i>S. brasiliensis</i>	215	48h	Cremoso	Creme	Irregular	Pregueada	Elevada	Franjeada	Médio	
<i>Byrsonimia crassifolia</i>	263	96h	Cremoso	Creme	Irregular	Filamentosa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	264	96h	Seco	Bege claro	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Convexa e Pregueada	Pequeno	
<i>B. crassifolia</i>	266	72h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	

<i>B. crassifolia</i>	269	72h	Cremoso	Bege	Irregular	Filamentosa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	Cor escurece
<i>B. crassifolia</i>	270	72h	Seco	Bege claro	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Convexa e Pregueada	Pequeno	
<i>B. crassifolia</i>	271	48h	Cremoso	Vermelho claro	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	272	72h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	276	48h	Pastoso	Lilás	Irregular	Pregueada	Granulosa	Lisa e côncava	Médio	Colônia irregular
<i>B. crassifolia</i>	278	72h	Pastoso	Lilás	Irregular	Pregueada	Granulosa	Lisa e côncava	Médio	Colônia irregular
<i>B. crassifolia</i>	284	48h	Cremoso	Bege	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	287	72h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	288	48h	Pastoso	Creme	Irregular	Filamentosa	Elevada	Lisa, convexa e cume central	Grande	



<i>B. crassifolia</i>	289	48h	Pastoso	Creme	Circular	Lisa	Plana	Achatada	Médio	Adquire aspecto seco
<i>B. crassifolia</i>	290	48h	Pastoso	Creme	Circular	Lisa	Plana	Achatada	Médio	Adquire aspecto seco
<i>B. crassifolia</i>	292	48h	Creмоса	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	293	48h	Creмоса	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	294	72h	Creмоса	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	296	72h	Creмосо	Creme	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	297	72h	Creмосо	Creme	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	301	96h	Creмосо	Creme	Irregular	Filamentosa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	Colônia aveludada
<i>B. crassifolia</i>	303	96h	Seco	Bege	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Convexa e Pregueada	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	304	96h	Seco	Bege	Irregular	Filamentosa	Granulosa	Convexa e	Médio	

								Pregueada		
<i>B. crassifolia</i>	310	72h	Seco	Creme	Circular	Lisa	Granulosa	Convexa e Pregueada	Médio	Estrias concentricas
<i>B. crassifolia</i>	313	72h	Seco	Creme	Circular	Lisa	Granulosa	Convexa e Pregueada	Médio	Estrias concentricas
<i>B. crassifolia</i>	316	72h	Cre moso	Bege escuro	Circular	Lisa	Elevada	Convexa e Pregueada	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	318	48h	Cre moso	Cre me	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	327	48h	Cre moso	Cre me	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>B. crassifolia</i>	328	48h	Cre moso	Cre me	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>Anacardium humile</i>	380	48h	Pastoso/duro	Branco	Irregular	Ondulada	Granulosa	Lisa e crateriforme	Médio	
<i>A. humile</i>	381	48h	Cre moso	Cre me	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	

<i>A. humile</i>	382	48h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>A. humile</i>	386	48h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Pequena	
<i>A. humile</i>	388	48h	Cremosa	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Pequena	
<i>A. humile</i>	393	48h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Pequena	
<i>A. humile</i>	397	72h	Seco	Marrom /vermelho	Circular	Filamentosa	Elevada	Franjeada	Médio	
<i>A. humile</i>	398	72h	Seco	Laranja	Circular	Filamentosa	Elevada	Lisa e convex.	Médio	
<i>A. humile</i>	399	72h	Cremoso	Creme	Circular	Filamentosa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>A. humile</i>	405	72h	Cremoso	Creme	Circular	Lisa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	
<i>Eugenia dysenterica</i>	408	96h	Pastoso	Creme	Circular	Filamentosa	Granulosa	Convexa e pregueada	Médio	
<i>E. dysenterica</i>	410	96h	Pastoso	Creme	Circular	Filamentosa	Granulosa	Convexa e	Médio	

				marrom				pregueada		
<i>E. dysenterica</i>	412	96h	Pastoso	Bege/ creme	Irregular	Franjeada	Estrias conc.	Elevada e trapezoida 1	Médio	
<i>E. dysenterica</i>	414	96h	Pastoso	Branco/ creme	Circular	Filamentosa	Granulosa	Convexa e pregueada	Médio	
<i>E. dysenterica</i>	415	96h	Cremosa	Creme	Circular	Lisa	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>E. dysenterica</i>	416	96h	Cremosa	Lilás	Irregular	Franjeada	Vales radiais	Lisa e craterifor me	Médio	
<i>E. dysenterica</i>	417	96h	Pastosa	Creme/ bege	Circular	Pregueada	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>E. dysenterica</i>	418	96h	Pastosa	Creme	Irregular	Lobulada	Elevada	Lisa e convexa	Médio	
<i>E. dysenterica</i>	420	96h	Cremosa	Marrom	Circular	Franjeada	Granulosa	Convexa e pregueada	Médio	Cor tende a escurecer
<i>E. dysenterica</i>	422	96h	Cremosa	Creme/b ranco	Circular	Filamentosa	Estrias conc.	Lisa e convexa	Médio	