

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

**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**

**Mauricio Batista Fialho**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mauricio Batista Fialho  
Biólogo

**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**

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2008**

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

Fialho, Mauricio Batista

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 / Mauricio Batista Fialho. - - Piracicaba, 2008.  
120 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.  
Bibliografia.

1. Compostos orgânicos 2. Controle biológico (Fitossanidade) 3. Frutas cítricas 4. Fungos fitopatogênicos 5. Levedura - Antagonistas e inibidores 6. Pinta preta 7. *Saccharomyces*  
I. Título

CDD 634.3

F438m

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

A Deus

Aos meus pais Maria Luiza e João Batista pelo amor e educação, e irmã Sandra pelo carinho.

À Juliana, meu grande amor e inspiração de todos os momentos.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por guiar os meus passos e iluminar a minha caminhada.

Ao professor Sérgio F. Pascholati pela oportunidade, orientação conduzida e paciência.

Aos queridos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, André, Ariana, Cíntia, Dirceu, Ely, Fernando, Fúvia, Josué, Leonardo, Luciana, Maria Cristina, Marisa, Marizete, Nikolas, Odair, Ricardo, Rodrigo, Silvia e Ueliton, pela aprendizagem, apoio e convivência sempre alegre.

Em especial às minhas amigas Nivea Maria Tonucci Zanardo e Solange Maria Bonaldo por todos esses anos de apoio e companheirismo que foram essenciais na minha caminhada.

Aos professores Dr. Ângelo Jacomino, Dr. Antonio Carlos Labate, Dr. Antonio de Góes (UNESP/Jaboticabal), Dr. Fábio Augusto (UNICAMP), Dr. Luiz Carlos Basso, Dr. Mário Massayuki Inomoto, Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro (CENA), e Dra. Maria Heloisa Duarte de Moraes pela orientação, fornecimento de material e/ou por disponibilizarem seus laboratórios para a realização desse trabalho.

Ao Alexander de Andrade, Annelise Roberta Tremocoldi, Giselle de Carvalho, Luiz Fernando Romanholo Ferreira, Márcio Pozzobon Pedroso, Paula Fabiane Martins e Rosana Bessi que colaboraram de forma essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos e colegas da Esalq que embora não tenham seus nomes citados aqui tiveram papel muito importante na minha vida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola e Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1 Revisão bibliográfica.....	14
2.1.1 Ocorrência e importância da pinta preta dos citros.....	14
2.1.2 Etiologia.....	16
2.1.3 Sintomatologia.....	17
2.1.4 Epidemiologia.....	19
2.1.5 Controle.....	20
2.1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como agente de biocontrole.....	22
2.1.7 Compostos orgânicos voláteis.....	24
2.1.8 Biofumigação.....	27
2.1.9 Enzimas associadas à morfogênese.....	29
2.1.10 Estresse oxidativo.....	30
2.1.11 Proteômica.....	33
2.2 Material e métodos.....	35
2.2.1 Fungo fitopatogênico e levedura antagonista.....	35
2.2.2 Efeito do meio de cultivo na produção de compostos orgânicos voláteis por <i>S. cerevisiae</i> .....	35
2.2.3 Identificação dos compostos orgânicos voláteis produzidos por <i>S. cerevisiae</i> através de SPME-GC-MS.....	36
2.2.4 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o crescimento micelial e síntese de proteínas.....	37
2.2.4.1 Efeito sobre o crescimento micelial.....	37

2.2.4.2 Efeito sobre a síntese de proteínas.....	38
2.2.4.3 Determinação dos valores de MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>100</sub> da mistura artificial de voláteis.....	38
2.2.5 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a taxa respiratória.....	39
2.2.6 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a atividade de enzimas.....	40
2.2.6.1 Tratamento e obtenção do micélio.....	40
2.2.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	40
2.2.6.3 Determinação da atividade de enzimas associadas à morfogênese.....	41
2.2.6.3.1 Atividade da quitinase.....	41
2.2.6.3.2 Atividade da $\beta$ -1,3-glucanase.....	41
2.2.6.3.3 Atividade da lacase.....	42
2.2.6.3.4 Atividade da tirosinase.....	42
2.2.6.4 Determinação da atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo.....	43
2.2.6.4.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	43
2.2.6.4.2 Atividade da catalase (CAT).....	43
2.2.6.4.3 Atividade da glutathione redutase (GR).....	44
2.2.7 Análise proteômica.....	44
2.2.7.1 Obtenção do micélio e extração de proteínas.....	44
2.2.7.2 Eletroforese bidimensional (2D).....	45
2.2.8 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre outros organismos.....	46
2.2.8.1 Efeito sobre fungos e bactérias.....	46
2.2.8.2 Efeito individual dos diferentes componentes da mistura artificial de voláteis sobre fitopatógenos fúngicos.....	47
2.2.8.3 Fumigação de sementes de feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) infectadas com <i>S. sclerotiorum</i> .....	48
2.2.8.3.1 Inoculação artificial.....	48



2.2.8.3.2 Fumigação.....	49
2.2.8.3.3 Análise de sanidade.....	49
2.2.8.4 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o fitonematóide <i>Meloidogyne javanica</i> .....	50
2.3 Resultados e discussão.....	51
2.3.1 Efeito do meio de cultivo na produção de compostos orgânicos voláteis por <i>S. cerevisiae</i> e identificação através de SPME-GC-MS.....	51
2.3.2 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o crescimento micelial e síntese de proteínas.....	61
2.3.3 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a taxa respiratória.....	65
2.3.4 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a atividade de enzimas associadas à morfogênese.....	66
2.3.5 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo.....	75
2.3.6 Análise proteômica.....	82
2.3.7 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre outros organismos.....	88
2.3.7.1 Fungos e bactérias.....	88
2.3.7.2 Fumigação de sementes de feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) infectadas com <i>S. sclerotiorum</i> .....	96
2.3.7.3 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o fitonematóide <i>Meloidogyne javanica</i> .....	99
3 CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103

## RESUMO

### **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**

A pinta preta dos citros tem como agente causal o fungo *G. citricarpa*. A doença causa depreciação estética dos frutos e praticamente inviabiliza a exportação de laranja *in natura* principalmente para a União Européia, por ser considerada uma doença quarentenária. Frutos colhidos contendo infecções quiescentes, embora sem sintomas, podem desenvolvê-los durante o processo de exportação. A utilização de fungicidas é o principal método de controle utilizado em pré e pós-colheita. No entanto, o custo do controle químico é significativamente alto e já foi relatado o surgimento de isolados resistentes. A levedura *S. cerevisiae* é capaz de inibir o desenvolvimento *in vitro* de *G. citricarpa* e o antagonismo se deve a produção de compostos orgânicos voláteis de ação fungistática. Em virtude da procura por novos métodos de controle menos danosos à saúde humana e meio ambiente, dos prejuízos causados pela doença e do potencial dos compostos voláteis no controle da doença na pós-colheita, o trabalho visou identificar os compostos voláteis produzidos pela levedura e elucidar os mecanismos envolvidos na inibição do fitopatógeno. Esse conhecimento é fundamental para o desenvolvimento de técnicas inovativas de controle. A produção de compostos voláteis antimicrobianos por *S. cerevisiae* foi dependente do substrato utilizado para o seu cultivo, sendo a glicose, sacarose e maltose fontes de carbono favoráveis. Foi verificado através da análise em SPME-GC-MS que a levedura produziu em meio BDA, principalmente compostos pertencentes ao grupo dos álcoois, constituindo 95% da composição total, além de ésteres em menor proporção. A mistura artificial de voláteis mimetizou os efeitos dos voláteis produzidos pela levedura, sendo os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>100</sub> de 0,48 µL mL<sup>-1</sup> e 2,84 µL mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A exposição do fitopatógeno aos compostos voláteis reduziu a síntese de proteínas e inibiu a atividade de enzimas associadas à morfogênese (quitinase, β-1,3-glucanase, lacase e tirosinase). Os compostos voláteis desencadearam o processo de estresse oxidativo no fungo, fato observado através da elevação da atividade de enzimas (superóxido dismutase e catalase) associadas a mecanismos de detoxificação de espécies ativas de oxigênio. A análise das proteínas diferencialmente expressas de *G. citricarpa*, através de eletroforese bidimensional, indicou que os compostos voláteis alteraram a expressão de 40 proteínas, sendo 29 inibidas e 11 superexpressas. A mistura artificial de voláteis também foi ativa contra fungos de diversos grupos taxonômicos, no entanto, não apresentou atividade sobre as bactérias testadas. Os compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol foram os mais ativos quando utilizados isoladamente contra *Colletotrichum gloesporioides*, *Penicillium digitatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*. Sementes de feijão fumigadas com a mistura artificial de voláteis exibiram redução na incidência de *S. sclerotiorum*. A mistura também exibiu efeito nematocida sobre *Meloidogyne javanica*. Portanto, os resultados demonstram que os voláteis identificados em *S. cerevisiae* afetam a síntese de proteínas e a atividade de enzimas associadas ao crescimento vegetativo de *G. citricarpa*. Finalmente, fumigação utilizando compostos voláteis apresenta potencial no controle de *G. citricarpa* em pós-colheita,

bem como de outros organismos de importância agronômica. O trabalho também contribuiu com novos elementos sobre o papel dos voláteis na interação entre microrganismos na natureza.

Palavras-chaves: Interação microbiana; Inibição; Controle alternativo; *Phyllosticta*; *Citrus*

## ABSTRACT

### **Action mechanisms of antimicrobial volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* on the development of *Guignardia citricarpa*, causal agent of the citrus black spot**

The citrus black spot has as causal agent the fungus *G. citricarpa*. The disease causes aesthetic depreciation of fruits and practically makes them unviable for exportation mainly to European Union where the disease is considered a quarantine pest. Harvested fruits can have quiescent infections although without symptoms and can develop them during the exportation process. The use of fungicides is the main chemical control method used in pre and post-harvest, however the cost is significantly high and it was already described the development of fungicide resistant strains. The yeast *S. cerevisiae* is able to inhibit the *in vitro* *G. citricarpa* growth, and the antagonism is due to production of volatile organic compounds (VOCs) of fungistatic effect. Because of the search for new control methods less harmful for human health and environment, the losses caused by the disease and the potential of the VOCs in the control of the pathogen in the post-harvest, the aim of this work was to identify the VOCs produced by the yeast and to elucidate the mechanisms involved in the inhibition of the fungus. This knowledge is essential for the development of innovative control techniques. The results showed that the production of antimicrobial VOCs by *S. cerevisiae* was dependent on the substrate used, being glucose, sucrose and maltose favorable carbon sources. It was verified through analysis in SPME-GC-MS that the yeast, grown on PDA medium, produced mainly compounds belonging to the group of alcohols (95% of the total composition), besides esters in smaller proportion. An artificial volatile mixture reproduced the effects of the VOCs produced by the yeast, being the values of MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>100</sub> of 0.48  $\mu\text{L mL}^{-1}$  and 2.84  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectively. The phytopathogen exposition to the VOCs reduced protein synthesis and inhibited the activity of morphogenesis associated enzymes like chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, laccase and tyrosinase. The VOCs initiated the oxidative stress process, which was observed through the increase in the activity of superoxide dismutase and catalase, enzymes associated to the detoxification of active oxygen species. The analysis of the differentially expressed proteins of *G. citricarpa*, through two-dimensional gel electrophoresis, indicated that the VOCs modified the expression of 40 proteins, being 29 down regulated and 11 up regulated. The artificial mixture of VOCs was also active against fungi of several taxonomic groups, however, there were no activity against bacteria. The compounds 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-butanol were the most active when tested alone against *Colletotrichum gloesporioides*, *Penicillium digitatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum*. Bean seeds fumigated with the artificial mixture of VOCs showed reduction in *S. sclerotiorum* incidence. In addition, the VOCs exhibited nematicidal effect against *Meloidogyne javanica*. The results demonstrate that the VOCs produced by *S. cerevisiae* affect protein synthesis and the activity of enzymes associated to the vegetative growth in *G. citricarpa*. Thus, the fumigation using VOCs presents potential in the control of citrus black spot disease in post-harvest as well as of other organisms of agronomic importance. The present work

also contributed with new information regarding the role of the VOCs in the interactions among microorganisms in nature.

Keywords: Microbial interaction; Inhibition; Alternative control; *Phyllosticta*; *Citrus*

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de fungicidas para o controle da pinta preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, é o principal método de controle utilizado em pré e pós-colheita. No entanto, além do custo do controle químico ser significativo, já foi relatado o surgimento de isolados resistentes ao benomyl em meados da década de 80, o que levou a restrição ao seu uso (GHINI; KIMATI, 2000; AGOSTINI et al., 2006).

A ocorrência de infecções severas no campo provoca a queda prematura dos frutos podendo refletir em perdas de até 80% (KLOTZ, 1978). Embora as lesões sejam restritas a casca do fruto, este se torna depreciado esteticamente desfavorecendo a comercialização dos frutos *in natura*. Além disso, a doença restringe a exportação principalmente para a União Européia, visto a doença ser considerada quarentenária A1, por não estar presente nos países membros (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

Os frutos colhidos contendo infecções quiescentes, embora assintomáticos, podem desenvolver os sintomas durante o processo de exportação. A detecção da doença em um único fruto determina o rechaço de toda a carga que fica impedida de desembarcar, acarretando em elevados prejuízos para os exportadores (BALDASSARI et al., 2007; OEPP/EPPO, 2003; 2007).

Problemas associados à aquisição de resistência e a percepção do público em geral sobre o impacto potencial das práticas tradicionais de controle sobre a saúde e meio ambiente levaram a uma crescente demanda por produtos livres de resíduos químicos (GULLINO; KUIJPERS, 1994). Desta forma, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate de doenças (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A utilização de microrganismos antagônicos na pós-colheita pode interromper algum estágio da doença ou do ciclo de vida do fitopatógeno. Isso pode ocorrer através de parasitismo, competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas (PUNJA; UTKHEDE, 2003), compostos antibióticos voláteis (STROBEL, 2006) e não voláteis (VINALE et al., 2006). Foi verificado em trabalho prévio que a linhagem CR-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, isolada de processos fermentativos para a produção de etanol, apresentou capacidade antagônica *in vitro* contra *G. citricarpa* (FIALHO, 2004).

Nesse trabalho foi demonstrado que o mecanismo de ação atuante no processo antagônico era a produção de compostos orgânicos voláteis. Os voláteis antimicrobianos têm recebido pouca atenção quando comparado ao antagonismo causado por substâncias difusíveis em meio líquido (CHAURASIA et al., 2005).

O tratamento de frutos em câmaras fechadas durante o armazenamento e transporte através da fumigação biológica, utilizando os voláteis produzidos e liberados por *S. cerevisiae* ou misturas artificiais de voláteis, poderia ser utilizado no controle da pinta preta dos citros, bem como de outras doenças de ocorrência na pós-colheita. Tal processo seria uma alternativa ambientalmente mais segura, visto o controle químico da doença ser muitas vezes ineficiente ou apresentar riscos devido à resistência ao limitado espectro de fungicidas com uso permitido na pós-colheita. Além disso, não há necessidade de haver contato direto com os frutos, sendo mais compatível com os sistemas de *packing house*, visto minimizar a manipulação do produto (MERCIER; JIMÉNEZ, 2004). É clara a necessidade de se conhecer o papel dos compostos orgânicos voláteis na interação entre microrganismos, para que seja possível uma manipulação otimizada desta característica para propostas de controle alternativo.

Em virtude dos prejuízos causados pela pinta preta dos citros, do maior interesse por métodos alternativos de controle e da necessidade de uma maior compreensão sobre os mecanismos envolvidos nas interações microbianas mediadas por compostos orgânicos voláteis, o presente trabalho teve como principal objetivo identificar os compostos orgânicos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* e elucidar alguns dos mecanismos de ação atuantes no processo inibitório de *G. citricarpa*.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão bibliográfica

#### 2.1.1 Ocorrência e importância da pinta preta dos citros

A pinta preta dos citros ou mancha preta dos citros é uma doença que afeta todas as espécies de *Citrus* com exceção da laranja azeda (*C. aurantium* L.) e seus híbridos que não apresentam suscetibilidade. Os limões verdadeiros (*C. limon*) são suscetíveis e podem ocorrer consideráveis prejuízos nas laranjas doce (*C. sinensis*) e nos pomelos (*C. paradisi* Macf.). O fungo pode estar na área do pomar e a doença demorar de 5 a 30 anos para se manifestar e tornar-se epidêmica (KOTZÉ, 1981; KOTZÉ, 1996).

A pinta preta foi inicialmente descrita na Austrália nas proximidades da cidade de Sidney no ano de 1895, sendo responsável por grandes perdas com relação a frutos de laranjeira Valência (KIELY, 1948). Em 1925, foi constatada na província de Natal, na África do Sul (DOIDGE, 1929). Nos anos posteriores, ela foi detectada em diversos continentes como Ásia (China, Filipinas, Indonésia, Taiwan e Japão), África (Swazilandia, Zimbabue e Moçambique) e América do Sul (Argentina, Peru e Brasil) (KOTZÉ, 1988; FEICHTENBERGER, 1996; FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997).

No território brasileiro, a pinta preta foi descrita em 1980 (ROBBS; PIMENTEL; RIBEIRO, 1980), afetando pomares em São Gonçalo e Itaboraí, no Estado do Rio de Janeiro. Posteriormente disseminou-se pela Baixada Costeira Fluminense (ROBBS, 1990; ROBBS; BITTENCOURT, 1995). Em 1986, a doença foi identificada na principal região produtora do Rio Grande do Sul, no Vale do Caí (FEICHTENBERGER, 1996).

O primeiro relato referente à pinta preta no Estado de São Paulo foi feito em 1992 em limoeiros verdadeiros e laranjas doces nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho (GÓES; FEICHTENBERG, 1993). A doença se espalhou de forma endêmica por toda a região produtora de citros de Limeira, Araras, Rio Claro, Mogi Guaçu, Aguaí, Pirassununga, Santa Cruz das Palmeiras e Casa Branca (FEICHTENBERGER, 1996; GÓES, 1998).

Infecções severas no campo provocam a queda prematura dos frutos, refletindo em perdas na produção que podem chegar a 80% (KLOTZ, 1978).



Dado ao longo período de suscetibilidade dos frutos após a queda das pétalas (no mínimo 24 semanas) (BALDASSARI; REIS; GÓES, 2006), há necessidade de várias pulverizações com fungicidas, elevando significativamente o custo de controle, que, atualmente, está estimado em cerca de 10,5% a 13,2% do custo de uma caixa de laranja (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005). Além disso, a utilização indiscriminada promoveu a seleção de isolados resistentes ao benomyl, o que levou a restrição ao seu uso (GHINI; KIMATI, 2000).

Embora as lesões sejam restritas a casca (flavedo ou epicarpo) e não alcancem o albedo (mesocarpo) do fruto (GÓES, 1998), este se torna depreciado esteticamente desfavorecendo a comercialização dos frutos *in natura*. Além disso, a doença restringe a exportação para os Estados Unidos e principalmente para a União Européia devido a barreiras fitossanitárias, visto ser considerada uma doença quarentenária A1, por não estar presente nessas áreas (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

Os frutos colhidos, embora não apresentem sintomas aparentes, mas contendo infecções quiescentes podem desenvolvê-los na pós-colheita durante o armazenamento e transporte, às vezes, no local de destino. A detecção da doença em um único fruto determina o rechaço de toda a carga que fica impedida de desembarcar, acarretando em elevados prejuízos para os exportadores (BALDASSARI et al., 2007; OEPP/EPPO, 2003; 2007).

No caso de frutos produzidos em áreas de ocorrência da doença, mesmo sob criterioso programa de controle do patógeno e adoção de cuidados rigorosos nas inspeções no *packing house*, não se descarta a possibilidade do aparecimento de frutos sintomáticos no local de destino. Dessa forma, no caso de frutos destinados à exportação, oriundos de pomares existentes em regiões não indenizadas, há a necessidade de uma série de cuidados, incluindo o uso diferenciado de tratamentos químicos, combinado com uma série de práticas culturais. Além desses cuidados, há ainda a necessidade da realização de medidas adicionais que ampliem o nível de confiança dos exportadores (BALDASSARI et al., 2007).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e os órgãos estaduais de defesa agropecuária estabeleceram um programa de manejo de risco da doença para atender as exigências dos países importadores europeus. O programa

estabelece a exigência de cadastramento das unidades de produção e dos *packing houses* envolvidos na exportação de frutos. Os pomares cadastrados são inspecionados durante todo o ciclo de produção e quando a doença é detectada, a unidade de produção é excluída do processo de exportação. Caso não seja detectada nas inspeções de campo, frutos são amostrados na pré-colheita e encaminhados a laboratórios oficiais para realização do teste de indução de sintomas da doença. O teste visa detectar o fungo *G. citricarpa* em frutos, que embora infectados, ainda não apresentam os sintomas. Se o resultado do teste for positivo, a unidade de produção também é impedida de exportar (FEICHTENBERGER, 2007).

### 2.1.2 Etiologia

A pinta preta dos citros é uma doença de origem fúngica cuja fase sexual ou perfeita foi descrita em 1948 (KIELY, 1948), sendo denominada *Guignardia citricarpa* Kiely, e a forma assexual ou imperfeita corresponde a *Phyllosticta citricarpa*. A fase assexuada foi a primeira a ser descrita, em 1889 por McAlpine (MCONIE, 1964), mas inicialmente denominada *Phoma citricarpa* McAlpine (ROOBS, 1990). Na fase sexual, pseudotécios estão presentes somente em folhas de citros em decomposição no solo. São isolados ou agregados, globosos, imersos, de cor castanho-escura a preta, com 95-125 µm de diâmetro, ostíolo não papilado, circular, com 10-17,5 µm de diâmetro e pseudoparáfises ausentes. Os ascos são cilíndricos-clavados (40-64 x 12-15 µm), de parede bitunicada, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com o centro dilatado (12,5-1,6 x 4,5-6,5 µm) e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (BALDASSARI et al., 2001).

A fase assexual representada por *P. citricarpa*, produz picnídios em lesões nos ramos, frutos e folhas e em folhas em decomposição. Os picnídios são solitários, às vezes agregados, globosos, com 115-190 µm de diâmetro, de coloração marrom escura para preta, ostíolo levemente papilado, circular e com 12-14,5 µm de diâmetro. Os conídios possuem formato obovóide para elíptico, hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice hialino em uma das extremidades, base truncada e medem 8-10,5 x

5,5-7  $\mu\text{m}$ . O conidióforo é cilíndrico e alongado com 9  $\mu\text{m}$  de comprimento (SUTTON; WATERSON, 1966; BALDASSARI et al., 2001).

Através de isolamentos realizados, a partir de frutos ou folhas, obtêm-se colônias de coloração negra com bordos lobulados e aspecto granuloso. Devido à produção de picnídios em meio de cultivo, é comum o desenvolvimento simultâneo do estado espermácio, estado intermediário entre o anamórfico e o teleomófico. Neste estado, são produzidas espermácias baciliformes, que são células especializadas, masculinas, unicelulares que participam da reprodução sexual e que darão origem aos ascomas ou pseudotécios do estado teleomórfico (ALCOBA et al., 2000).

### 2.1.3 Sintomatologia

Os órgãos atacados pela pinta preta dos citros podem ser em ordem de frequência: frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos. Uma das principais características desta doença é a ausência de sintomas típicos nos tecidos vegetais mesmo estando infectados (AGUILAR-VILDOSO, 2002). Nos frutos as lesões produzidas ficam restritas ao flavedo (epicarpo) e não alcançam o albedo (mesocarpo) do fruto (GÓES, 1998).

O surgimento de sintomas pode demorar até um ano (fase latente), dependendo da variedade e das condições ambientais. O aparecimento é favorecido pela luminosidade combinada com altas temperaturas, sendo comum encontrar frutos com maior número de lesões na face exposta à luz do sol. No Brasil, os frutos podem manifestar seis tipos de lesões, nomeadas de acordo com suas características, que podem variar dependendo do tamanho, fase de maturação do fruto, condições climáticas e tipo de esporo responsável pela infecção (GÓES, 1998; GÓES et al., 2000; KOTZE, 2000; FUNDECITRUS, 2005).

Mancha preta ou mancha dura - É o sintoma mais típico e comum da doença e geralmente surge quando os frutos iniciam a fase de mudança de cor da casca. As lesões são deprimidas, de bordos bem definidos, tendo centro acinzentado e pontos escuros que constituem as frutificações (picnídios), onde os picnidiósporos são

formados. Em frutos verdes, as lesões apresentam halo amarelo e, em frutos maduros, normalmente de coloração verde.

Mancha sardenta - Ocorre em frutos maduros, e é o sintoma mais importante na pós-colheita. É caracterizado por pequenas lesões de coloração parda-avermelhada, levemente deprimidas, com bordos definidos e formato irregular, e normalmente não apresenta as frutificações do patógeno.

Embora a infecção tenha ocorrido na fase de pré-colheita, frutos assintomáticos colhidos contendo infecções quiescentes podem manifestar o sintoma em fases adiantadas de maturação, às vezes, no local de destino.

Mancha virulenta - É resultado da fusão dos diferentes tipos de sintomas. Caracteriza-se pela formação de lesões grandes que podem tomar extensas áreas do fruto no decorrer do desenvolvimento. São escuras ou de coloração marrom, com ou sem frutificações, de formato irregular podendo ser deprimidas ou não. Geralmente surge no final da safra quando os frutos estão maduros, e com ocorrência de altas temperaturas.

Falsa melanose – Manifesta-se em frutos em desenvolvimento e assemelha-se a melanose dos citros causada pelo fungo *Diaporthe citri*. As lesões são pequenas, cerca de 2 mm, circundadas por pontos pequenos e escuros com aproximadamente 1 mm de diâmetro. Ao contrário da melanose, as lesões não são ásperas.

Mancha rendilhada - Ocorre em frutos imaturos na forma de lesões superficiais de textura lisa e sem bordas definidas, possui coloração marrom escura a clara, aspecto encharcado e corpos de frutificação não estão presentes. Tais lesões podem tomar todo o fruto.

Mancha trincada - Desenvolve-se em frutos ainda verdes podendo atingir desde pequenas áreas até quase a totalidade do fruto. Quando o fruto amadurece, a lesão trinca e está sempre associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*).

As folhas podem apresentar sintomas caracterizados por lesões de centro acinzentado, com bordos salientes marrom-escuros e circundados por um halo amarelo parecido com aquelas observadas nos frutos com sintomas de mancha dura. As lesões em folhas são freqüentemente observadas em tangerineira e limoeiros verdadeiros, e raramente em plantas de pomelo (GÓES, 1998; FUNDECITRUS, 2005).

### 2.1.4 Epidemiologia

Segundo Kotzé (1988), os fatores que podem afetar de modo direto a epidemiologia da pinta preta dos citros são: disponibilidade de inóculo, clima favorável à infecção, ciclo de crescimento do hospedeiro, fase de maturação do fruto em relação à suscetibilidade a infecção e eventual desenvolvimento dos sintomas.

O ciclo primário da doença é constituído pela fase sexual de *G. citricarpa*, cujas estruturas infectivas são os ascósporos, responsáveis pela introdução do patógeno na área e o início da epidemia a cada ciclo da cultura. Já o ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo (*P. citricarpa*), onde os conídios são responsáveis pelo aumento da doença na planta hospedeira e ao seu redor (KIELY, 1948; AGUILAR-VILDOSO, 2002).

Os pseudotécios, estruturas responsáveis pela formação de ascos e ascósporos, são encontrados maduros apenas em folhas caídas no solo e em fase intermediária de decomposição. A produção de ascósporos é influenciada pelas condições de temperatura e precipitação (ALCOBA et al., 2000). Os ascósporos produzidos são lançados e carregados pelo vento e assim disseminados a grandes distâncias, podendo atingir até 25 Km de distância (KLOTZ, 1973). A produção de esporos sexuais é de grande importância, pois além da capacidade de dispersão possuem maior viabilidade e tolerância ao ressecamento favorecendo a sobrevivência do patógeno no campo. No estado de São Paulo, a queda das folhas ocorre o ano todo sendo mais intensa no inverno, o que favorece a disponibilidade de inóculo (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

Os picnídios são estruturas produtoras de conídios, e tem papel na disseminação de curta distância. A sua formação ocorre principalmente em lesões de frutos maduros, bem como em folhas velhas caídas e ocasionalmente presentes em folhas novas, hastes de frutos e ramos mortos (SMITH, 1996). Os conídios emergem do picnídio através do ostíolo e estão cobertos por uma massa mucilaginosa. A mucilagem é rapidamente solubilizada e os conídios levados pela água das chuvas, irrigação ou orvalho podendo alcançar a superfície de um tecido suscetível e assim iniciar novas infecções. As folhas infectadas quando caem no solo do pomar formam novos

ascósporos, dando continuidade ao ciclo (KIELY, 1948; KOTZÉ, 1981; ROBBS; PIMENTEL; RIBEIRO, 1985).

O período crítico para infecção ocorre após a queda das pétalas e estende-se por 20-24 semanas de desenvolvimento dos frutos (BALDASSARI, 2001; BALDASSARI; REIS; GÓES, 2006). Os esporos originados sexual ou assexuadamente germinam na superfície do órgão suscetível e emitem o tubo germinativo e apressório do qual se origina o *peg* de penetração que perfura e entra através da cutícula, originando uma pequena massa de micélio entre a cutícula e a epiderme do órgão afetado. Nesta fase, o fungo pode permanecer dormente e esse período de dormência ou infecção latente é interrompido quando o fruto atinge seu tamanho final e inicia a maturação, ou quando a folha já caída entra em processo de degradação. O fungo cresce a partir do micélio subcuticular e coloniza tecidos mais internos, produzindo os sintomas típicos da doença (MCONIE, 1967; KOTZÉ, 1988). A manifestação da doença é influenciada de forma fundamental por fatores ambientais, como radiação solar intensa e altas temperaturas (KOTZÉ, 1981; KOTZÉ, 1996).

O ascósporo é a principal forma de inóculo (KOTZÉ, 2000), já o conídio é considerado secundário por não possuir mecanismo especial de liberação na atmosfera, ocorrendo em folhas em decomposição no solo, podendo alcançar frutos suscetíveis apenas por respingos de chuva. No entanto, a forma conidial é potencialmente importante como forma de inóculo quando em uma mesma planta frutos maduros infectados coabitam com frutos jovens de até seis meses de idade a contar da queda das pétalas (frutos suscetíveis). Nestas circunstâncias, os conídios formados nos frutos da estação anterior podem se disseminar para os frutos jovens (KOTZÉ, 1996; SPÓSITO, 2003).

### **2.1.5 Controle**

Existem varias medidas manejo a serem tomadas a fim de minimizar os prejuízos, tais como: utilização de mudas sadias, boas condições de nutrição e sanidade, desinfestação de veículos, máquinas e equipamentos, retirada de restos vegetais e catação de frutas temporãs infectadas, controle de ervas daninhas, utilização de quebra

ventos e irrigação nos períodos secos para evitar queda excessiva de folhas (FUNDECITRUS, 2005).

Entre as estratégias de controle da pinta preta dos citros, o emprego de fungicidas é o principal método de controle utilizado em pré e pós-colheita (GÓES, 1998). No entanto, dado ao longo período de suscetibilidade dos frutos após a queda das pétalas, por no mínimo 24 semanas (BALDASSARI; REIS; GÓES, 2006), há necessidade de várias pulverizações (até cinco), elevando significativamente o custo de controle (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005).

Os fungicidas registrados e de comprovada eficiência no controle da pinta preta dos citros restringem-se a produtos protetores à base de cobre (oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso e sulfato de cobre na forma de calda bordalesa) ou ditiocarbamatos (mancozeb e propineb). Entre os produtos sistêmicos estão os benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), além dos translaminares como as estrobirulinas (pyraclostrobin, azoxystrobin e trifloxystrobin). Os fungicidas protetores e sistêmicos podem ser aplicados isoladamente ou combinados, associados a óleo mineral ou vegetal a 0,5% (FUNDECITRUS, 2005; FEICHTENBERGER, 2007).

O controle químico da pinta preta pode variar em função do destino da produção. Quando o fruto se destina ao processamento para produção de suco, o controle pode ser realizado com um número menor de pulverizações, visto o aspecto externo dos frutos não ser restritivo. O controle deve ser iniciado logo após a queda das pétalas das flores e o número de aplicações pode variar em função do histórico da doença na área, das condições climáticas prevaletentes durante o período de desenvolvimento do fruto, da suscetibilidade do hospedeiro, e do nível de controle requerido. Em pomares para exportação ou para o mercado interno de frutas frescas, os produtos à base de cobre em mistura com óleo podem ser usados somente nas primeiras pulverizações. Nas pulverizações posteriores, é recomendada a utilização de benzimidazóis ou estrobirulinas misturadas a óleo emulsível. A restrição ao uso de fungicidas à base de cobre nas pulverizações subseqüentes deve-se ao fato dos mesmos poderem causar fitotoxicidade aos frutos, e por tornarem mais evidentes manchas, lesões e injúrias provocadas por outras causas bióticas ou abióticas (FUNDECITRUS, 2005; FEICHTENBERGER, 2007).

Devido ao risco de aquisição de resistência aos fungicidas não é recomendável realizar mais do que duas pulverizações por safra com fungicidas de mesmo grupo químico. Recomenda-se, também, que esses fungicidas sejam utilizados alternadamente, ou em misturas com produtos de contato que apresentem baixo risco de desenvolvimento de resistência pelo fungo, como os ditiocarbamatos (FUNDECITRUS, 2005; FEICHTENBERGER, 2007).

### **2.1.6 *Saccharomyces cerevisiae* como agente de biocontrole**

*S. cerevisiae* é um fungo ascomiceto unicelular com tamanho médio de 5 µm. Pode originar ascos sem a produção de ascocarpos, sendo incluída na ordem Saccharomycetales. O habitat natural desse microrganismo é a superfície de frutas, no entanto, a mesma se tornou uma das mais importantes ferramentas da biotecnologia, sendo amplamente utilizada em diferentes aplicações industriais, principalmente devido a excelente capacidade de realizar fermentações alcoólicas e gerar produtos como pão, bebidas alcoólicas e álcool combustível.

A levedura possui alta eficiência na produção de etanol, portanto, tal característica permite inibir o crescimento de organismos competidores. Além disso, são os mais tolerantes ao etanol dentre os conhecidos na natureza, podendo desenvolver-se em meios contendo até 14-16% (v/v) de etanol. Possui rápido crescimento, metabolização eficiente de açúcares, tolerância a baixos níveis de oxigênio e grandes variações de temperatura, osmotolerância e atividade celular em ambientes ácidos. Tais características são fundamentais para a sua utilização industrial e para a sua alta competitividade contra outros microrganismos (PIŠKUR et al., 2006; ANDRIETTA et al., 2007).

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



Alguns produtos comerciais à base de leveduras para o biocontrole de fitopatógenos já foram desenvolvidos, como exemplo: *Candida oleophila* – Aspire<sup>®</sup>, *Cryptococcus albidus* – Yield plus<sup>®</sup> e *Metschnikowia fructicola* – Shemer<sup>®</sup>.

*S. cerevisiae* foi pouco estudada como agente de controle biológico, no entanto, pode ser considerada um microrganismo seguro, sendo classificada como *biosafety level 1* (US Office of Health and Safety, 2008), visto não ser um patógeno humano. Além disso, não produz micotoxinas, antibióticos ou outras moléculas cuja presença não é aceitável em alimentos, como os frutos destinados ao consumo *in natura* (DROBY et al., 1991). Outra vantagem da sua utilização no controle de doenças de plantas é a melhor aceitação por parte dos consumidores, os quais possuem maior familiaridade com a levedura por ser amplamente utilizada na produção de alimentos e bebidas.

Microrganismos antagônicos podem interromper algum estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno. Isso pode ocorrer através de diversos mecanismos tais como parasitismo, competição por nutrientes e nichos de colonização, produção de enzimas degradadora de parede celular (PUNJA; UTKHEDE, 2003; VINALE et al., 2008), compostos antibióticos difusíveis em meio aquoso (WEI; YANG; STRANEY, 2005; VINALE et al., 2006) e voláteis (BRUCE et al., 2004; STROBEL, 2006). É provável que os diferentes modos de ação atuem em sinergia durante a interação antagônica.

Foi verificado em trabalho prévio que a linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*, isolada de processos fermentativos para produção de álcool, apresentou capacidade antagônica *in vitro* contra *G. citricarpa* (FIALHO, 2004). Não foi constatada a produção de substâncias inibidoras difusíveis como enzimas hidrolíticas ou toxinas em meio de cultura, mas foi demonstrado que o mecanismo de ação atuante no processo antagônico é a produção de compostos orgânicos voláteis. A produção de compostos voláteis antimicrobianos por leveduras, como mecanismo de ação, no controle de fitopatógenos ainda não havia sido relatada.

A fumigação biológica, utilizando os voláteis de *S. cerevisiae* ou misturas artificiais, poderia ser utilizada no tratamento de frutos em câmaras fechadas durante o armazenamento e transporte. Esse procedimento é mais compatível com os sistemas

de *packing house*, pois minimiza a manipulação do produto (MERCIER; JIMÉNEZ, 2004).

### **2.1.7 Compostos orgânicos voláteis**

A importância dos compostos orgânicos voláteis antimicrobianos recebeu pouca atenção quando comparado ao antagonismo causado por substâncias difusíveis (CHAURASIA et al., 2005). No entanto, recentemente uma série de novos trabalhos tem focado atenção nestes produtos do metabolismo, que se apresentam como gases ou possuem alta pressão de vapor, e que em condições normais são liberados da célula (TARKKA; PIECHULLA, 2007). Esses compostos possuem baixa massa molecular e podem pertencer a diversas classes químicas tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre (WHEATLEY, 2002).

Apesar dos avanços no conhecimento sobre os voláteis de origem microbiana, os mecanismos que governam as etapas que vão desde ao reconhecimento do volátil pelo microrganismo até a expressão da resposta não foram claramente explicados. O fenômeno de estímulo e/ou inibição do crescimento micelial e germinação de esporos fúngicos por compostos presentes na fase gasosa parece ser de caráter multifuncional, ou seja, depende de uma série de eventos somados. Apesar dos profundos efeitos causados na dinâmica das relações entre microrganismos patogênicos e não patogênicos, e destes com as plantas, as discussões tem sido meramente especulatórias (FRENCH, 1992).

O primeiro fator a ser considerado para o entendimento da vulnerabilidade de estruturas fúngicas aos compostos voláteis é a relação destas estruturas com o meio onde estão inseridos. Geralmente os fungos possuem cada uma de suas células vegetativas expostas ao meio ambiente onde vivem desenvolvendo parte do micélio e porções consideráveis dos órgãos reprodutivos no ar (FRIES, 1973). Estas características determinam uma relação superfície/volume bastante alta. A interação via aérea tem se mostrado bastante eficiente, visto que muitos compostos lipofílicos liberados diretamente no ar, podem acumular-se mais rapidamente na membrana

plasmática de uma célula receptora do que se estivesse na fase líquida (STOTZKY; SCHENCK; PAPAIVIZAS, 1976).

A atividade microbiana e os fatores ambientais estão interligados e a produção de voláteis irá depender da dinâmica de todo o ecossistema. Mecanismos químicos de controle são comuns em sistemas biológicos e interações quimicamente mediadas já foram relatadas em insetos, animais e plantas. Os compostos envolvidos nessas interações são denominados “infoquímicos”. Frequentemente, alterações nas taxas dos processos microbianos não podem ser explicadas apenas por alterações ambientais. É possível que tal fenômeno resulte de interações mediadas por “infoquímicos” voláteis (WHEATLEY, 2002).

Devido à volatilidade, estes compostos são menos suscetíveis que compostos não voláteis em solução a várias formas de inativação, tais como solvatação, sorção e alterações causadas por reações químicas que ocorrem na presença de água. Além disso, compostos se difundindo em meio líquido provavelmente estão mais expostos a concentrações elevadas de substâncias químicas inativadoras, e seu movimento será limitado pela descontinuidade do filme aquoso. Conseqüentemente, a esfera de influência (raio de difusão) de compostos voláteis é muito maior. Por todas as características apresentadas, compostos orgânicos voláteis são considerados “infoquímicos” ideais (WHEATLEY, 2002).

Tem sido demonstrado que interações entre microrganismos mediadas por voláteis podem ser neutras, positivas ou negativas para um ou mais microrganismos participantes da interação, podendo determinar a vantagem seletiva para alguns membros da comunidade. Voláteis oriundos do metabolismo secundário podem ultrapassar os limites do ambiente onde são produzidos, e interagir com um receptor sensível à apenas algumas poucas moléculas de um volátil particular, e afetar a fisiologia de um competidor ou outro membro da mesma espécie. Portanto, possuem papel importante durante a evolução dos microrganismos no contexto de comunidades, populações e dinâmica funcional (HUMPHRIS et al., 2002).

Wheatley (2002) estudou interações mediadas por voláteis entre uma ampla gama de fungos e bactérias de solo. Os resultados demonstraram que os isolados fúngicos

tiveram o crescimento micelial estimulado em até 40% ou inibido em até 60%, dependendo do isolados bacterianos.

Chuankun et al. (2004) relataram que a supressividade de solos a fungos estava fortemente correlacionada a presença de compostos orgânicos voláteis. Zou et al. (2007) também correlacionaram a atividade supressiva de solos à presença de compostos orgânicos voláteis de ação fungistática produzidos por bactérias, em especial as do gênero *Bacillus*. Solos apresentando tais isolados inibiram o crescimento micelial e a germinação de esporos dos fungos *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia*.

Os conídios de *Penicillium paneum* apresentam baixa germinação quando em suspensões muito densas. A baixa germinação nessas circunstâncias é devido à produção de um auto-inibidor de germinação volátil (1-Octen-3-ol), que também apresenta atividade sobre fungos de outros gêneros. O composto volátil é produzido pelo conídio e liberado na atmosfera a fim de inibir a germinação de conídios prematuros até que as condições ambientais apropriadas prevaleçam. Em *Penicillium* sp as estruturas produtoras de conídios são diretamente expostas ao ar. Nesse caso, um auto inibidor volátil é mais eficiente que um não volátil (CHITARRA et al., 2004).

A produção de compostos orgânicos voláteis é dependente de diversos fatores, tais como nutrientes disponíveis (BRUCE et al., 2000; EZRA; STROBEL, 2003; GARDE-CERDAN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008), organismo produtor (MACKIE; WHEATLEY, 1999; BRUCE et al., 2003; KAI et al., 2007), temperatura e pH (TRONSMO, DENNIS, 1978; GUTIERREZ, 1993; TRIVEDI; PANDEY; PALNI, 2008), e fase de crescimento (BRUCE; KUNDZEWICZ; WHEATLEY, 1996; TRIVEDI; PANDEY; PALNI, 2008; FREDLUND et al., 2004; SCHÖLLER et al., 2002).

A maioria dos estudos relacionados à atividade antimicrobiana de compostos voláteis sobre microrganismos fitopatogênicos e degradadores de madeira é voltada para *Muscodor albus* (STROBEL, 2006; GRIMME et al., 2007), *Trichoderma* spp (BRUCE et al., 2000; HUMPHRIS et al., 2002) e *Bacillus* spp (BRUCE et al., 2004; LEELASUPHAKUL; HEMMANEEA; CHUENCHITT, 2008).

A utilização do fungo endofítico *M. albus*, um reconhecido produtor de compostos voláteis bioativos, ou da sua mistura artificial de voláteis, demonstrou ser promissora no

combate a uma ampla gama de patógenos fúngicos e bacterianos de plantas e humanos (STROBEL et al., 2001; WORAPONG et al., 2001), fitopatógenos associados ao solo (STINSON et al., 2003a; MERCIER; MANKER, 2005), patógenos de frutos na pós-colheita (MERCIER; JIMÉNEZ, 2004; MERCIER; SMILANICK, 2005; SCHNABEL; MERCIER, 2006), fungos em sementes armazenadas (EZRA; STROBEL, 2003), insetos-praga (LACEY; HORTON; JONES, 2008), fitonematóides (GRIMME et al., 2007; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008) e mofo tóxico em prédios e materiais de construção (MERCIER; JIMÉNEZ, 2007).

### **2.1.8 Biofumigação**

Diversos tipos de fungicidas sintéticos têm sido utilizados no intuito de prevenir o desenvolvimento de doenças em plantas, a despeito de muitos serem classificados como potencialmente carcinogênicos pela EPA (agência norte americana de proteção ambiental), e serem tóxicos para a vida selvagem e organismos não alvo. Fatos esses que irão trazer diversas restrições e limitações ao seu uso no futuro. Um exemplo é o uso de brometo de metila, um composto biocida, na esterilização de solo e no controle de pestes em pós-colheita. Em virtude da sua alta toxicidade e efeito deletério sobre a camada de ozônio, o seu uso já não é mais tolerado. Isso torna o uso de produtos fungistáticos de origem natural uma alternativa atraente no intuito de substituir não apenas o brometo de metila, mas também outros fungicidas sintéticos (STROBEL et al., 2004).

Uma gama limitada de fungicidas e fungistáticos têm uso permitido na pós-colheita, e apenas para algumas poucas *commodities*. Essa limitação é em decorrência do nível residual nos produtos tratados ser de forma geral mais elevado quando comparado ao tratamento em pré-colheita. Tal fato se deve primariamente ao curto período de tempo decorrido entre a aplicação e o consumo. Nas poucas circunstâncias em que fungicidas podem ser utilizados em pós-colheita, frutos ou vegetais são tratados através de aspersão, imersão ou ainda o fungicida pode ser aplicado associado à cera (STROBEL et al., 2004). A mistura contendo fungicida é recirculada diversas vezes elevando-se consideravelmente o nível de sujeiras, esporos fúngicos e outros materiais

durante todo o processo. O processo de aplicação é caro, demanda muito tempo e interrompe o fluxo do produto no armazenamento (SONG et al., 2000).

A aquisição de resistência por parte de fitopatógenos e os riscos à natureza e saúde humana inerente a utilização de fungicidas (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008), contribuiu para a intensificação de pesquisas relacionadas a métodos alternativos de controle que eventualmente levaram ao registro de biofungicidas como o Aspire<sup>®</sup> e Biosave<sup>®</sup> para o uso na pós-colheita nos EUA (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). Leveduras e bactérias antagonistas são empregadas como biofungicidas primariamente para colonizar e proteger ferimentos presentes na superfície de frutos resultando na exclusão ou inibição de fitopatógenos (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). No entanto, agentes de biocontrole geralmente tem a desvantagem de carecer de atividade curativa, e seu estabelecimento pode ser negativamente afetado pelo ambiente físico e químico do local a ser colonizado (MERCIER; WILSON, 1995; BROWN; DAVIS; CHAMBERS, 2000).

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

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

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

### **2.1.9 Enzimas associadas à morfogênese**

A forma e integridade celular são dependentes da parede celular, uma estrutura complexa que possui tipicamente como principais componentes em sua composição os polissacarídeos quitina e glucana. A quitina ocorre como polímero fibrilar de  $\beta(1,4)$ -N-acetil-D-glucosamina e a glucana é formada por monômeros de glicose  $\beta(1,3)$ - e  $\beta(1,6)$ -ligados (GOODAY, 1995). Durante o crescimento normal, a quitinase (EC 3.2.1.14) degrada a quitina presente na ponta da hifa, com concomitante inserção de oligômeros de quitina através da quitina sintetase (CABIB, 1987). A atividade da glucanase (EC 3.2.1.39) ocorre em todos os estágios do ciclo de vida do fungo, incluindo autólise (MCNEIL et al., 1998). Na extensão da hifa,  $\beta$ -glucanases e  $\beta$ -glucana sintetases atuam em conjunto inserindo oligômeros de glucana na parede celular em crescimento (GOODAY, 1995). Portanto, quitinases e  $\beta$ -glucanases tem papel primordial na quebra e reconstrução das ligações dos polímeros, levando ao remodelamento da parede celular em processos de divisão celular e morfogênese, tais como crescimento e ramificação das hifas, diferenciação e germinação de esporos, e autólise (ADAMS, 2004; GOODAY; ZHU; O'DONNELL, 1992).

Tirosinases (EC 1.14.18.1), também denominadas polifenoloxidasas, possuem atividade monofenolase que consiste na hidroxilação de monofenóis a *o*-difenóis, e em seguida esta mesma enzima promove a oxidação de *o*-difenóis a *o*-quinonas (atividade difenolase). A tirosinase está diretamente envolvida na biosíntese de melanina, pigmento que constitui um mecanismo de defesa e resistência a fatores estressantes

como radicais livres, radiações UV e gama, desidratação, temperaturas extremas e contribui para a resistência da parede celular contra enzimas hidrolíticas. A melanina também está envolvida na formação e estabilidade dos esporos, e nos mecanismos de defesa e virulência (BELL; WHEELER, 1986).

A lacase (EC 1.10.3.2) é amplamente distribuída em plantas e fungos, e nos últimos anos tem sido relatada em bactérias, embora provavelmente não seja uma lacase típica. Essa enzima, ao contrário da tirosinase, não possui atividade monofenolase e em uma reação característica para a enzima um substrato fenólico sofre oxidação gerando um ariloxiradical. Esta espécie ativa é convertida a quinona em uma segunda etapa oxidativa (DURAN et al., 2002). Em fungos e leveduras, a lacase está envolvida na morfogênese, na interação planta-patógeno, defesa contra estresse, resistência a fungicidas e degradação da lignina (BALDRIAN, 2006).

### **2.1.10 Estresse oxidativo**

Durante o metabolismo celular normal, principalmente na cadeia respiratória ou reações catalisadas por oxidases, são geradas espécies ativas de oxigênio (EAOs), as quais incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^{*-}$ ), radicais hidroxila ( $OH^*$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) (SCANDALIOS, 2005). Estas substâncias altamente reativas são danosas à célula em virtude de causarem oxidação de proteínas, quebras na cadeia de DNA, distúrbios na homeostase intracelular de íons cálcio e peroxidação de lipídeos da membrana plasmática (AGUIRRE et al., 2005).

Para se defender, as células possuem mecanismos antioxidativos enzimáticos e não enzimáticos que mantêm a concentração dessas substâncias em níveis basais não destrutivos. Quando os níveis de EAOs são muito elevados, ultrapassando a capacidade antioxidativa da célula, desencadeia-se o estresse oxidativo. Fatores externos indutores desse estresse incluem exposição à radiação ionizante, substâncias que atuam em reações redox, metais pesados, extremos de temperatura, estresse mecânico, entre outros (ANGELOVA et al., 2005). Durante a interação com as plantas, fitopatógenos também podem ser expostos aos efeitos das EAOs que são rapidamente liberados pelas plantas, como uma das respostas iniciais de defesa na interação



patógeno/hospedeiro. As EAOs podem ter uma atividade antimicrobiana direta e/ou podem sinalizar a ativação dos mecanismos latentes de defesa vegetal (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Os mecanismos antioxidativos não enzimáticos englobam moléculas como a glutathiona, ascorbato, tocoferol, flavonóides, alcalóides e carotenóides. Por sua vez, os mecanismos antioxidativos enzimáticos incluem glutathiona redutases (GR), glutathiona-S-transferases (GST), peroxidases, tais como glutathiona peroxidases (GPx), além de superóxido dismutases (SOD) e catalases (CAT), sendo as duas últimas, enzimas chaves na detoxificação do  $O_2^{*-}$  e  $H_2O_2$ , respectivamente (APEL; HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2005). A Figura 1 ilustra os mecanismos de formação e de detoxificação das EAOs na célula.

As SODs (EC 1.15.1.1) são metaloproteínas que catalisam a oxidação do  $O_2^{*-}$  com concomitante redução de íons hidrogênio à  $H_2O_2$  e oxigênio molecular como representado na reação abaixo:



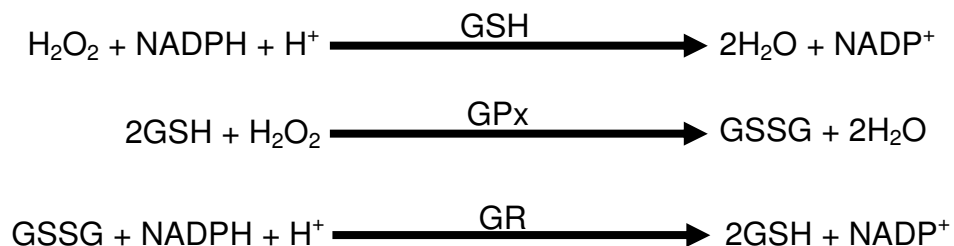
Os fungos podem possuir dois tipos de SODs, sendo que uma possui manganês em seu sítio ativo (Mn SOD) e está presente na matriz mitocondrial, e a outra possui cobre e zinco (Cu, Zn SOD), sendo citoplasmática. A SOD é uma enzima chave no mecanismo antioxidativo por ser a primeira a atuar e por interferir nas concentrações de  $O_2^{*-}$  e  $H_2O_2$ , os dois substratos da reação de Haber-Weiss responsável pela formação de  $OH^*$ . Os radicais hidroxila são as EAOs mais reativas e danosas, no entanto, as células não possuem mecanismos de detoxificação conhecidos para esses radicais, portanto, a única maneira de evitar os seus efeitos é controlar as reações que levam a formação dos mesmos (APEL; HIRT, 2004; ANGELOVA et al., 2005).

A CAT (EC 1.11.1.6) é uma metaloproteína constituída por quatro grupos heme, responsável pela conversão do  $H_2O_2$  à  $H_2O$  e oxigênio como representado na reação abaixo:



Está presente nos peroxissomos onde ocorrem reações geradoras de  $H_2O_2$ , tais como a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. Essa enzima desempenha papel fundamental na prevenção da formação de  $OH^*$ , complementando a ação da SOD na resposta antioxidativa ao converter  $H_2O_2$  a produtos estáveis (APEL; HIRT, 2004; ANGELOVA et al., 2005).

O tripeptídeo glutationa ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) é uma das moléculas antioxidantes mais importantes no combate as EAOs, em especial  $H_2O_2$ . A glutationa pode reagir com oxidantes não enzimaticamente, ou a reação pode ser catalisada pela GPx. A forma oxidada da glutationa (GSSG) pode ser reciclada pela GR. As reações estão representadas abaixo:



A enzima GR (EC 1.6.4.2) contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD), transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutationa oxidada para a glutationa reduzida. O papel da GR é manter o equilíbrio GSH/GSSG na célula, já que a GSH é uma molécula que mantém a célula no seu estado reduzido, sendo, portanto um importante agente antioxidante (STEPHEN; JAMIESON, 1996).

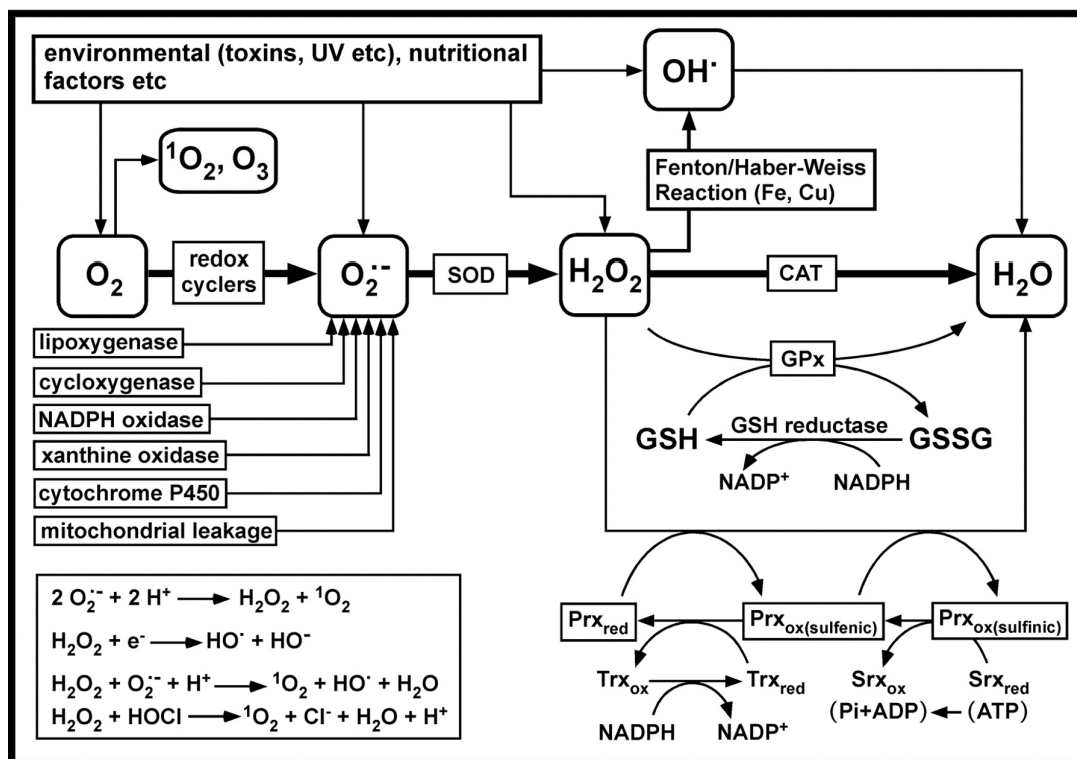


Figura 1 - Mecanismos de formação de EAOs e de detoxificação enzimática do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio: As EAOs são formadas por excitação ( $O_3$  e  ${}^1O_2$ ) ou através de reações de redução ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$  e  $H_2O_2$ ). O ânion superóxido pode ser gerado enzimaticamente ou não, e pode reagir com ele mesmo ou outro radical, enquanto  $H_2O_2$  reage com centros ferro/enxofre e cisteínas de certas proteínas. Entretanto,  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$  podem formar espontaneamente  ${}^1O_2$  (oxigênio singleto) e  $OH^{\cdot}$  (radicais hidroxila), os quais são muito mais reativos e destrutivos. As principais reações geradoras dessas espécies são apresentadas. O ânion superóxido é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) e o  $H_2O_2$  é decomposto pelas catalases (CAT), peroxidases, tais como glutathiona peroxidases (GPx) e pelas peroxiredoxinas (Prx). O grupo tiol de cisteínas em Prx é oxidada a ácido Cys-sulfenico (Prx<sub>ox</sub>) e é reduzido pela tioredoxina (Trx<sub>red</sub>). O ácido Cys-sulfenico na Prx<sub>ox</sub> pode ser oxidada mais tarde pelo  $H_2O_2$  a ácido Cys-sulfinico que é reduzido novamente a ácido Cys-sulfenico pela sulfiredoxina reduzida (Srx<sub>red</sub>) e ATP (GEORGIU et al., 2006)

### 2.1.11 Proteômica

Proteômica é definida como a análise sistemática das proteínas expressas pelo genoma da célula, tecido ou organismo e permite medir qualitativamente e quantitativamente um grande número de proteínas que podem influenciar a bioquímica celular. Desta forma pode fornecer uma análise acurada do estado celular ou as mudanças celulares durante o crescimento, desenvolvimento e resposta a fatores ambientais sendo, portanto, considerada uma tecnologia chave para o estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e complexos (CHEN; HARMON, 2006).

Após a aquisição da seqüência genômica completa de 25 fungos, o maior desafio na biologia moderna de fungos “Era pós-genômica” é entender a expressão, função e regulação do conjunto de proteínas codificadas pelo genoma. A proteômica complementa outras abordagens genômicas, incluindo a transcriptômica, que avalia a mudança global da expressão gênica em nível de RNA mensageiro. No entanto, a proteômica é uma técnica mais realista já que as proteínas são diretamente relacionadas à função (ou fenótipo) (BHADOURIA et al., 2007).

A identificação de proteínas diferencialmente expressas entre duas amostras com características fenotípicas contrastantes é uma das abordagens comumente adotadas na proteômica. A separação das proteínas por eletroforese bidimensional é vantajosa por conferir uma visão global do proteoma de um determinado tecido ou célula e permitir a pré-separação das proteínas através ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM). Por sua vez, a espectrometria de massas permite a identificação das proteínas através da comparação das massas e seqüências dos peptídeos gerados através de digestão enzimática, com seqüências de proteínas depositadas em bancos de dados.

As informações geradas através da proteômica são valiosas para o entendimento dos processos envolvidos na patogênese, colonização e nas interações entre microrganismos na natureza.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Fungo fitopatogênico e levedura antagonista

O fitopatógeno *Guignardia citricarpa*, isolado a partir de lesões em frutos de laranja, foi mantido em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA: Infusão de 200 g L<sup>-1</sup> de batata, 20 g L<sup>-1</sup> de dextrose e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar) a 26 °C, sob luz fluorescente e fotoperíodo de 12h.

Foi utilizada como antagonista a linhagem CR-1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, isolada de processos fermentativos para produção de etanol, e caracterizada através de cariotipagem eletroforética e mantida na coleção de leveduras do Laboratório de Bioquímica e Fermentação Alcoólica do Departamento de Ciências Biológicas da Esalq/USP em Piracicaba-SP. A levedura foi mantida em meio *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar* (YEPDA: 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g L<sup>-1</sup> de peptona, 20 g L<sup>-1</sup> de dextrose e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar) a 32 °C.

### 2.2.2 Efeito do meio de cultivo na produção de compostos orgânicos voláteis por *S. cerevisiae*

Foram testados diferentes meios suplementados com diferentes fontes de carbono para o cultivo da linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*:

Meio de batata: Infusão de 200 g L<sup>-1</sup> de batata, 20 g L<sup>-1</sup> de uma das fontes de carbono (glicose “Dextrose” [BDA], sacarose, maltose ou galactose) e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar;

Meio de aveia: 40 g L<sup>-1</sup> de aveia em flocos e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar (opcionalmente glicose 20 g L<sup>-1</sup>);

Meio extrato de malte: 25 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar;

Meio *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar* (YEPDA): 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g L<sup>-1</sup> de peptona, 20 g L<sup>-1</sup> de dextrose e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Foram utilizadas placas de poliestireno disponíveis comercialmente (60 mL de volume), divididas ao meio. Em um dos lados da placa, a levedura foi cultivada em 10 mL dos diferentes meios através do espalhamento de 50 µL da suspensão celular (10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>). No lado oposto, contendo 10 mL do meio BDA, foi transferido um disco de

meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. O controle era constituído por placas contendo o patógeno na ausência da levedura. As placas foram vedadas e mantidas a 26 °C sob fotoperíodo de 12h, sendo utilizadas quatro repetições para cada meio de cultivo avaliado. A avaliação do crescimento micelial foi realizada através da média entre duas medições diametralmente opostas, quando a colônia das placas controle atingiu os bordos.

### **2.2.3 Identificação dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* através de SPME-GC-MS**

A identificação foi realizada no Laboratório de Cromatografia Gasosa do Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNICAMP, sob supervisão do Prof. Dr. Fábio Augusto.

Processo de extração: A levedura foi cultivada através do espalhamento de 100 µL da suspensão celular ( $10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) em meio BDA, contido em tubos cônicos de polietileno de 50 mL selados com septo de silicone e incubados a 26 °C durante 6 dias. Para as extrações foram utilizadas fibras SPME (*Solid Phase Microextraction*) (Supelco Inc., Bellefonte, PA – USA) recobertas com 50/30 µm divinilbenzeno / polimetilsiloxano / carboxen (DVB/PDMS/CAR) ou 85 µm poliacrilato (PA). Após o período de crescimento da cultura, os tubos selados foram incubados durante 5 min a 30 °C para se obter o equilíbrio entre a levedura, meio de cultivo e a fase gasosa. Logo em seguida, a fibra SPME foi inserida no tubo através do septo e exposta a fase gasosa por 15 min e levada até um cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massa (GC-MS) para dessorção dos analitos (tempo de dessorção = 3 min), separação e detecção. Tubos contendo apenas meio BDA foram utilizados como controle, permitindo a distinção entre as espécies voláteis produzidas pela levedura daquelas oriundas do próprio meio de cultivo ou que já estivessem presentes na atmosfera.

Condições cromatográficas: Foi empregado um cromatógrafo a gás HP-5890 (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA) equipado com um detector seletivo de massa HP-5973, uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e um injetor *split-splitless*. O injetor foi operado no modo *splitless* em todas as corridas

cromatográficas e hélio grau 5.0 foi utilizado como gás carreador. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o detector a 280 °C. A programação de temperaturas foi a seguinte: 40 °C por 5 min seguido de aumento de 3 °C/min até atingir 100 °C e então aumento de 20 °C/min até atingir 250 °C. O espectro de escaneamento do MS foi ajustado entre 35 e 350. A identificação dos picos foi realizada usando-se *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System* (AMDIS) v. 2.63 software e o *Mass Spectral Search Program* NIST v. 1.7 (NIST, Washington - DC, USA). A identificação das espécies detectadas foi feita através da comparação com a biblioteca de espectros de massa e confirmada adicionando-se padrões comerciais às amostras. Corridas preliminares também foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP-6850 (Agilent, Wilmington, DE, USA) equipado com um detector ionizador de chama (FID), uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e um injetor *split-splitless*. Exceto para a temperatura do FID (300 °C), as demais condições foram idênticas às análises em CG-MS.

## **2.2.4 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o crescimento micelial e síntese de proteínas**

### **2.2.4.1 Efeito sobre o crescimento micelial**

A partir dos resultados obtidos na análise da atmosfera gasosa produzida por *S. cerevisiae* através de SPME-GC-MS (Figura 5 e Tabela 2, p. 53) foi produzida uma mistura artificial de compostos orgânicos voláteis utilizando padrões disponíveis comercialmente. A mistura continha todos os componentes positivamente identificados (picos 1 a 7, com exceção do pico 2). A concentração de cada composto presente na mistura foi baseada na sua proporção relativa (%), estimada através da área em relação a todos os outros componentes da mistura.

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionada assepticamente uma membrana de celulose semipermeável (5 x 5 cm) e sobre esta, um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. As placas foram vedadas e mantidas a 26 °C sob fotoperíodo de 12h. Decorridos 5 dias foi

adicionado em um algodão 40  $\mu\text{L}$  ( $0,8 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar) da mistura artificial, e as placas novamente vedadas e mantidas por mais 3 dias. O controle consistia em placas contendo o patógeno, onde não houve adição da mistura artificial. A avaliação do crescimento micelial foi realizada diariamente, através da média entre duas medições diametralmente opostas.

Ao final de três dias de exposição aos voláteis, o micélio desenvolvido sobre a membrana semipermeável foi coletado, pesado e armazenado a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de proteínas. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por três placas.

#### **2.2.4.2 Efeito sobre a síntese de proteínas**

A extração das proteínas solúveis do micélio obtido conforme o item 2.2.4.1 foi realizada através de maceração do micélio na presença de nitrogênio líquido, seguido pela adição de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA e 3 mM de ditiotreitol, na proporção de 5 mL  $\text{g}^{-1}$  de micélio fresco. O material foi centrifugado a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 45 min a 15000  $g$ . O sobrenadante constituiu o extrato proteico que teve a concentração de proteínas determinada segundo Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (ASB) como padrão. Para efeito de comparação entre o tratamento controle e o tratamento com voláteis, os resultados foram expressos em mg de proteína por  $\text{g}^{-1}$  de micélio fresco.

#### **2.2.4.3 Determinação dos valores de $\text{MIC}_{50}$ e $\text{MIC}_{100}$ da mistura artificial de voláteis**

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa contendo, 10 mL de meio BDA, foi transferido um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. No lado oposto, foi adicionado em um algodão, diferentes volumes da mistura artificial. As concentrações finais foram 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 e  $2,4 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar. O controle consistia em placas contendo o patógeno na ausência da mistura artificial. As placas foram vedadas e mantidas a  $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$  sob fotoperíodo de 12h. A avaliação do crescimento



micelial foi realizada através da média entre duas medições diametralmente opostas, quando a colônia das placas controle atingiu os bordos. Ao término do experimento os discos de micélio foram transferidos para placas contendo meio BDA na ausência da mistura artificial, para se verificar a viabilidade do fitopatógeno. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento.

### **2.2.5 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a taxa respiratória**

A quantificação da produção de CO<sub>2</sub> foi realizada no Laboratório de Pós-Colheita, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Ângelo Jacomino.

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um lado da placa foi adaptado um septo de borracha para coleta da atmosfera. No lado oposto da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi transferido um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. As placas foram vedadas e mantidas a 26 °C sob fotoperíodo de 12h. Decorridos 5 dias foi adicionado no lado oposto da placa 24 µL (0,48 µL mL<sup>-1</sup> de ar; dose correspondente ao MIC<sub>50</sub>) da mistura artificial em um algodão. As placas foram novamente vedadas e mantidas por mais 3 dias. O controle consistiu em placas contendo o patógeno, na ausência da mistura artificial.

Para determinar a concentração de CO<sub>2</sub> oriundo da respiração do fungo, amostras de 1 mL foram coletadas da atmosfera das placas através do septo de borracha com auxílio de uma microseringa. As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás Thermo Electron Trace 2000 GC equipado com detector de ionização de chama (FID) a 250 °C, injetor a 100 °C, coluna empacotada Porapack N (4 m) regulada a 100 °C, tendo hidrogênio como gás de arraste (39,1 mL min<sup>-1</sup>) e metanador ajustado a 350 °C. O tempo de corrida foi de 2 min e CO<sub>2</sub> na concentração de 2006 ppm foi utilizado como padrão. A concentração de CO<sub>2</sub> foi expressa em mL de CO<sub>2</sub> produzido por cm<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de crescimento micelial. Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento.

## **2.2.6 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a atividade de enzimas**

### **2.2.6.1 Tratamento e obtenção do micélio**

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionada assepticamente uma membrana de celulose semipermeável (5 x 5 cm) e sobre esta, um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. As placas foram vedadas e mantidas a 26 °C sob fotoperíodo de 12h. Decorridos 5 dias foi adicionado um algodão contendo 24 µL (0,48 µL mL<sup>-1</sup> de ar) da mistura artificial. O controle consistia na placa contendo o patógeno onde não houve adição da mistura artificial. O micélio desenvolvido sobre a membrana semipermeável foi coletado após diferentes períodos de exposição aos voláteis (24, 48 e 72h), sendo utilizado cinco placas por repetição, três repetições por tratamento. O micélio foi pesado e armazenado a -20 °C. O extrato protéico foi obtido conforme descrito no item 2.2.4.2 e a concentração de proteínas determinada segundo Bradford (1976), utilizando-se ASB como padrão. Os extratos protéicos foram utilizados nas análises enzimáticas e SDS-PAGE.

### **2.2.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)**

A metodologia de eletroforese em sistema desnaturante (LAEMMLI, 1970) foi utilizada para análise do perfil protéico das amostras. Foi utilizado poliacrilamida a 10% para o gel de separação, e 4% para o gel de empilhamento. As amostras (20 µg de proteína) foram preparadas na proporção de 1:1 (v/v) em tampão de amostra contendo SDS e β-mercaptoetanol, e aquecidas durante 5 min em água fervente. A eletroforese foi conduzida a 4 °C utilizando corrente constante (15 mA/placa), durante aproximadamente 2h. Após a corrida, procedeu-se a coloração das proteínas com *coomassie brilliant blue* R-250 0,1% (m/v) em metanol/ácido acético/água (5:2:5, v/v/v), por um tempo mínimo de 3h. Após este período, o gel foi lavado com água destilada e colocado em solução descorante de etanol/ácido acético/água (5:2:5, v/v/v), até a visualização das bandas de proteínas.

### **2.2.6.3 Determinação da atividade de enzimas associadas à morfogênese**

#### **2.2.6.3.1 Atividade da quitinase**

A atividade da quitinase foi avaliada utilizando-se como substrato quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta *CM-chitin-RBV* (STANGARLIN; PASCHOLATI; LABATE, 2000). Para tanto, 0,2 mL do extrato protéico foi adicionado a 0,6 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) e 0,2 mL do substrato *CM-chitin-RBV* 4 mg mL<sup>-1</sup>. Após 2h de incubação a 40 °C, a reação foi paralisada pela adição de 0,2 mL de HCl 1 M, seguido de resfriamento e centrifugação a 10000 g durante 5 min. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada contra branco apropriado e a atividade enzimática específica expressa em unidades de absorbância h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

#### **2.2.6.3.2 Atividade da β-1,3-glucanase**

A atividade foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada do substrato laminarina. O reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) foi utilizado para a dosagem dos açúcares redutores liberados, conforme descrito por Miller (1959). A mistura da reação continha 0,15 mL de laminarina (4 mg mL<sup>-1</sup>) em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 0,1 mL do extrato protéico (ABELES; FOENCE, 1970). Após incubação durante 2h a 40 °C, a reação foi paralisada através da adição de 0,125 mL do reagente ADNS, e a solução foi aquecida em banho de água fervente por 5 min. Após o resfriamento em gelo, o volume da solução foi completada para 1,5 mL com água destilada, homogeneizada e determinada a absorbância a 540 nm, contra branco apropriado. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão de glicose, e a atividade enzimática específica foi expressa em mg de glicose liberada h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

### 2.2.6.3.3 Atividade da lacase

A atividade de lacase foi determinada a 30 °C utilizando-se uma mistura de reação contendo 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 5,0), 0,1 mL de siringaldazina (1 mg mL<sup>-1</sup>) em etanol e 0,6 mL do extrato proteico. A oxidação da siringaldazina foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 525 nm após 10 min de reação. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de siringaldazina por min, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,5 x 10<sup>4</sup>/mol/cm para a siringaldazina oxidada. A atividade enzimática específica foi expressa em mU mg<sup>-1</sup> de proteína (SZKLARS et al., 1989).

### 2.2.6.3.4 Atividade da tirosinase

Espectrofotometria: A reação foi conduzida a 25 °C utilizando mistura de reação contendo 0,650 mL de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) 5 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,5) e 0,1 mL de extrato protéico. A formação de dopaquinona como resultado da oxidação da L-DOPA foi monitorada durante 5 min a 475 nm.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a variação da absorbância em 0,001 por min a 475 nm nas condições de ensaio. A atividade enzimática específica foi expressa em U mg<sup>-1</sup> de proteína.

PAGE nativo: Para a eletroforese em condições não desnaturantes foi utilizada poliacrilamida a 10% para o gel de separação e 4% para o gel de empilhamento. Os tampões foram preparados conforme descrito por Laemmli (1970). Foram aplicados aos géis 20 μg de proteína por canaleta e a eletroforese conduzida a 4 °C, durante aproximadamente 4h sob corrente de 100V. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes (15 min) em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,5) e em seguida imersos no mesmo tampão na presença de L-DOPA 10 mM e mantidos sob agitação no escuro até o surgimento das bandas, sendo posteriormente lavados em água destilada e fixados em ácido acético 7%.

#### **2.2.6.4 Determinação da atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo**

A determinação das atividades enzimáticas foi realizada no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo.

##### **2.2.6.4.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade SOD foi determinada pelo método PAGE nativo, conforme descrito anteriormente e, a revelação da atividade em gel foi realizada lavando-se os géis em água destilada, sendo incubados no escuro por 30 min em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,8) contendo EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, NBT (*Nitro blue tetrazolium*) 0,1 mM e TEMED 0,3%. Em seguida, os géis foram lavados em água destilada e expostos à iluminação até o surgimento das bandas e então fixados com ácido acético 7%. Como padrão foi utilizado SOD de fígado bovino (2 unidades) (GUELF1 et al., 2003).

##### **2.2.6.4.2 Atividade da catalase (CAT)**

Foi avaliada espectrofotometricamente conforme descrito por Beers e Sizer (1952) a 25 °C utilizando uma mistura contendo 1,450 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,036% em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), sendo a reação iniciada pela adição de 0,05 mL do extrato protéico. A redução da absorbância a 240 nm, resultante da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi monitorada durante 1 min. A atividade enzimática específica foi expressa em unidades (U) mg<sup>-1</sup> de proteína sendo uma unidade (U) correspondente à decomposição de 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min nas condições de ensaio.

#### **2.2.6.4.3 Atividade da glutathiona redutase (GR)**

A atividade da glutathiona redutase foi determinada como descrito por Azevedo et al. (2002) com modificações, a 30 °C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo DTNB (2-ácido nitrobenzóico) 1 mM, GSSG (glutathiona oxidada) 1 mM e NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 0,05 mL do extrato protéico. A redução da glutathiona oxidada foi monitorada a 412 nm durante 1 min. Os valores de atividade específica foram expressos em U mg<sup>-1</sup> de proteína, onde uma unidade (U) corresponde a 1 µmol de GSSG reduzida por min nas condições de ensaio.

#### **2.2.7 Análise proteômica**

A análise do proteoma foi realizada no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Alberto Labate.

##### **2.2.7.1 Obtenção do micélio e extração de proteínas**

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionada assepticamente uma membrana de celulose semipermeável (5 x 5 cm) e sobre esta, um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. As placas foram vedadas e mantidas a 26 °C sob fotoperíodo de 12h. Decorridos 5 dias foi adicionado em um algodão 24 µL (0,48 µL mL<sup>-1</sup> de ar; dose correspondente ao MIC<sub>50</sub>) da mistura artificial, e as placas novamente vedadas e mantidas por mais 12h. O controle consistia em placas contendo o patógeno, onde não houve adição da mistura artificial. O micélio desenvolvido sobre a membrana semipermeável foi coletado, pesado e armazenado a -20 °C. Foram utilizadas três repetições por tratamento sendo cada repetição constituído por cinco placas.

Para extração das proteínas, o micélio foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido. O material foi homogenizado com 15 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10% e 2-mercaptoetanol 0,07% em acetona. As proteínas foram precipitadas por 1h a -20 °C e em seguida realizada a centrifugação a 16000g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 15 mL de acetona contendo 2-mercaptoetanol 0,07% e deixado em repouso por mais 1h a -20 °C. O material foi novamente centrifugado a 16000g por 15 min, o sobrenadante removido e o processo repetido mais duas vezes, sendo posteriormente o precipitado protéico seco e adicionado 1 mL da solução de solubilização constituída por uréia 7 M, tiouréia 2 M, Triton-X 100 0,4% (v/v), CHAPS 4% (m/v) e DTT (*dithiothreitol*) 50 mM. Foi realizada uma nova centrifugação a 5000g e o sobrenadante recolhido. A concentração de proteínas foi determinada segundo Bradford (1976), utilizando ASB como padrão.

### **2.2.7.2 Eletroforese bidimensional (2D)**

Para a focalização isoeétrica (primeira dimensão) foi utilizada 750 µg de proteínas solubilizadas em solução Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), uréia 7 M, tiouréia 2 M, Triton-X 100 0,4% (v/v), CHAPS 2% (m/v), DTT 70 mM, anfólito 0,8% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 não-linear; Amersham GE Healthcare) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). A solução foi submetida à sonicação (50 kHz) e agitação para favorecer a solubilização completa, e então centrifugada a 8000g durante 5 min a 20 °C. Em seguida, a solução foi aplicada sobre fitas com acrilamida desidratada (IPG 18 cm, gradiente de pH 3-10 não-linear; Amersham GE Healthcare) e sobre estas, foi acrescentado 1,2 mL de óleo mineral. As fitas IPG foram reidratadas no aparato para a focalização isoeétrica (IPGphor, Amersham GE Healthcare) durante 12h a 20 °C. A focalização foi constituída pelas seguintes etapas: 100, 200, 400, 700 e 1.000V (1h cada etapa), 5.000V durante 10h, e finalmente 8.000V até atingir 80.000V acumulados. Após a focalização isoeétrica, as fitas foram lavadas com água deionizada e armazenadas a -80 °C.

A segunda dimensão da eletroforese foi feita em um gel vertical homogêneo de acrilamida (180x160x1mm), conforme modificação do descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado com acrilamida-bisacrilamida na concentração final de 12,5% (m/v).

As fitas foram equilibradas durante 10 min em solução de equilíbrio composta por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e DTT 2% (m/v). Em seguida, as fitas foram transferidas para outra solução constituída por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), iodoacetamida 2,5% (m/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v), e mantidas por mais 10 min no escuro. Depois de equilibradas, as fitas IPG foram posicionadas sobre o gel de poliacrilamida e cobertas com solução de agarose 0,5% (m/v) em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% m/v). A corrida foi realizada a 4 °C utilizando-se amperagem constante (16 mA/gel). Após a eletroforese os géis foram colocados em solução fixadora por 1h (ácido acético 10% [v/v], etanol 40% [v/v]), e corados durante 24h utilizando *coomassie blue* coloidal (sulfato de amônio 8% [m/v], ácido fosfórico 0,8% [v/v], *coomassie brilliant blue* G-250 0,08% [m/v], metanol 20% [v/v]). Os géis foram lavados em água destilada para remoção do excesso de corante e as imagens adquiridas através do equipamento UTA-1100 scanner e software Labscan v 5.0 (GE Amersham Bioscience). Para a análise das imagens foi utilizando o software Image Master Platinum v 5.0 (GE Amersham Bioscience). Para cada tratamento analisado, a media do volume do spot de cada repetição foi determinada, seguido pela normalização (volume individual de cada *spot*/ volume total dos *spots* x100). Os volumes normalizados (% vol) dos *spots* correspondentes oriundos dos diferentes tratamentos foram comparados para estimar a expressão diferencial das proteínas. Os volumes dos *spots* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas através de significância usando o teste student's t-test ( $p \leq 0,05$ ).

## **2.2.8 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre outros organismos**

### **2.2.8.1 Efeito sobre fungos e bactérias**

Diversos fungos e bactérias (Tabela 1) foram expostos aos compostos orgânicos voláteis e o crescimento avaliado. Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa contendo, 10 mL de meio BDA, foi transferido um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fungo, ou a bactéria foi estriada. No lado oposto, foi adicionado em um



algodão 100  $\mu\text{L}$  ( $2 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar) da mistura artificial. O controle consistia na placa contendo o patógeno na ausência dos voláteis. As placas foram vedadas e mantidas a 26 °C sob fotoperíodo de 12h. A avaliação do crescimento micelial foi realizada através da média entre duas medições diametralmente opostas, quando a colônia das placas controle atingiu os bordos. No caso das bactérias, a inibição foi avaliada verificando-se a formação ou não de colônias após 5 dias de exposição aos voláteis. Ao término do experimento, os discos de micélio ou as culturas bacterianas foram transferidas para placas contendo meio BDA na ausência da mistura artificial, a fim de verificar a viabilidade. Foram utilizadas cinco repetições por organismo avaliado.

Tabela 1 - Relação de fungos e bactérias expostos à mistura artificial de voláteis identificados em *S. cerevisiae*

Microrganismo	Cultura	Microrganismo	Cultura
<i>Alternaria alternata</i>	Citros	<i>Penicillium italicum</i>	Citros
<i>Aspergillus niger</i>	Citros	<i>Phoma sp</i>	Citros
<i>Botrytis cinerea</i>	Morango	<i>Phomopsis citri</i>	Citros
<i>Cladosporium sp</i>	Citros	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Citros
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Citros	<i>Rhizoctonia solani</i>	Tomate
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Feijão	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Morango
<i>Fusarium oxysporum</i>	Feijão	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Feijão
<i>Fusarium sp</i>	Citros	<i>Trichoderma sp</i>	Eucalipto
<i>Geotrichum candidum</i>	Citros	<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Guignardia citricarpa</i>	Citros	<i>Erwinia caratovora</i>	Batata
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Citros	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Tomate
<i>Monilinia fructicola</i>	Pêssego	<i>Xanthomonas sp</i>	Eucalipto
<i>Penicillium digitatum</i>	Citros	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Feijão

### 2.2.8.2 Efeito individual dos diferentes componentes da mistura artificial de voláteis sobre fitopatógenos fúngicos

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa contendo, 10 mL de meio BDA, foi transferido um disco de meio (5 mm) contendo micélio dos fitopatógenos *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, *S. sclerotiorum* ou *F. oxysporum*.

No lado oposto, foi adicionado em um algodão 50  $\mu\text{L}$  ( $1 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar) os diferentes componentes constituintes da mistura gasosa, além de um tratamento contendo todos os componentes reunidos. O controle consistia na placa contendo o patógeno na ausência dos voláteis. As placas foram vedadas e mantidas a  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  sob fotoperíodo de 12h. A avaliação do crescimento micelial foi realizada através da média entre duas medições diametralmente opostas, quando a colônia das placas controle atingiu os bordos. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento.

### **2.2.8.3 Fumigação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) infectadas com *S. sclerotiorum***

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. José Otávio Machado Menten.

#### **2.2.8.3.1 Inoculação artificial**

Para a inoculação foram utilizadas sementes de feijão da cv. Carioca, procedentes do Estado de São Paulo, e isentas de *S. sclerotiorum*. As sementes foram submetidas à assepsia superficial com hipoclorito de sódio a 1%, durante 2 min, e então lavadas em água destilada esterilizada. As sementes foram secas à temperatura ambiente, sobre papel absorvente por 24h, seguindo procedimento adotado por Tanaka (1990).

A inoculação foi realizada pelo método de contato, segundo metodologia descrita por Peres (1996). Para tal, as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo meio BDA colonizado por cultura de 5 dias de *S. sclerotiorum*, roladas rapidamente sobre a colônia e deixadas em contato, sendo dispostas em camada única. A incubação foi realizada a  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  no escuro durante 48h. Decorrido esse período, as sementes foram secas à temperatura ambiente sobre papel absorvente durante 72h e misturadas a sementes sadias na proporção 1:2, e homogeneizadas.

### **2.2.8.3.2 Fumigação**

Para a fumigação, 200 g das sementes (aproximadamente 750 sementes) foram acondicionadas em frascos de vidro de 310 mL. Em um algodão adaptado à tampa, foram adicionados diferentes volumes da mistura artificial a fim de se obter as concentrações desejadas no interior do frasco que foram fechados e vedados com parafilme. Os tratamentos consistiram em 3 doses (0,875, 1,75 e 3,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de ar) e dois tempos de exposição (4 e 7 dias). O tratamento controle era constituído por frascos sem a mistura artificial. Decorridos os períodos de fumigação, as sementes foram retiradas dos frascos, acondicionadas em sacos de papel e armazenadas a 4 °C até o momento da análise de sanidade.

### **2.2.8.3.3 Análise de sanidade**

As sementes foram submetidas ao teste de sanidade para detecção de *S. sclerotiorum* através do método papel de filtro modificado por Koch e Menten (2000). Foram analisadas 200 sementes por tratamento (4 repetições de 50 sementes para cada tratamento).

Foram distribuídas de forma eqüidistante 10 sementes em placa de poliestireno de 9 cm de diâmetro, contendo 3 folhas de papel de filtro previamente umedecidas com água destilada. As placas foram empacotadas em papel e saco plástico, a fim de manter a umidade e a ausência de luz e mantidas a 5 °C. A avaliação foi realizada após 7 e 14 dias de incubação, procurando visualizar a presença de micélio típico do patógeno sobre a semente.

#### **2.2.8.4 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o fitonematóide *Meloidogyne javanica***

O experimento foi realizado no Laboratório de Nematologia de Plantas, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Mário Massayuki Inomoto.

Foi utilizada população de *M. javanica* originária de raízes de plantas de soja, coletada no município de Júlio de Castilhos (RS) e mantida em plantas de soja em casa de vegetação. Para a obtenção do inóculo, plantas de soja foram retiradas do substrato e as raízes gentilmente lavadas em água corrente. Procedeu-se a coloração das massas de ovos pela imersão das raízes em solução de Floxina B (0,0015%) durante 20 min. Em seguida, as massas de ovos foram coletadas e transferidas para câmaras de eclosão (HOOPER, 1986). As câmaras de eclosão foram mantidas a 30 °C, e após 24h, foi obtida a suspensão aquosa de juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide.

Para o ensaio de inibição, foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo 1,5 g de vermiculita, foi adicionado 2,3 mL da suspensão contendo 1000 juvenis J2 e, no lado oposto, foi adicionado um algodão contendo a mistura artificial de voláteis (50, 100 e 200 µL). As placas foram vedadas e mantidas a 27 °C na ausência de luz. Decorridos cinco dias, a vermiculita fumigada foi recolhida e transferida para um sistema de Baermann modificado para recipiente raso (HOOPER, 1986), que foi mantido por cinco dias a 30 °C. O procedimento visou recuperar apenas os indivíduos que permaneceram vivos após o tratamento. Os nematóides foram mortos por calor (60 °C) e a contagem dos indivíduos foi feita com auxílio de estereoscópio. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Efeito do meio de cultivo na produção de compostos orgânicos voláteis por *S. cerevisiae* e identificação através de SPME-GC-MS

O presente trabalho evidenciou que o meio utilizado para o cultivo da levedura *S. cerevisiae* tem influência na produção de compostos orgânicos voláteis com atividade inibitória sobre *G. citricarpa* (Figura 2). O cultivo em meio BDA e meio extrato de malte promoveu os maiores níveis de inibição (96 e 88%, respectivamente) através da produção de voláteis. O cultivo em meio YEPDA inibiu de forma intermediária (25%). Já em meio de aveia, a levedura não se mostrou capaz de produzir voláteis que atuassem significativamente na redução do crescimento vegetativo do fitopatógeno.

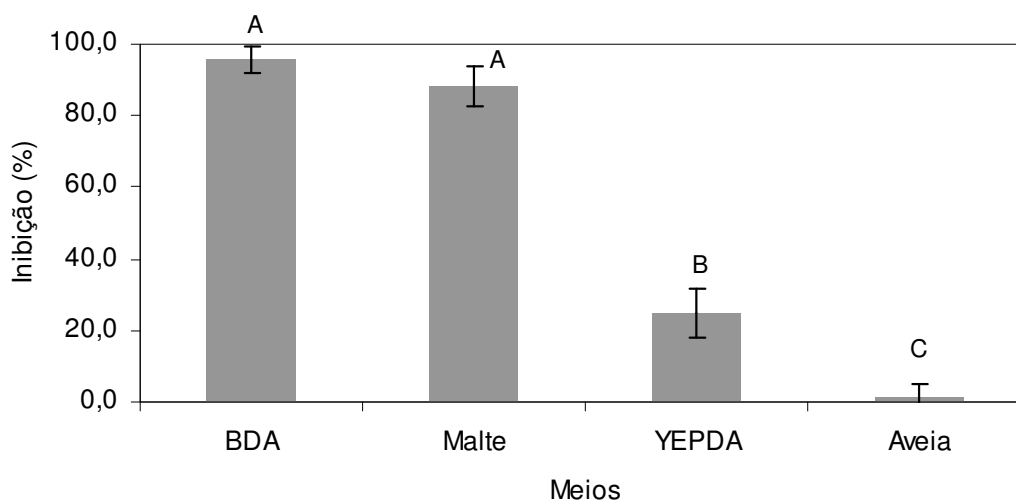


Figura 2 - Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* exposto aos compostos orgânicos voláteis produzidos pela linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*, cultivada em diferentes meios. Os valores médios de 5 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição comparado às placas controle na ausência da levedura antagonista. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

Em função desses resultados, também foi determinada de forma mais detalhada a influência da fonte de carbono na produção de voláteis. Nesse sentido, o meio de aveia foi suplementando com glicose e o meio de batata com diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, galactose ou maltose), na concentração de 2%. Como no experimento anterior, a levedura não produziu compostos voláteis com atividade

inibitória quando cultivado em meio de aveia, no entanto, quando foi adicionado glicose, a inibição foi de 36% (Figura 3).

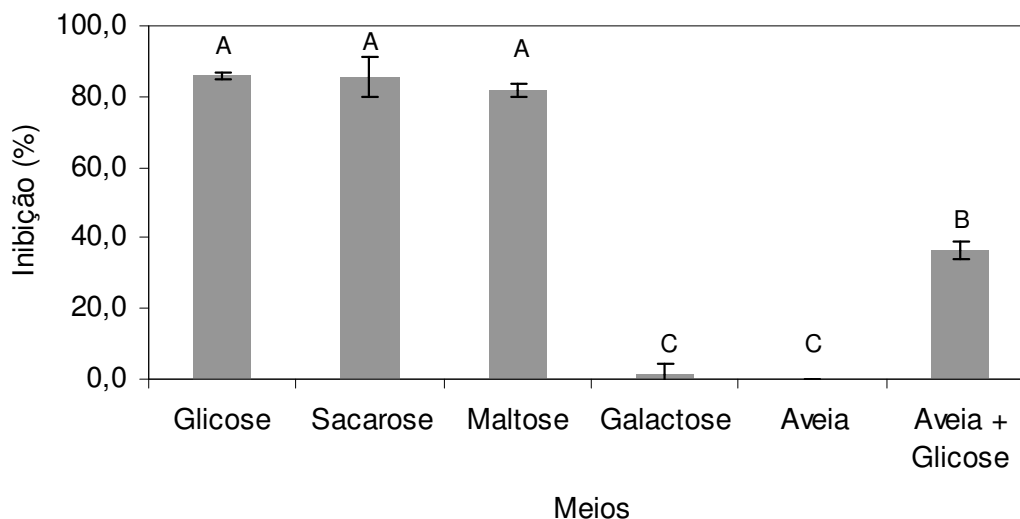


Figura 3 - Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* exposto aos compostos orgânicos voláteis produzidos pela linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*, cultivada em meios de batata e aveia suplementados com diferentes fontes de carbono (2%). Os valores médios de 4 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição comparado às placas controle na ausência da levedura antagonista. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

Resultados similares foram observados por Ezra, Hess e Strobel (2004), onde o fungo endofítico *M. albus* produziu compostos voláteis com letalidade máxima contra fitopatógenos, quando cultivado em meios ricos em nutrientes. Esses mesmos autores também concluíram que a simples adição de sacarose ao meio pobre em nutrientes eleva a atividade dos voláteis em aproximadamente 50%.

Em relação ao meio de batata, com exceção da galactose que não promoveu de forma significativa a produção de voláteis inibidores, todas as fontes de carbono testadas foram favoráveis, glicose e sacarose (86% de inibição) e maltose (82% de inibição).

A Figura 4 demonstra que a concentração de carbono (glicose), afeta a produção de compostos orgânicos voláteis bioativos. A levedura inibiu *G. citricarpa* através da produção de voláteis apenas quando havia ao menos 0,5% de glicose disponível no

meio. A atividade inibitória foi crescente e proporcional ao aumento da concentração de glicose, sendo a inibição máxima quando a levedura foi cultivada em 4% de glicose.

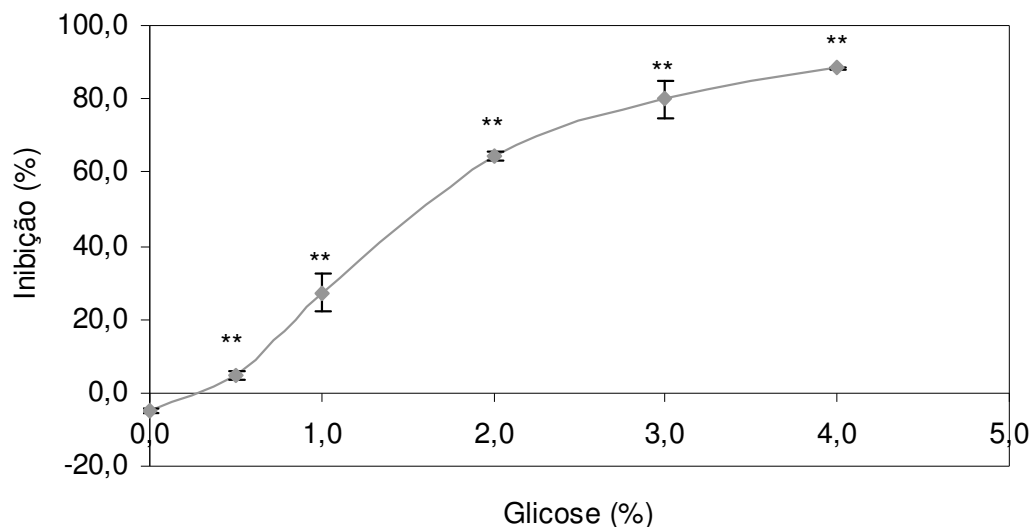


Figura 4 - Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* exposto aos compostos orgânicos voláteis produzidos pela linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*, cultivada em meio BDA suplementado com diferentes concentrações de glicose, como fonte de carbono. Os valores médios de 4 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição comparado às placas controle na ausência da levedura antagonista. \*\* indica os valores que diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

Os carboidratos, em especial as hexoses, como a glicose, são fontes de carbono e energia preferenciais. Os microrganismos possuem dois mecanismos para o catabolismo de carboidratos, as vias glicolíticas Entner–Doudoroff (ED) e Embden–Meyerhof–Parnas (EMP), sendo esta última a mais comum nos organismos, e utilizada pelas leveduras. A via EMP consiste em uma série de reações que converte uma molécula de glicose (seis carbonos) em duas moléculas de piruvato (três carbonos), duas moléculas de NADH e duas moléculas ricas em energia, o ATP (GOTTSCALK, 1986).

A variedade de voláteis, bem como a proporção entre os diferentes componentes da mistura produzida pode representar as distintas conversões metabólicas realizadas pelo microrganismo nos diferentes substratos (BRUCE et al., 2004). Nout e Bartelt (1998) afirmaram que a produção de voláteis por leveduras é fortemente influenciada pela capacidade de assimilar e fermentar carboidratos.

Em meio extrato de malte, a levedura pode assimilar e fermentar a maltose e produzir altas proporções de álcoois. Por sua vez, o meio BDA é rico em amido e glicose como fontes de carbono, sendo esse último assimilável e fermentável pela levedura. Quanto maior o nível de carbono disponível no meio, mais complexa se torna a composição da mistura gasosa (EZRA; STROBEL, 2003).

Bruce et al. (2003) verificaram que compostos voláteis produzidos pela linhagem Y1001 de *S. cerevisiae* em meio triptona de soja inibiram entre 76% e 33%, o crescimento de fungos manchadores de madeira. A produção de voláteis foi fortemente influenciada pelas condições nutricionais do meio de cultivo, visto que ao contrário do presente trabalho, no cultivo em meio extrato de malte a inibição foi de modo geral baixa ou nula.

Wheatley et al. (1997) também afirmaram que o substrato é um fator determinante na composição dos voláteis antimicrobianos produzidos por isolados de *T. pseudokoningii* e *T. viride* contra fungos degradadores de madeira, sendo nesse caso o meio extrato de malte o mais adequado à produção de compostos voláteis do que os meios mínimos.

Não houve produção de voláteis em meio de aveia que pudessem inibir *G. citricarpa*, no entanto, a inibição foi parcialmente restabelecida quando o meio foi suplementado com glicose. Isso sugere que a incapacidade de fermentar a fonte de carbono presente no meio de aveia refletiu na baixa produção de compostos voláteis.

Segundo Anchorena-Matienzo (2002), *S. cerevisiae* é capaz de assimilar glicose, maltose, sacarose, rafinose e galactose. A levedura também é capaz de fermentar esses açúcares com exceção da galactose, o que explica a baixa inibição quando a levedura é cultivada em meio contendo essa fonte de carbono.

O aumento da capacidade de *S. cerevisiae* em inibir o fitopatógeno através da produção de voláteis foi proporcional à disponibilidade de glicose no meio. Essa observação reforça o fato de que a fonte de carbono é um dos fatores mais limitantes para produção de voláteis. No entanto, os dados indicam a existência de interação da fonte de carbono com outros fatores nutricionais, como por exemplo, a disponibilidade de aminoácidos, visto que a suplementação do meio de aveia com glicose eleva a produção de voláteis em apenas 36%. Segundo Garde-Cerdan e Ancín-Azpilicueta



(2008), a produção de compostos voláteis por leveduras, em especial ésteres e ácidos, durante a fermentação alcoólica do vinho é influenciada pela concentração e tipo de aminoácidos presentes no mosto.

A mudança de apenas um aminoácido específico no meio de cultivo, mas mantendo a mesma proporção C:N, resultou em diferenças substanciais na composição e abundância de voláteis liberados por *T. aureoviride*, e conseqüentemente na atividade contra os organismos alvo. O maior efeito inibitório estava associado à presença de L-arginina no meio, o que favoreceu a produção de aldeídos e cetonas (BRUCE et al., 2000).

Druvefors, Passoth e Schnurer (2005) constataram que a levedura *Pichia anomala* inibiu o desenvolvimento *Penicillium roqueforti* em grãos de trigo armazenados em silos. A atividade foi associada à produção de etanol e acetato de etila, cuja produção se elevou proporcionalmente ao incremento da concentração de glicose disponível.

No presente trabalho, a técnica de microextração de fase sólida *Headspace Solid Phase Microextraction* (HS-SPME) acoplada a cromatografia gasosa com detecção por espectrômetro de massa *Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection* (GC-MS) foi empregada para determinar a composição da mistura gasosa produzida pela linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*. Devido à sua simplicidade, sensibilidade e rapidez, a técnica introduzida em 1990, tem sido extensivamente utilizada nas etapas de extração e pré-concentração em procedimentos analíticos de isolamento *in situ* de compostos biogênicos (AUGUSTO; SARTORATTO, 2003; OLIVEIRA et al. 2004; PINI et al., 2004; LUPE et al., 2007). A Figura 5 mostra análise da atmosfera gasosa, produzida pela levedura em meio BDA. A identificação dos compostos é apresentada na Tabela 2.

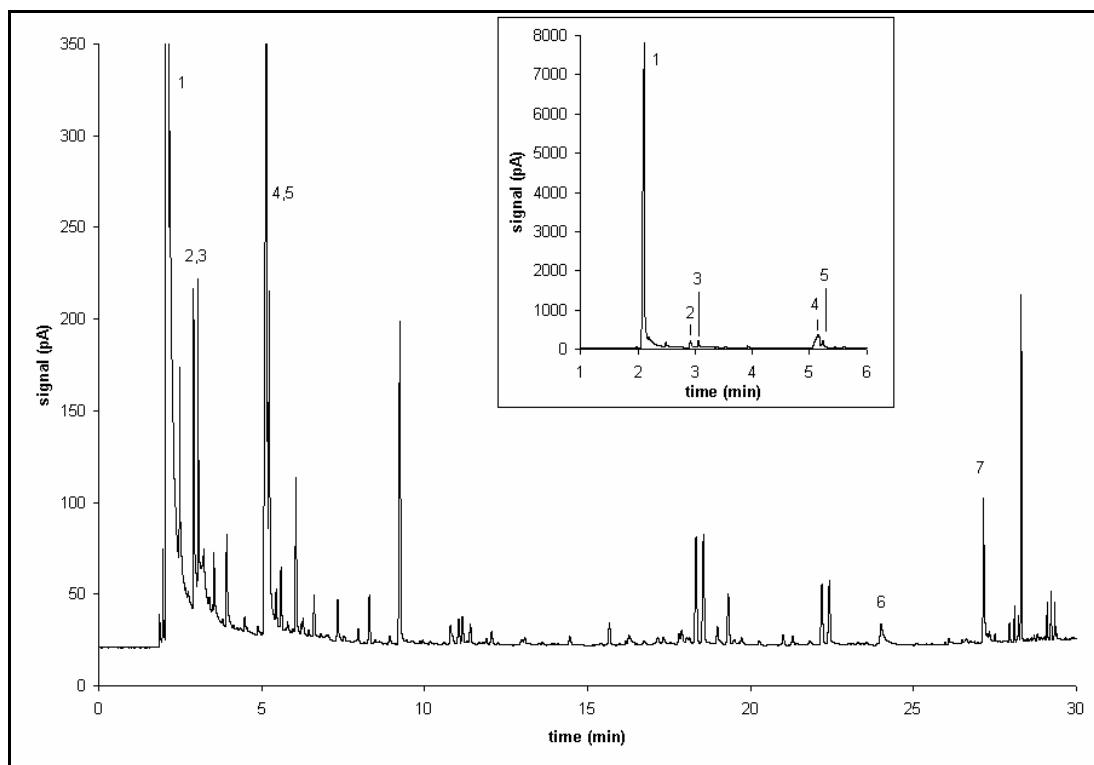


Figura 5 - Cromatograma obtido através da análise em cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) dos compostos orgânicos voláteis produzidos pela linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*. O quadro menor mostra em detalhe, os primeiros 5 min do mesmo cromatograma em uma escala de sinal maior. Os picos representam: (1) etanol; (2) éster não identificado; (3) acetato de etila; (4) 3-metil-1-butanol; (5) 2-metil-1-butanol; (6) feniletalcoól; (7) octanoato de etila

Tabela 2 - Identificação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pela linhagem CR-1 de *S. cerevisiae*, através de SPME-GC-MS

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

Foram produzidos principalmente compostos pertencentes ao grupo dos álcoois, sendo etanol o componente majoritário constituindo 85% da mistura gasosa, além de álcoois superiores alifáticos (3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol) e o álcool aromático feniletilalcool. Também foi constada a presença de ésteres como acetato de etila, octanoato de etila e um éster de identidade não confirmada de MM 88.

As análises através de GC-MS da atmosfera gasosa produzida por *Muscodor albus*, *Gliocladium sp* e *T. aureoviride*, fungos apontados como produtores de voláteis antimicrobianos, também identificaram a produção de etanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, acetato de etila e feniletilalcool (EZRA; HESS; STROBEL, 2004; STINSON et al., 2003b; BRUCE et al., 2000). No entanto, a composição da mistura volátil produzida por estes fungos se mostrou mais complexa e diversificada, pois além de álcoois e ésteres, esses fungos são capazes de produzir outras classes de compostos, tais como cetonas, aldeídos e ácidos.

Em *M. albus* os compostos voláteis naftaleno, ácido propanóico e 3-metil-1-butanol foram associados à atividade biológica sobre os fitopatógenos *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A utilização de misturas artificiais demonstrou a necessidade da presença dos três compostos para manutenção da atividade inibitória, indicando a sinergia entre os diferentes componentes da mistura (EZRA; HESS; STROBEL, 2004).

Bruce et al. (2004) apontaram os compostos voláteis 2-pentanona e feniletilalcool, produzidos pela linhagem Y1001 de *S. cerevisiae*, como os maiores responsáveis pela atividade antifúngica sobre fungos manchadores de madeira.

Wheatley et al. (1997) evidenciaram que os compostos 2-propanona, 2-metil-1-butanol, decanal, heptanal e octanal, produzidos por isolados de *T. pseudokoningii* e *T. viride*, foram os responsáveis pela atividade antimicrobiana contra fungos degradadores de madeira. Posteriormente, Humphris, Wheatley e Bruce (2001) confirmaram que diversos basidiomicetos foram totalmente inibidos por heptanal e octanal, mesmo em baixas concentrações (2,5 µg mL<sup>-1</sup>).

Segundo Nout e Bartelt (1998), leveduras se desenvolvendo em meio contendo uma fonte de carbono não fermentável podem produzir apenas alguns voláteis, como acetaldeído e ácido acético. Enquanto que em meios com fontes fermentáveis de

carbono, a produção é bem mais elevada, em especial para álcoois (principalmente etanol), ésteres, cetonas e grandes quantidades de acetaldeído, além de compostos fenólicos, presumidamente oriundos do metabolismo de aminoácidos aromáticos. Tais informações coincidem com os dados obtidos no presente trabalho, visto que o cultivo da levedura em um meio rico como o BDA, propiciou a produção de álcoois em alta proporção, constituindo 95% da composição gasosa.

Como constatado pela análise GC-MS, o etanol, uma molécula altamente reduzida, é o principal produto do metabolismo em *S. cerevisiae*. Esse álcool é gerado através da via fermentativa a partir do piruvato, oriundo da glicólise, que é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase a acetaldeído, que por sua vez é reduzido a etanol pela álcool desidrogenase (GOTTSCHALK, 1986).

As leveduras podem ser classificadas como aeróbias obrigatórias, fermentativas facultativas e fermentativas obrigatórias. A capacidade de crescer em condições limitadas de oxigênio é estritamente dependente da habilidade de realizar a fermentação, que permite a reoxidação do NADH gerado durante a glicólise. Em *S. cerevisiae*, a fermentação alcoólica predomina sobre a respiração quando na presença de altas concentrações de glicose mesmo quando em aerobiose, que foi a condição do presente trabalho.

O metabolismo da glicose e oxigênio podem ser correlacionados pelo efeito Pasteur, que é definido pela inibição do metabolismo fermentativo pelo oxigênio. No entanto, em *S. cerevisiae* este fenômeno só é observado durante baixo fluxo glicolítico. (POSTMA et al., 1989; PRONK et al., 1996; PIŠKUR et al., 2006; MERICO et al., 2007).

O acúmulo de etanol na presença de oxigênio provavelmente foi uma estratégia evolucionária empregada por algumas leveduras para aumentar a competitividade, inibindo o desenvolvimento de outros microrganismos (PFEIFFER; SCHUSTER; BONHOEFFER, 2001; MACLEAN; GUDELJ, 2006). Além disso, *Saccharomyces* não só pode inibir o competidor através da produção de etanol, mas também pode consumir mais tarde o álcool gerado (PIŠKUR et al., 2006).

Álcoois superiores ou fusel se refere aos compostos caracterizados pelo maior número de átomos de carbono e ponto de ebulição mais elevado do que o etanol (entre 90 e 150 °C), sendo o 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, os principais

representantes. Como observado na produção de bebidas, no presente trabalho o composto 3-metil-1-butanol é o álcool superior predominante, sendo encontrado em concentrações acima de 50% em relação ao total de álcoois superiores nas fermentações industriais (LEHTONEN; JOUNELA-ERIKSSON, 1983). Os álcoois 2-metil-1-propanol e 1-propanol não foram detectados.

Ehrlich em 1907 observou que os álcoois superiores são formados a partir de aminoácidos, visto que a fermentação alcoólica na presença de leucina ou isoleucina estimulou a produção de 3-metil-1-butanol (HAZELWOOD et al., 2008). Por outro lado, fontes inorgânicas de nitrogênio inibem a produção de álcoois superiores (OUCHI et al., 1980). Estudos posteriores confirmaram que todos os álcoois superiores podem ser formados a partir do catabolismo da leucina e valina. As leveduras não são capazes de utilizar aminoácidos como fonte de carbono, no entanto, podem utilizá-los como fonte de nitrogênio em condições limitantes e formar álcoois superiores (BERRY, 1995, HAZELWOOD et al., 2008).

A formação de álcoois superiores (via de Ehrlich) ocorre através da transaminação dos aminoácidos realizada pela transaminase formando  $\alpha$ -cetoácidos. Em seguida, esses  $\alpha$ -cetoácidos sofrem descarboxilação, reação catalisada pela piruvato descarboxilase, gerando aldeídos que por sua vez são reduzidos a álcoois pela desidrogenase alcoólica, independentemente dos aminoácidos presentes no meio (AYRAPAA, 1967; BERRY, 1995; HAZELWOOD et al., 2008).

Embora no presente estudo tenha sido verificada a produção de ésteres em proporções semelhantes, normalmente o acetato de etila é o éster produzido em maior abundância por leveduras. A acetil-CoA é condensada com álcoois superiores pela enzima álcool acetiltransferase formando ésteres de acetato. Os etil-ésteres, como por exemplo, o octanoato de etila, são formados por uma reação também catalisada enzimaticamente, a partir de etanol e ácidos graxos de cadeia longa (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

As propriedades antimicrobianas dos álcoois são conhecidas há muito tempo e são utilizadas na formulação de desinfetantes e preservantes. A ação inibitória dos álcoois é complexa, mas de modo geral parece estar mais relacionada às suas propriedades físico-químicas do que a presença de receptores específicos na célula.

Provavelmente o sítio primário de ação é a membrana plasmática que tem como principal função fornecer permeabilidade seletiva, regulando a passagem de solutos, tais como açúcares e aminoácidos, entre a célula e o ambiente externo (INGRAM; BUTTKE, 1984; SEWARD, 1996).

Compostos mais lipofílicos, tais como 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, possuem alta afinidade pela membrana celular e por isso apresentam maior toxicidade quando comparado a compostos menos lipofílicos, como o etanol que necessita estar presente em altas concentrações para exercer efeito tóxico (HEIPIEPER et al., 1994).

As mudanças físico-químicas geradas pelo acúmulo de solventes na membrana plasmática podem afetar a organização e estabilidade da bicamada lipídica (INGRAM; BUTTKE, 1984; SEWARD, 1996). O aumento da permeabilidade para prótons e outros íons pode levar a dissipação da força próton motiva e afetar a transdução de energia na célula (NICHOLLS, 1982), além disso, pode ocorrer perda de metabólitos essenciais e alterações no controle do pH interno (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995) e redução da atividade de enzimas associadas à membrana (VELD et al., 1991). Como conseqüência, a viabilidade do microrganismo é afetada.

Entre outras funções, a assimilação de nutrientes através da membrana pode estar sendo comprometida. Jacobsen (1995) avaliou o efeito inibitório de diversas substâncias sobre a germinação do fungo *Geotrichum candidum*, tais como metanol, isopropanol e etanol. Os resultados demonstraram que em baixas concentrações (menor que 500 mM), os referidos álcoois causam elevação na assimilação de glicose na célula, no entanto, concentrações mais elevadas reduzem a entrada do açúcar tendo como conseqüência a inibição do fungo.

Portanto, os compostos voláteis produzidos pela levedura, em especial os pertencentes ao grupo químico dos álcoois, podem estar interferindo nas propriedades físico-químicas, e como conseqüência nas funções da membrana plasmática em *G. citricarpa*.

### 2.3.2 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o crescimento micelial e síntese de proteínas

Em função da identificação dos componentes presentes na atmosfera gasosa, produzida por *S. cerevisiae*, através de SPME-GC-MS (Tabela 2), foi produzida uma mistura artificial contendo todos os compostos positivamente identificados. A concentração de cada composto presente na mistura foi baseada na sua proporção relativa (estimada através da área) em relação a todos os outros componentes da mistura. O fitopatógeno foi exposto a essa mistura artificial e avaliada a influência da mesma sobre o crescimento micelial (Figura 6) e síntese de proteínas (Figura 7).

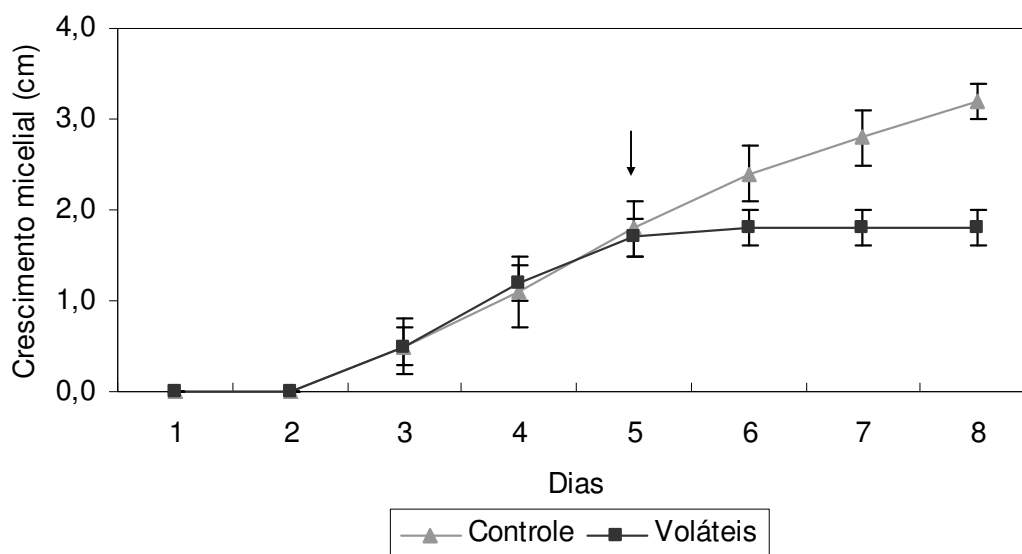


Figura 6 - Influência da adição da mistura artificial de voláteis, identificados em *S. cerevisiae*, sobre o crescimento micelial de *G. citricarpa*. A seta indica o momento da adição da mistura artificial ( $40 \mu\text{L}/\text{placa} = 0,8 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar). Os valores são médias de 4 repetições ( $\pm$  DP)

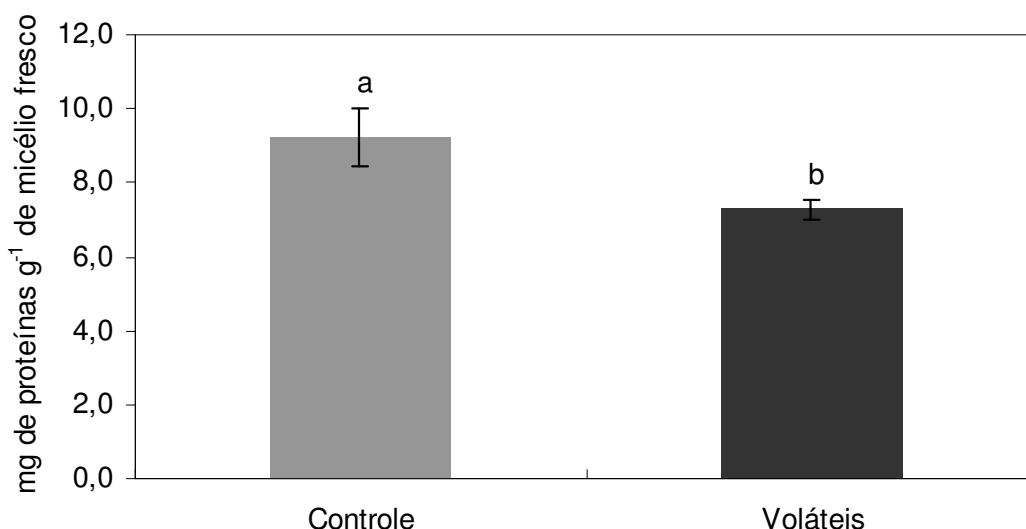


Figura 7 - Influência da mistura artificial de voláteis (40  $\mu\text{L}/\text{placa} = 0,8 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, sobre o conteúdo de proteínas em *G. citricarpa*, após 72h de exposição. Os valores são médias de 4 repetições ( $\pm$  DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Foi verificado que o crescimento foi paralisado após a adição da mistura artificial, sendo que a inibição foi de 25, 36 e 44% após 24, 48 e 72h de exposição aos voláteis, respectivamente, quando comparado ao controle. Além do crescimento micelial, a ação dos voláteis também se refletiu na síntese de proteínas, sendo verificado que o fungo havia produzido em média 7,3 mg de proteína por grama de micélio fresco após 72h de exposição aos voláteis, o que significou uma redução de 21% em relação ao controle, que produziu 9,2 mg de proteína por grama de micélio fresco.

O efeito de quatro compostos identificados em *Trichoderma* spp foram testados em diferentes concentrações contra fungos deterioradores de madeira (*Neolentinus lepideus*, *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* e *Trametes versicolor*). O crescimento de todos os fungos foi afetado ao menos por um dos compostos, ocorrendo inibição na maioria dos casos e ocasionalmente estímulo, dependendo da concentração (HUMPHRIS; WHEATLEY; BRUCE, 2001).

A mistura artificial produzida a partir da identificação dos voláteis produzidos por *M. albus* em meio BDA, inibiu o crescimento micelial e foi letal a diversos fungos após



três dias de tratamento, reproduzindo os efeitos da exposição ao fungo produtor de voláteis (ATMOSUKARTO et al., 2005).

Humphis et al. (2002) verificaram a inibição do crescimento micelial e síntese de proteínas em dois isolados do basidiomiceto *Serpula lacrymans* por compostos orgânicos voláteis produzidos por duas espécies de *Trichoderma*. A diminuição no desenvolvimento desencadeada pelos fungos antagonistas, *T. aureoviride* e *T. viride*, estava associada à inibição da síntese de proteínas de 29,1 kDa. Por outro lado, os voláteis de *T. pseudokoningii* não reduziram significativamente o crescimento micelial dos isolados de *S. lacrymans* e não afetaram a síntese dessas mesmas proteínas. Além do referido estudo, não existem informações disponíveis sobre a influência de voláteis na síntese de proteínas. Através do presente trabalho é possível supor que a síntese de proteínas importantes no metabolismo e crescimento vegetativo de *G. citricarpa* deve estar sendo afetada.

Após a confirmação da atividade biológica da mistura artificial sobre *G. citricarpa*, a próxima etapa do trabalho consistiu em verificar a influência de diferentes concentrações da mistura artificial (0,2 a 2,4  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de ar) sobre o crescimento fúngico. Além disso, foi determinado os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>100</sub>, que correspondem à concentração inibitória mínima da mistura artificial em  $\mu\text{L}$  por mL de ar na placa, requerida para produzir 50 e 100% de redução, respectivamente, no crescimento micelial (Figura 8).

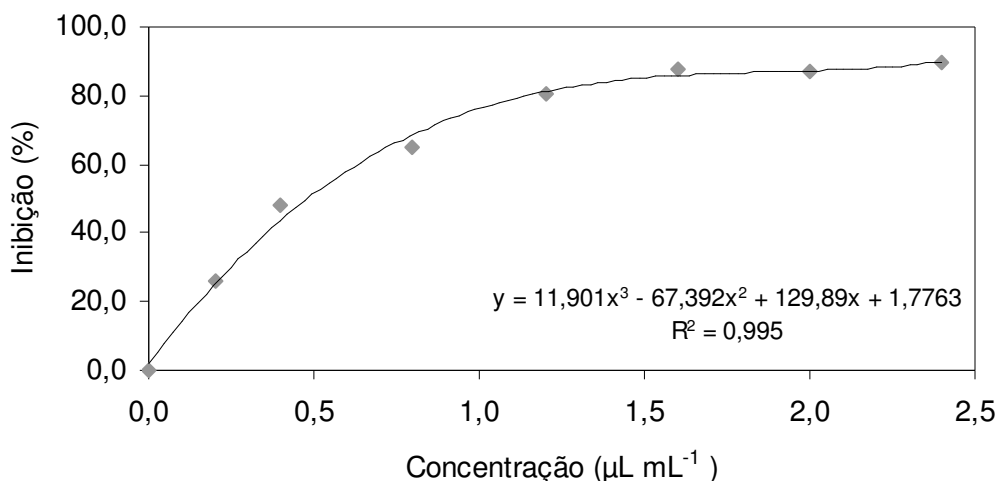


Figura 8 - Efeito da concentração da mistura artificial de voláteis, identificados em *S. cerevisiae*, no crescimento micelial de *G. citricarpa*. Os valores médios de 5 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição, comparado as placas controle na ausência da mistura artificial

O fungo foi inibido gradativamente até a concentração de  $1,6 \mu\text{L mL}^{-1}$ , a partir da qual a inibição se tornou estável (88% em média). A partir da análise de regressão foi possível determinar os valores de  $\text{MIC}_{50}$  ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar) e  $\text{MIC}_{100}$  ( $2,84 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar). O fungo retomou o crescimento quando transferido para o meio BDA na ausência da mistura artificial, caracterizando a natureza fungistática da mesma.

Atmosukarto et al. (2005) avaliaram a suscetibilidade de fungos e bactérias de importância médica e fitopatológica, pertencentes a diversos grupos taxonômicos, à mistura gasosa artificial de *M. albus* constituída por 20 compostos identificados. O  $\text{MIC}_{50}$  variou de  $0,01 \mu\text{L mL}^{-1}$  (*Verticillium dahliae*) a  $0,3 \mu\text{L mL}^{-1}$  (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus fumigatus*). A mistura artificial na concentração de  $1,2 \mu\text{L mL}^{-1}$  inibiu totalmente o crescimento micelial e mostrou efeito letal para todos os fitopatógenos testados, com exceção de *C. gloeosporioides* e *Fusarium culmorum* que permaneceram viáveis após 3 dias de exposição.

Os valores de  $\text{MIC}_{50}$  para a mistura artificial do endófito *Gliocladium* sp. variaram entre  $0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$  e  $0,28 \mu\text{L mL}^{-1}$ , e os valores de  $\text{MIC}_{100}$  oscilaram entre  $0,18 \mu\text{L mL}^{-1}$  e  $0,66 \mu\text{L mL}^{-1}$ , para 7 fitopatógenos avaliados sendo, no entanto, letal apenas para *S.*

*slerotiorum* e *P. ultimum* expostos durante 2 dias à concentração em nível de MIC<sub>100</sub> (STINSON et al., 2003b).

Os resultados demonstraram que a mistura artificial mimetizou os efeitos da atmosfera produzida por *S. cerevisiae*. Embora tenham sido utilizados neste estudo todos os compostos positivamente identificados para produzir a mistura, provavelmente apenas alguns dos componentes devem possuir atividade biológica. Esses compostos atuam em sinergia mimetizando o efeito inibitório, não sendo necessária a presença de todos os compostos constituintes da mistura natural (EZRA; HESS; STROBEL, 2004; STROBEL, 2006).

### 2.3.3 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a taxa respiratória

Foi verificada a influência da mistura artificial de voláteis na concentração de 0,48  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de ar (MIC<sub>50</sub>) sobre a taxa respiratória de *G. citricarpa* (Figura 9).

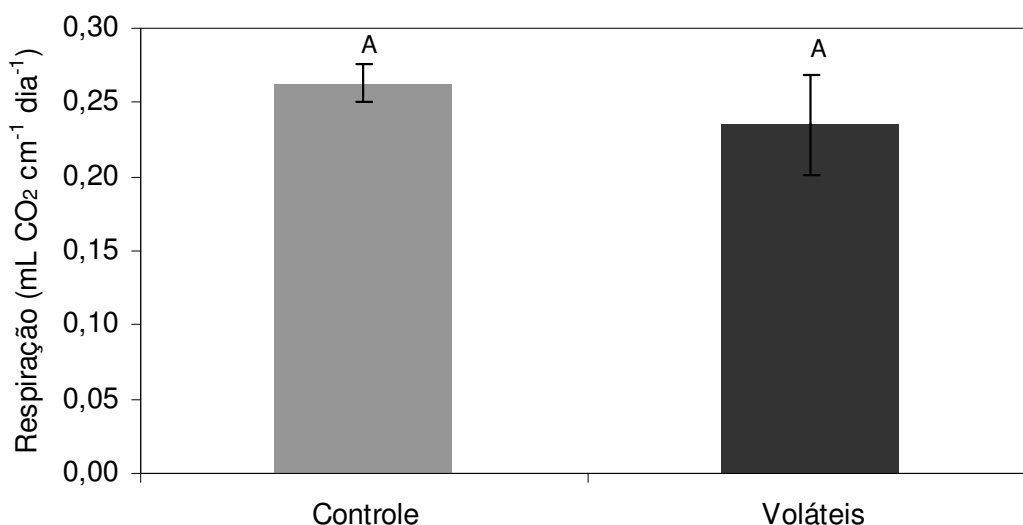


Figura 9 - Influência da mistura artificial de voláteis (0,48  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, na respiração de *G. citricarpa* após 3 dias de exposição. Os valores são médias de 5 repetições ( $\pm$  DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

Em condições normais o fungo produziu  $0,26 \text{ mL de CO}_2 \text{ cm}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , e embora sem significância estatística, houve tendência de queda na taxa respiratória quando exposto aos voláteis. A redução na taxa respiratória poderia ser um reflexo da diminuição do metabolismo em função do tratamento com os voláteis. Relatos na literatura sobre a influência de compostos orgânicos voláteis são limitados e as respostas são variáveis. Alguns voláteis, como o acetaldeído, elevaram a respiração de microrganismos habitantes do solo (OWENS et al. 1969), enquanto outros não apresentaram efeito (KO; CHOW, 1978).

Humphris, Wheatley e Bruce (2001) avaliaram a respiração de fungos basidiomicetos degradadores de madeira, quando expostos aos compostos produzidos por *Trichoderma* spp. O composto 2-metil-1-butanol inibiu entre 77 e 100% a respiração de todos os fungos na concentração de  $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , entretanto, estimulou a respiração de *P. placenta* quando em baixas concentrações ( $2,5$  e  $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os compostos octanal e hexanal inibiram a respiração dos fungos avaliados, já a acetona teve efeito estimulante (em torno de 35%) sobre o fungo *T. versicolor*, em todas as concentrações testadas.

#### **2.3.4 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre a atividade de enzimas associadas à morfogênese**

A Figura 10 apresenta o perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas de *G. citricarpa*, realizada a fim de verificar a qualidade da extração de proteínas e observar alguma eventual alteração do perfil protéico em função dos tratamentos. Através da observação da migração das proteínas no gel, constatou-se que a extração foi bem sucedida e forneceu amostras de boa qualidade. No entanto, não foram observadas alterações aparentes no perfil eletroforético em relação à indução ou repressão de proteínas específicas nos diferentes tempos de exposição aos voláteis.

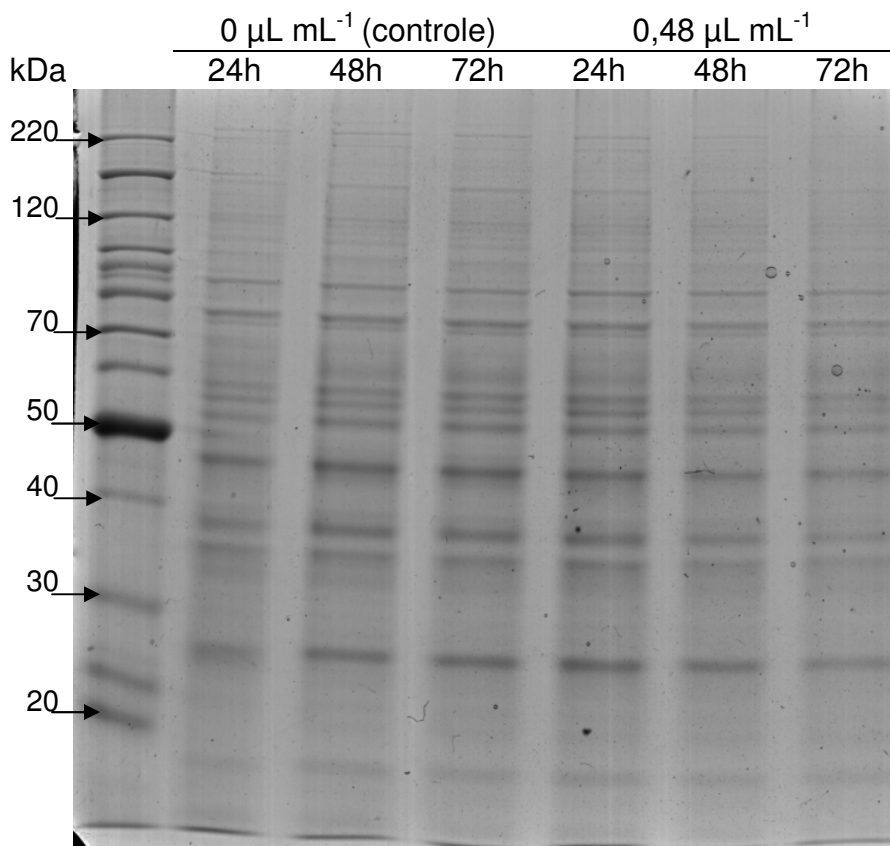


Figura 10 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas solúveis extraídas *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis, identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. Foram aplicadas 20 μg de proteína total por canaleta

Muito pouco é conhecido sobre o modo de ação dos compostos voláteis no controle de microrganismos. É provável que os voláteis atuem na alteração da expressão de proteínas (HUMPHRIS et al., 2002) e atividade de enzimas específicas (WHEATLEY, 2002), podendo refletir no crescimento.

Foi determinada no presente estudo a influência dos compostos orgânicos voláteis na concentração de 0,48 μL mL<sup>-1</sup> de ar, sobre a atividade de enzimas relacionadas ao desenvolvimento fúngico (quitinase, β-1,3-glucanase, lacase e tirosinase). A atividade máxima da enzima quitinase foi verificada no tratamento controle no tempo de 24h e posteriormente decresceu em relação há esse tempo. A atividade foi significativamente reduzida em 15 e 17% após 24 e 72h de exposição à mistura artificial de voláteis, respectivamente (Figura 11).

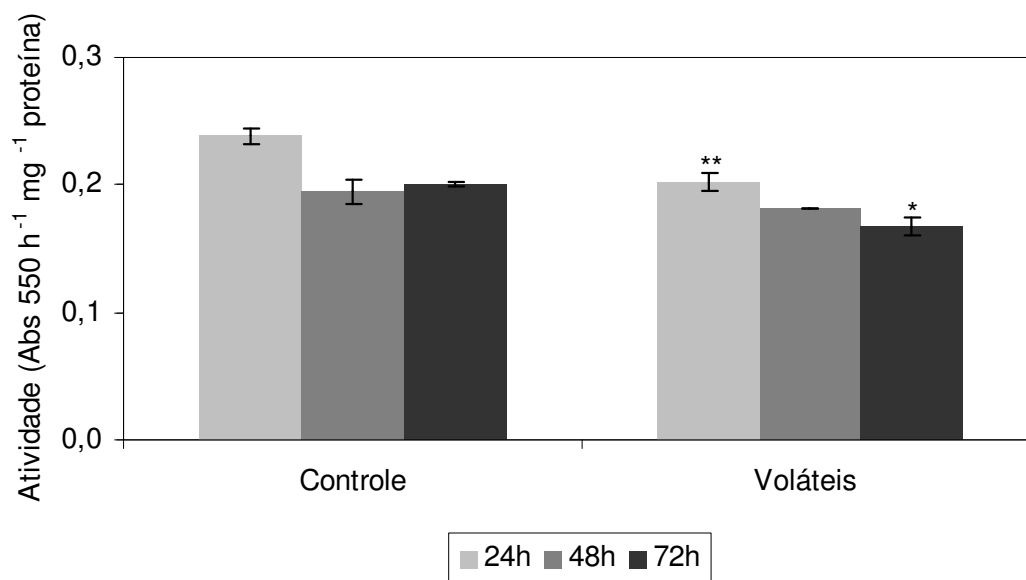


Figura 11 - Atividade da quitinase de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. Os valores são médias de 3 repetições ( $\pm$  DP). \*\* e \* indicam os valores que diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ) e ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente

A  $\beta$ -1,3-glucanase teve a sua atividade elevada em função do tempo de cultivo no tratamento controle. Quando exposto aos voláteis, 24h após, o fungo aumentou significativamente a atividade da enzima em 33% quando comparado ao tratamento controle. A atividade não se alterou no tempo de 48h e houve redução da atividade enzimática (13%) após 72h de exposição (Figura 12).

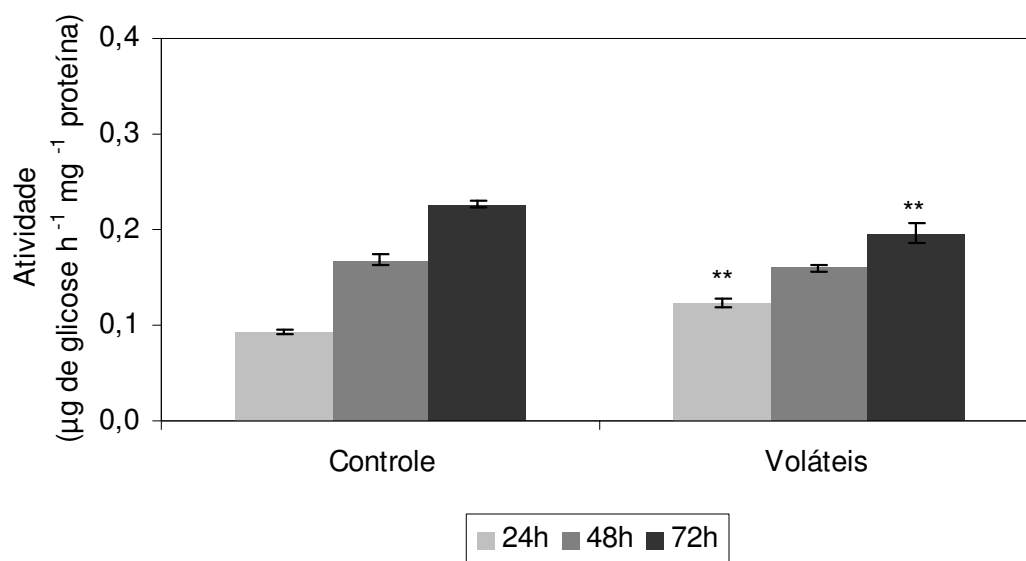


Figura 12 - Atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. Os valores são médias de 3 repetições ( $\pm$  DP). \*\* indica os valores que diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

A parede celular é uma estrutura altamente dinâmica e sujeita a constantes mudanças, como por exemplo, durante a expansão e divisão celular em leveduras, e durante a germinação de esporos, ramificação da hifa e formação de septos em fungos filamentosos. Os polímeros constituintes da parede, em especial quitina e  $\beta$ -1,3-glucana, formam uma rede cruzada e complexa de forma que a manutenção da plasticidade durante a morfogênese é dependente da atividade de enzimas hidrolíticas, como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, encontradas intimamente associadas à parede celular (ADAMS, 2004).

A função e regulação de genes relacionados à atividade quitinolítica e glucanolítica são mais conhecidas e estudadas em *S. cerevisiae*. Em fungos filamentosos, destacam-se os fungos patógenos a humanos (*A. fumigatus*, *Coccidioides posadasii* e *C. immitis*), sendo que muitas dessas enzimas foram associadas à remodelagem da parede celular durante a morfogênese (ADAMS, 2004).

As quitinases são encontradas no micélio fúngico em fase ativa de crescimento juntamente com a quitina sintetase (GOODAY et al., 1986; HEARN et al., 1997). O

presente estudo constatou a inibição da atividade quitinolítica em virtude da exposição aos voláteis.

Quando o gene *CHIA*, codificante de uma quitinase em *A. fumigatus*, é interrompido, a frequência de esporulação e a taxa de crescimento micelial são reduzidas (TAKAYA et al., 1998). O trisacarídeo allosamidina, um potente inibidor de diversas quitinases fúngicas, teve ação fungistática sobre *P. chrysogenum*, inibindo o desenvolvimento da extremidade das hifas (SAMI et al., 2001).

Em *S. cerevisiae*, os genes *GAS1* e *GAS5*, codificantes de  $\beta$ -1,3-glucanases, são expressos durante o crescimento vegetativo, enquanto os genes *GAS2*, *GAS3* e *GAS4* apresentam expressão diferencial durante a meiose e esporulação (ADAMS, 2004). A interrupção do gene *GAS1* aparentemente reduz a ligação cruzada entre a 1,3- $\beta$ -glucana e outros polímeros constituintes da parede celular e acarreta diversos defeitos morfológicos (POPOLO; VAI, 1999). Também têm sido identificados genes relacionados em fungos patogênicos a humanos (ADAMS, 2004).

Uma 1,3- $\beta$ -glucanase de 120 kDa é importante na morfogênese de *C. immitis*. A desativação do gene provoca a redução da taxa de desenvolvimento durante a fase parasítica e da taxa de crescimento micelial. Além disso, houve drástica diminuição da virulência deste microrganismo em seu hospedeiro (COLE; HUNG, 2001; HUNG et al., 2001).

No presente trabalho houve elevação da atividade da 1,3- $\beta$ -glucanase nas primeiras 24h de exposição aos voláteis, sendo verificado a redução apenas após 72h. A elevação da atividade pode estar relacionada a processos de autólise. Durante a autólise, a atividade de enzimas líticas se eleva substancialmente, particularmente as 1,3- $\beta$ -glucanase e quitinases, capazes de hidrolisar os polissacarídeos constituintes da parede celular (WHITE et al., 2002). A autólise pode ocorrer devido a fatores intrínsecos como envelhecimento da cultura, morte celular programada e diferenciação da hifa, além disso, fatores extrínsecos como condições limitantes de oxigênio e nutrientes, e estresses físicos também podem desencadear o processo (WHITE et al., 2002).

A exposição do fungo a álcoois, o principal componente da mistura artificial de voláteis, pode reduzir a assimilação de glicose pela célula (JACOBSEN, 1995). Uma resposta inicial do fungo para a redução na disponibilidade da fonte de carbono poderia



ser a autólise que também é considerada uma estratégia de sobrevivência, com partes da cultura sobrevivendo pela reciclagem dos produtos da lise, liberados pelas hidrolases (WHITE et al., 2002). Portanto, as  $\beta$ -1,3-glucanases podem quebrar a  $\beta$ -1,3-glucana presente na parede celular e disponibilizar monômeros de glicose, os quais podem ser utilizados como fonte de carbono pela célula por algum tempo.

No tocante a enzima lacase, foram constatadas diferenças significativas na atividade da mesma em função do tempo de exposição aos voláteis (Figura 13).

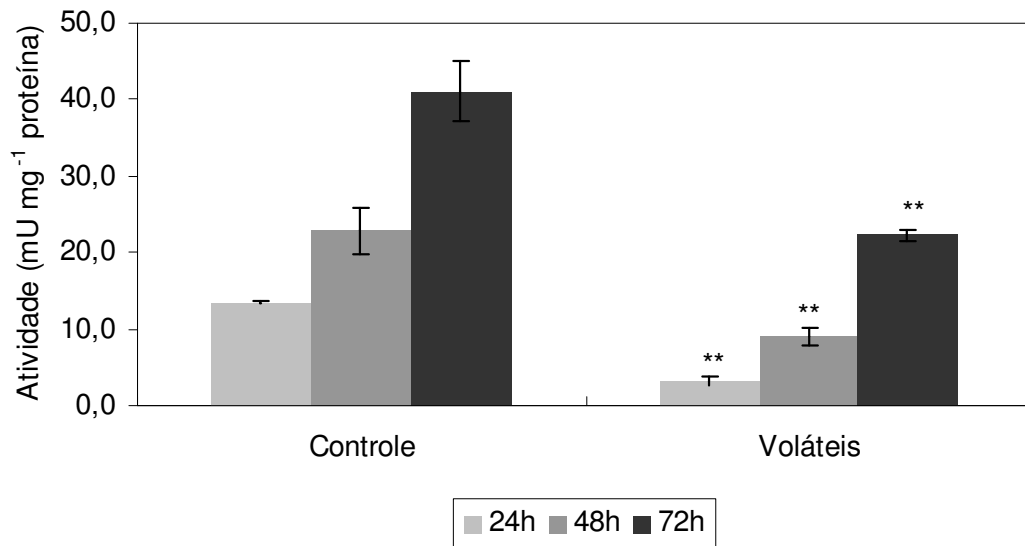


Figura 13 - Atividade da lacase de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis (0,48  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> de ar), identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. Os valores são médias de 3 repetições ( $\pm$  DP). \*\* indica os valores que diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

A atividade aumentou com a idade da cultura mesmo na presença da mistura artificial, no entanto, em níveis mais baixos em relação ao controle. Após 72h de exposição aos voláteis, a atividade específica foi de 22,334 mU mg<sup>-1</sup> proteína, enquanto o tratamento controle apresentou atividade de 41,121 mU mg<sup>-1</sup> proteína, ou seja, uma inibição de 46%.

O papel da lacase é bem documentado em fungos degradadores de madeira, cuja função primordial é ser excretada no meio e oxidar a lignina. Além disso, lacases intracelulares tem papel na transformação de compostos fenólicos de baixa massa molecular, e as lacases associadas à parede celular e esporos participam na formação

de melanina e outros compostos protetores da parede (BALDRIAN, 2006). Uma lacase do basidiomiceto *Lentinula edodes* tem papel na morfogênese do micélio (ZHAO; KWAN, 1999). Por sua vez, em *A. nidulans*, uma lacase é especificamente expressa em conídios (ARAMAYO; TIMBERLAKE, 1990).

Das, Sengupta e Mukherjee (1997) identificaram duas lacases (L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>) em *Pleurotus florida*, sendo uma delas correlacionada com o crescimento micelial do fungo. A linhagem mutante, com o gene codificante da lacase L<sub>2</sub> desativado, apresentou crescimento reduzido e não pôde formar corpo de frutificação.

Foi demonstrado em fungos que lacases estão envolvidas em etapas específicas da biosíntese de melanina. Estas enzimas mediam a polimerização do precursor imediato 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) em DHN-melanina, entretanto, o DHN possui propriedades antibióticas. Desta forma, poderia se especular que a regulação negativa da atividade lacase poderia resultar no acúmulo do antibiótico DHN, resultando na redução do desenvolvimento (DUFFY; SCHOUTEN; RAAIJMAKERS, 2003).

A lacase pode possuir papel importante como fator de virulência em fitopatógenos. Binz e Canevascini (1996) demonstraram, embora ainda não de forma muito clara, que a secreção de lacases por *Ophiostoma novo-ulmi* é responsável pela doença do olmo holandês (*Dutch elm disease*).

*Botrytis cinerea* é capaz de reduzir os efeitos tóxicos de compostos de defesa vegetal, como estilbenos, isoflavonóides, cumarinas e sesquiterpenos. A fitoalexina resveratrol, produzida por videiras em resposta ao ataque de *B. cinerea*, é detoxificada através da oxidação realizada por uma lacase de 32 kDa (ESPIN, 2000).

Como ocorreu para a lacase, a atividade tirosinase também se elevou no decorrer do tempo, mesmo quando o fungo foi exposto aos voláteis, embora em níveis reduzidos em relação ao controle, sendo máxima após 72h (Figura 14).

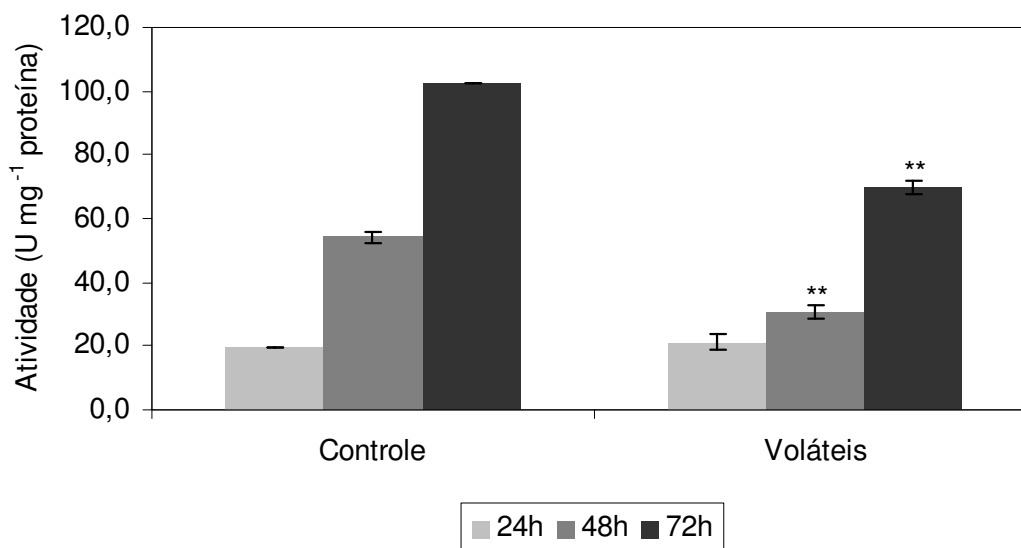


Figura 14 - Atividade da tirosinase de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. Os valores são médias de 3 repetições ( $\pm$  DP). \*\* indica os valores que diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

Não houve redução da atividade nas primeiras 24h de exposição aos voláteis, sendo o efeito constatado apenas nos tempos de 48 e 72h (inibição de 43 e 32%, respectivamente). A análise da atividade tirosinase em PAGE-nativo (Figura 15) demonstrou que *G. citricarpa* produz, em condições normais, pelo menos quatro isoformas da enzima, que tem as suas atividades elevadas com o tempo de cultivo sendo máxima no tempo de 72h. No entanto, foi possível observar a diminuição da intensidade das bandas quando ocorre a adição dos voláteis, fato também observado na quantificação da atividade enzimática realizada através de espectrofotometria.

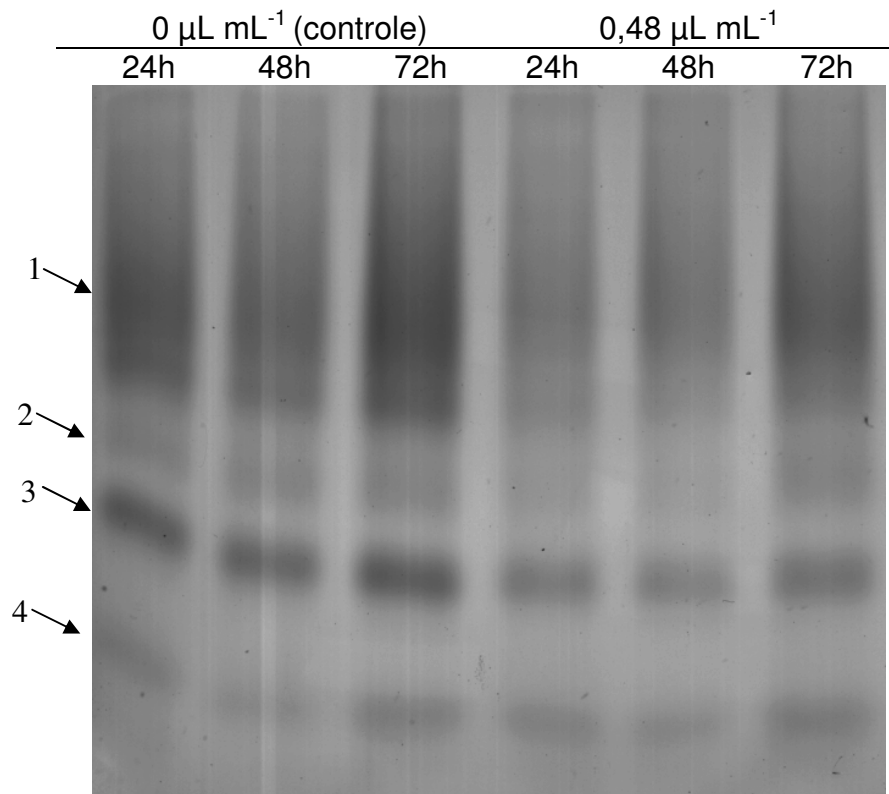


Figura 15 - Atividade em PAGE-nativo da tirosinase de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis, identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. As setas indicam o número de isoformas presentes

Van Leeuwen e Wichers (1999) mostraram que a atividade da tirosinase e a composição de isoformas variam em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento em *Agaricus bisporus*. O possível significado fisiológico das múltiplas formas está nas suas diferentes propriedades catalíticas, como afinidade e especificidade pelos substratos fenólicos, sensibilidade a inibidores, pH e temperatura ótima, estabilidade térmica e compartimentalização celular.

Ascomicetos formadores de líquens da sub-ordem Peltigerinae apresentaram elevação na atividade de tirosinases e lacases quando submetidos a estresse mecânico (LAUFER; BECKETT; MINIBAYEVA, 2006), sendo que o estresse hídrico aumentou apenas a atividade de lacase.

A maioria dos trabalhos relata o efeito de compostos não voláteis sobre a atividade de lacases e tirosinases. O composto N-hidroxiglicina produzido por *P. citrinum*, não inibe a tirosinase, no entanto, é um potente inibidor da atividade da lacase

em fungos e plantas (ZHANG; KJONAAS; FLURKEY, 1999). O ácido kójico, produzido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, possui atividade inibitória sobre tirosinases de várias espécies de basidiomicetos, *Aspergillus* e *Neurospora crassa* (KIM; UYAMA, 2005). Também há relatos da inibição da lacase por cucurbitacinas (VITERBO et al., 1992), e tirosinase pela cisteína (KERMASHA et al., 1993).

O único trabalho que avalia o efeito de compostos voláteis na atividade de enzimas, relata que os voláteis produzidos por bactérias isoladas de solo inibiram totalmente a atividade de lacases em *Phanaerochaete magnoliae* e reduziram significativamente em *T. viride*. A atividade tirosinase em *T. viride* não foi afetada por nenhum dos isolados bacterianos, mas a atividade em *P. magnoliae* foi aumentada, inibida ou não afetada dependendo do isolado ao qual o mesmo foi exposto (MACKIE; WHEATLEY, 1999).

Essas fenoloxidasas possuem papel importante na morfogênese fúngica e têm sido correlacionadas com a produção do micélio aéreo em *Phelebia radiata* (WHITE; BODDY, 1992) e na produção das fases emergentes em *Hypholoma fasciculare* (GRIFFITH; RAYNER; WILDMAN, 1994). É sugerido que a existência de uma complexa relação entre a morfogênese micelial e atividade de fenoloxidasas (GRIFFITH; RAYNER; WILDMAN, 1994) pode explicar a redução do crescimento de fungos quando expostos aos voláteis.

### **2.3.5 Efeito da mistura artificial de voláteis na atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo**

No intuito de verificar um possível estresse oxidativo causado em *G. citricarpa* em função da exposição aos compostos voláteis, foi determinada a atividade de algumas enzimas antioxidantes responsáveis pela defesa contra as espécies ativas de oxigênio (EAOs).

A atividade da superóxido dismutase (SOD), enzima que catalisa a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$  a partir de radicais superóxido ( $O_2^{*-}$ ), foi avaliada através de PAGE-nativo (Figura 16).

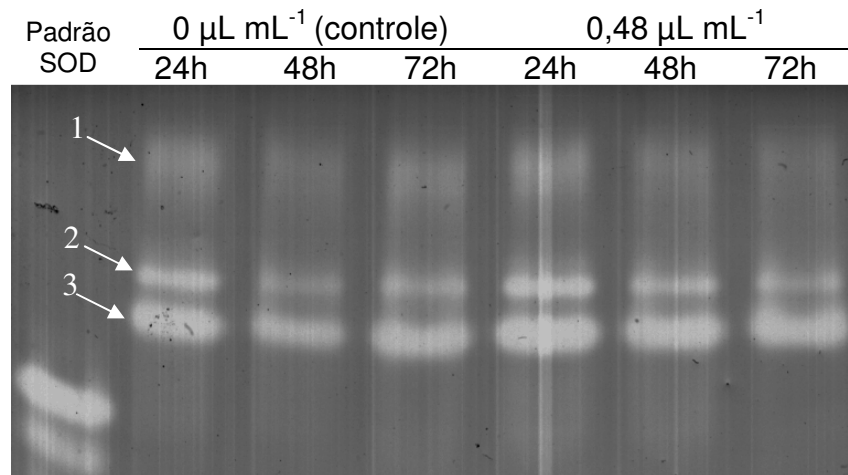


Figura 16 - Atividade em PAGE-nativo da superóxido dismutase (SOD) de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis, identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. As setas indicam o número de isoformas presentes. Como padrão foi utilizado SOD de fígado bovino (2 unidades)

Foi possível observar três isoformas ativas, sendo que a isoforma 3 apresentou maior atividade em relação às demais. Quando *G. citricarpa* foi exposto à mistura artificial de voláteis, foi observado aumento de atividade das isoformas 2 e 3 nos três tempos de avaliação quando comparado ao controle. Não foram verificadas alterações significativas na atividade da isoforma 1.

Como na maioria dos eucariotos, a principal SOD em *N. crassa* e *S. cerevisiae* é a Cu, Zn SOD codificada pelo gene *SOD1*, a qual é responsável pela remoção do radical  $\text{O}_2^{*-}$  no citoplasma e possivelmente também dos peroxissomos. O papel fisiológico da Mn SOD codificada pelo gene *SOD2* é de proteger a mitocôndria do radical  $\text{O}_2^{*-}$  gerado durante a respiração, e parece ter pouca importância no combate aos ânions gerados por compostos de origem exógena (JAMIESON, 1998; GESSLER et al., 2006). Em *N. crassa* a atividade total de SOD aumentou durante a germinação do conídio e transição do crescimento da cultura para a fase estacionária (GESSLER et al., 2006).

A exposição de *A. nidulans* ao metal pesado cádmio elevou a atividade total de SOD, no entanto, sem haver aumento diferencial para alguma das três isoformas produzidas. Porém, houve decréscimo da atividade no tempo mais prolongado de exposição ao metal (GUELFÍ et al., 2003). Os mesmos autores também verificaram

aumento da atividade da catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR), com o aumento da concentração e tempo de exposição ao xenobiótico.

No presente trabalho, também foi verificada a influência da mistura artificial de voláteis sobre a atividade da enzima CAT, responsável pela decomposição do  $H_2O_2$ , originando como produtos  $H_2O$  e  $O_2$  (Figura 17).

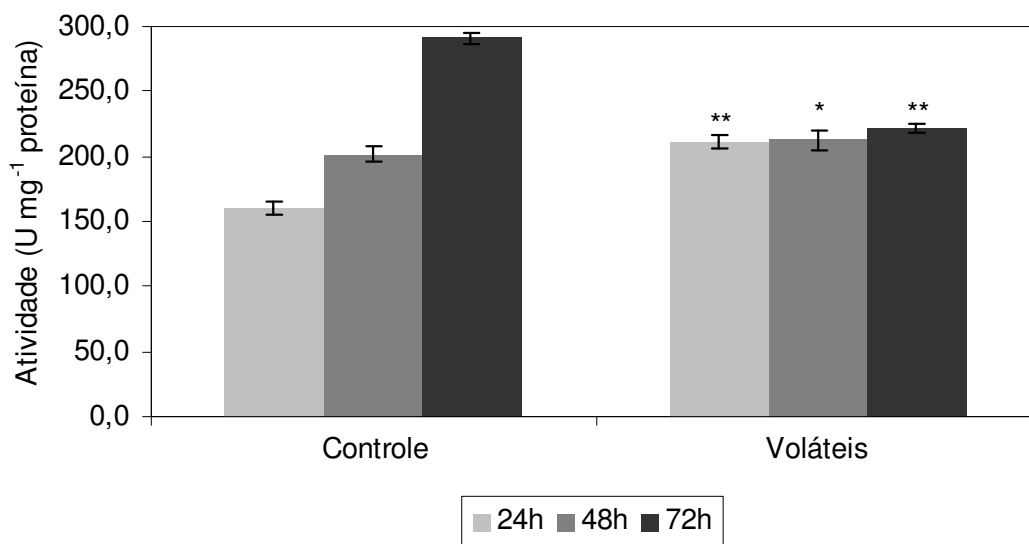


Figura 17 - Atividade da catalase de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. Os valores são médias de 3 repetições ( $\pm$  DP). \*\* e \* indicam os valores que diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ) e ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente

Foi verificado aumento da atividade da CAT nas primeiras 24h de exposição aos compostos orgânicos voláteis em relação ao controle, indicando o aumento da produção de  $H_2O_2$  nessa condição, refletindo na elevação da atividade enzimática em 32%. Já no período de 48h de exposição, não houve elevação significativa da atividade, e após 72h a atividade foi reduzida em 24% em relação ao controle.

A detoxificação do  $H_2O_2$  pela CAT é de extrema importância no sistema antioxidativo. Foi demonstrado em fungos filamentosos, que há mais de um gene para a CAT, sendo que, dois genes (*CATA* e *CATB*) foram inicialmente caracterizados em *A. nidulans* (KAWASAKI et al., 1997), sendo possível existir um terceiro (*CATC*) (TAKASUKA et al., 1999). Entretanto, Kawasaki e Aguirre (2001) mostraram que um mutante para os três genes ainda era capaz de crescer normalmente quando exposto a

compostos geradores de  $H_2O_2$ , fornecendo evidências para um quarto gene, *CATD*. A CAT A, produto do gene *CATA* de *A. nidulans*, é expressa durante a esporulação e está associada exclusivamente com os processos assexuais e sexuais de formação de esporos resultando no acúmulo da enzima ativa em conídios e ascósporos, respectivamente (NAVARRO; AGUIRRE, 1998). O gene *CATB* é expresso somente no micélio vegetativo. A exposição de *A. nidulans* ao  $H_2O_2$ , paraquat, choque térmico e ácido úrico causou a expressão de *CATB*, mas não de *CATC*. O gene *CATD* foi induzido pela falta de glicose na fase estacionária de crescimento, temperaturas elevadas e em menor nível pelo  $H_2O_2$  (KAWASAKI; AGUIRRE, 2001).

Malolepsza (2004) demonstrou que a CAT é um importante fator na infecção de *B. cinerea* em plantas de tomate. Um composto semiderivado da rutina, flavonóide comumente presente em plantas, inibiu em até 50% a atividade da CAT no fungo reduzindo a sua capacidade em detoxificar o  $H_2O_2$  gerado pelo hospedeiro.

Azevedo et al. (2007) relataram que o fungo aquático *Heliscus submersus* tem a CAT como principal mecanismo antioxidativo contra o metal cobre. A atividade da SOD apresentou elevação quando exposto ao estresse agudo, no entanto, foi inibida em concentrações elevadas e tempos prolongados de exposição, porém a atividade da CAT se elevou com o aumento da concentração do metal. Segundo os autores, essa característica faz com que este fungo, isolado de águas poluídas, seja mais tolerante a metais do que *Varicosporium elodeae*, fungo aquático isolado de águas limpas, e que apresentou elevação menos pronunciada da atividade da CAT.

No presente trabalho, os resultados provenientes da determinação da atividade GR, demonstraram que esta via antioxidativa não é afetada pelos compostos orgânicos voláteis nos diferentes tempos de exposição (Figura 18).



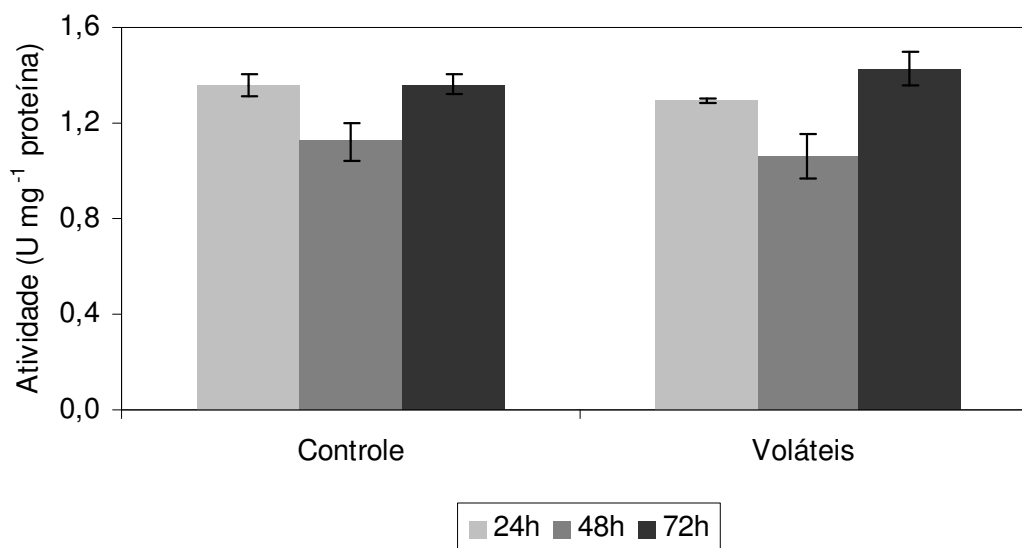


Figura 18 - Atividade da glutathione redutase de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, por diferentes tempos. Os valores são médias de 3 repetições ( $\pm$  DP)

Embora a atividade enzimática em relação ao tratamento controle tenha decrescido 4,9 e 5,5% após 24 e 48h, respectivamente e se elevado 4,8% após 72h de exposição aos voláteis, essas mudanças foram pequenas e não significativas estatisticamente.

Esse sistema antioxidativo é composto pela glutathione em conjunto com duas enzimas, glutathione peroxidase (GPx) e a GR. Esse sistema catalisa a transformação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água, sendo que a glutathione opera em ciclos entre sua forma oxidada (GSSH) e sua forma reduzida (GSH). A GSH reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a água na presença da GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSSH é regenerada pela GR (APEL; HIRT, 2004). Além de participar de processos de detoxificação celular de EAOs, a GSH pode reagir enzimaticamente através da ação da glutathione-S-transferase (GST) ou de forma espontânea com diversos compostos, tais como metais e outros xenobióticos formando conjugados de GSH (APEL; HIRT, 2004).

No presente estudo, outro sistema que não o da glutathione pode estar sendo utilizado. Uma via complexa constituída por tioredoxinas, a qual funciona em paralelo ao da glutathione, também poderia ser importante para a manutenção do equilíbrio GSH/GSSH por *G. citricarpa* (MULLER, 1996).

O gene codificante da GR (*GLR1*) em *S. cerevisiae* foi identificado, e linhagens mutantes, embora ainda viáveis, acumularam GSSH em excesso e se mostraram hipersensíveis aos oxidantes (GRANT et al., 1996).

Estudos sobre a via da glutatona envolvendo fungos filamentosos são escassos e os resultados não são claros ou contraditórios quando comparados aos estudos com leveduras (LI; MCNEIL; HARVEY, 2008). Foi demonstrado em *A. niger* que a GPx, enzima pertencente ao ciclo da glutatona, não é importante na defesa contra o estresse oxidativo (BAI; HARVEY; MCNEIL, 2003). Em *P. chrysogenum*, a atividade da GPx, GR e o ciclo da glutatona foram induzidos por altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno, no entanto, a concentração de GSH teve fraco aumento, enquanto GSSH aumentou significativamente resultando no desequilíbrio da homeostase da glutatona (EMRI; POCSI; SZENTIRMAI, 1997).

Embora a resposta antioxidativa tenha sido extensivamente estudada, principalmente em procariotos, além de leveduras, células animais e vegetais, informações relacionadas a fungos filamentosos ainda são muito fragmentadas, sendo a maior parte dos estudos desenvolvidos em *N. crassa* e *A. niger* (ANGELOVA et al., 2005). Sabe-se que as repostas podem variar de acordo com o microrganismo, concentração e natureza do agente causador do estresse, condições de cultivo, idade da cultura entre outros fatores diversos. Além disso, não existem trabalhos anteriores relatando o efeito de compostos voláteis na atividade de enzimas antioxidativas.

Os resultados demonstram que *G. citricarpa* possui as enzimas SOD, CAT e GR em condições fisiológicas normais. Nessa situação, os mecanismos de defesa antioxidativos são certamente adequados para o reparo de danos celulares e manutenção das EAOs em um nível basal não destrutivo (ANGELOVA et al., 2005).

Além das enzimas antioxidativas serem importantes na proteção contra EAOs geradas durante o metabolismo celular normal, e exposição a diversos agentes estressantes como luz UV, metais pesados e fungicidas, esses mecanismos de detoxificação são necessários em fitopatógenos contra os oxidantes liberados pela planta como resposta primária de defesa. Esses compostos podem ter uma atividade antimicrobiana direta e/ou podem sinalizar a ativação de mecanismos latentes de defesa vegetal (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

O aumento na atividade da SOD e CAT fornece indicativos de que a exposição aos voláteis desencadeou a formação  $O_2^{*-}$  e  $H_2O_2$ , já que aquelas enzimas são diretamente responsáveis pela eliminação dessas EAOs. A exposição de bactérias, leveduras e fungos filamentosos ao paraquat, um herbicida que gera especificamente  $O_2^{*-}$ , aumentou a síntese da SOD, mas não de CAT (MORADAS-FERREIRA et al., 1996; BUSSINK; OLIVER, 2001; AMO; ATOMI; IMANAKA, 2002). Angelova et al. (2005) confirmaram que o paraquat induz a produção de SOD em fungos filamentosos, enquanto que a exposição ao  $H_2O_2$  exógeno causa elevação da atividade de CAT.

Embora tenha sido observada uma resposta inicial da SOD e CAT frente a possível geração de EAOs provocada pelos voláteis, o fungo ainda assim tem o seu crescimento inibido. Isso pode ocorrer devido à incapacidade do fitopatógeno em manter a defesa antioxidativa, de tal modo que passa a sofrer as conseqüências do acúmulo intracelular de EAOs. Esse fato foi verificado no presente trabalho, uma vez que houve redução da atividade da CAT em períodos superiores à 24h de exposição aos voláteis, tendo como conseqüência o acúmulo intracelular de  $H_2O_2$ .

Outra via antioxidativa, a da glutatona, que também tem papel importante na detoxificação de EAOs, entre elas o  $H_2O_2$ , parece não ter sido ativada pela exposição aos voláteis. Além disso, a interferência dos voláteis em outros processos celulares importantes pode refletir por conseqüência no decréscimo da atividade antioxidativa, após uma resposta de defesa inicial. Isso é reforçado pelos dados que mostram a diminuição na síntese de proteínas (Figura 7), já que a concentração de proteínas por grama de micélio sofreu decréscimo de 21% quando o fungo foi exposto aos voláteis.

O tratamento com ciclohexamida impediu a adaptação de *A. niger* a altas concentrações de  $H_2O_2$ , via pré-exposição à baixa concentração desse agente estressante (LI; MCNEIL; HARVEY, 2008). O composto também impediu o aumento da atividade da SOD e CAT em diversos fungos, indicando que a síntese protéica *de novo* é requerida para a indução de enzimas antioxidantes em condições de estresse (ANGELOVA et al., 2005). Os mesmos autores também verificaram que a redução na atividade antioxidante causada pela inibição da síntese de proteínas elevou em três vezes o dano oxidativo de proteínas intracelulares.

### 2.3.6 Análise proteômica

A Figura 19 apresenta o perfil eletroforético (SDS-PAGE) das amostras obtidas para realização da eletroforese bidimensional. Não foram observadas alterações significativas no perfil com relação à indução ou repressão de proteínas específicas, no entanto, as amostras demonstraram possuir boa qualidade podendo ser submetidas à eletroforese bidimensional.

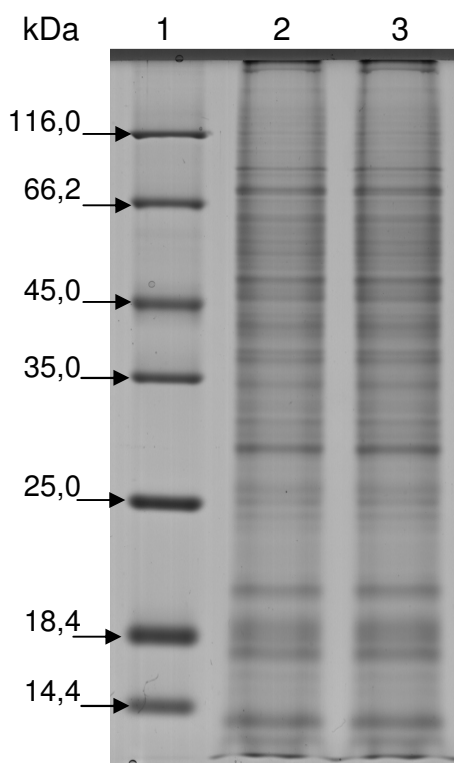


Figura 19 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas extraídas do micélio de *G. citricarpa* exposto à mistura artificial de voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar) identificados em *S. cerevisiae*. Padrão de massa molecular (1), controle (2) e voláteis (3). Foram aplicadas  $20 \mu\text{g}$  de proteína total por canaleta

A alteração dos proteoma de *G. citricarpa* quando exposto durante 12h aos compostos orgânicos voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) foi determinada através de eletroforese bidimensional. A Figura 20 apresenta os tratamentos com as respectivas triplicatas dos géis. Para a primeira dimensão foram utilizadas fitas com gradiente não linear de pH 3 a 10. Para a segunda dimensão foi realizado SDS-PAGE 12,5% em poliacrilamida. Após coloração com *coomassie brilliant blue* foram obtidos géis sem distorções e com boa definição dos *spots*.

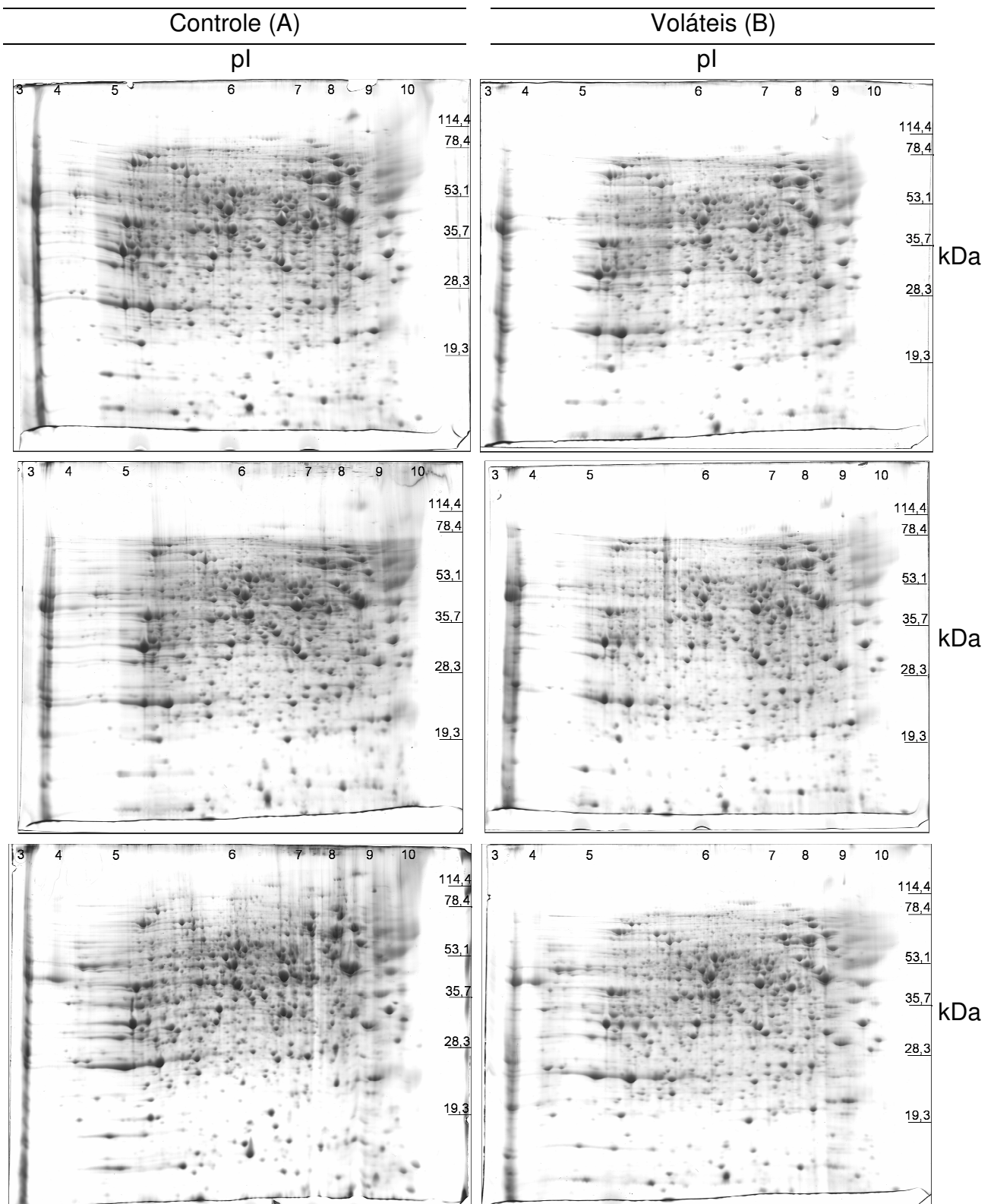


Figura 20 - Mapa das proteínas de *G. citricarpa* obtido através de eletroforese bidimensional. Em (A) são apresentadas as triplicatas dos géis referentes ao tratamento controle, e em (B) ao tratamento de exposição por 12h à mistura artificial de voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar)

A ampla faixa de pH utilizada favoreceu a distribuição mais uniforme das proteínas no gel e permitiu ter uma visão geral da distribuição das proteínas produzidas pelo fungo. Além disso, a maior resolução entre o pH 5 e 7, onde se concentrou a maior parte das proteínas, foi favorecida pelo gradiente não linear. Foram detectados 670 *spots* dos quais em torno de 597 apresentaram alinhamento com o gel de referência. A massa molecular aparente dessas proteínas variou entre 8,09 e 91,59 kDa, sendo que a maior parte possuía entre 20 e 40 kDa (34%) (Figura 21a). Com relação ao ponto isoelétrico (pI), os valores oscilaram entre 4,48 e 9,98, sendo que 70% das proteínas apresentaram pI ácido, entre 5 e 7 (Figura 21b).

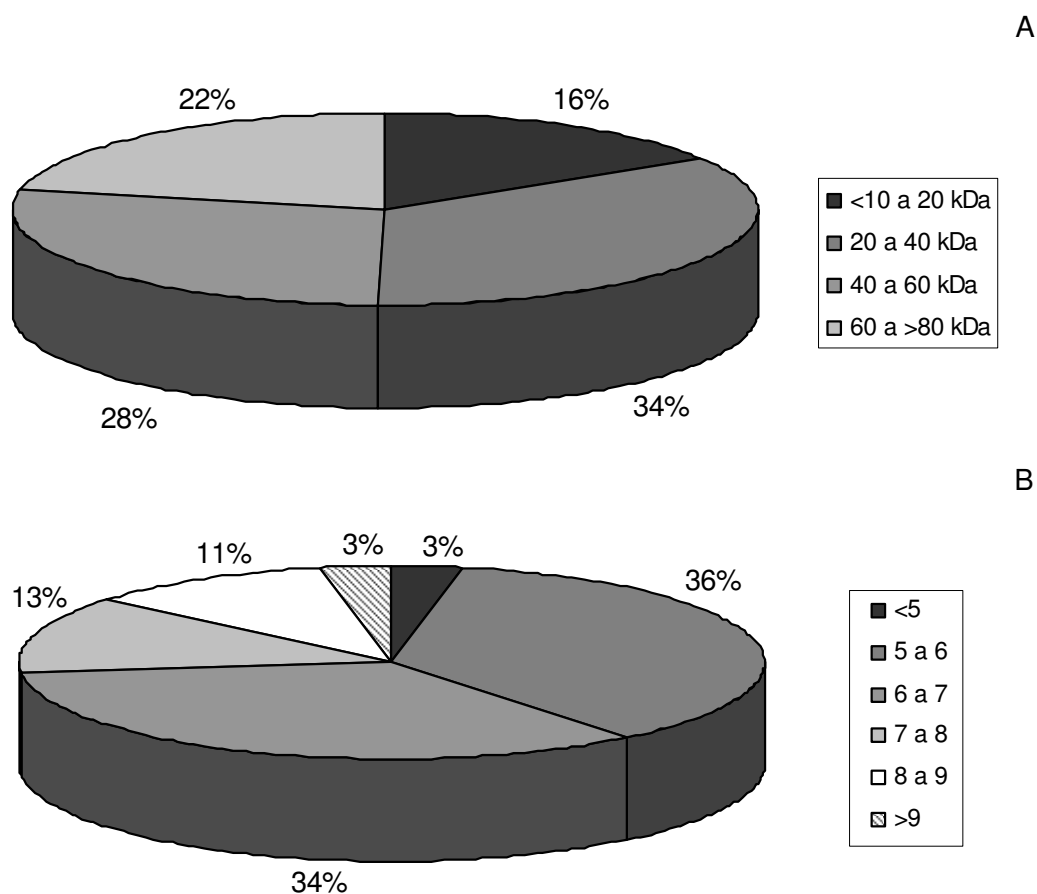


Figura 21 - Caracterização das proteínas de *G. citricarpa* (controle) detectadas através de eletroforese bidimensional em função da massa molecular (A) e ponto isoelétrico aparente (B)

Os volumes dos *spots* foram normalizados para todos os géis e expressos em porcentagem, sendo esses valores utilizados na análise comparativa entre os tratamentos (controle e exposição aos voláteis). A expressão diferencial de proteínas entre os tratamentos foi considerada significativa apenas quando a alteração era superior a 1,4 vezes e estivesse presente de forma consistente nas triplicatas ( $p \leq 0,05$ ).

A exposição do fungo aos voláteis promoveu alteração significativa na expressão de 40 proteínas, ou seja, 6,7% das proteínas detectadas em *G. citricarpa* (Figura 22). Destas, 29 foram inibidas entre 29 e 58% e 11 apresentaram aumento na expressão variando entre 47 e 97%. As proteínas que tiveram a maior redução e elevação na expressão em função do tratamento foram respectivamente, os *spots* 713 e 535 (Tabela 3).

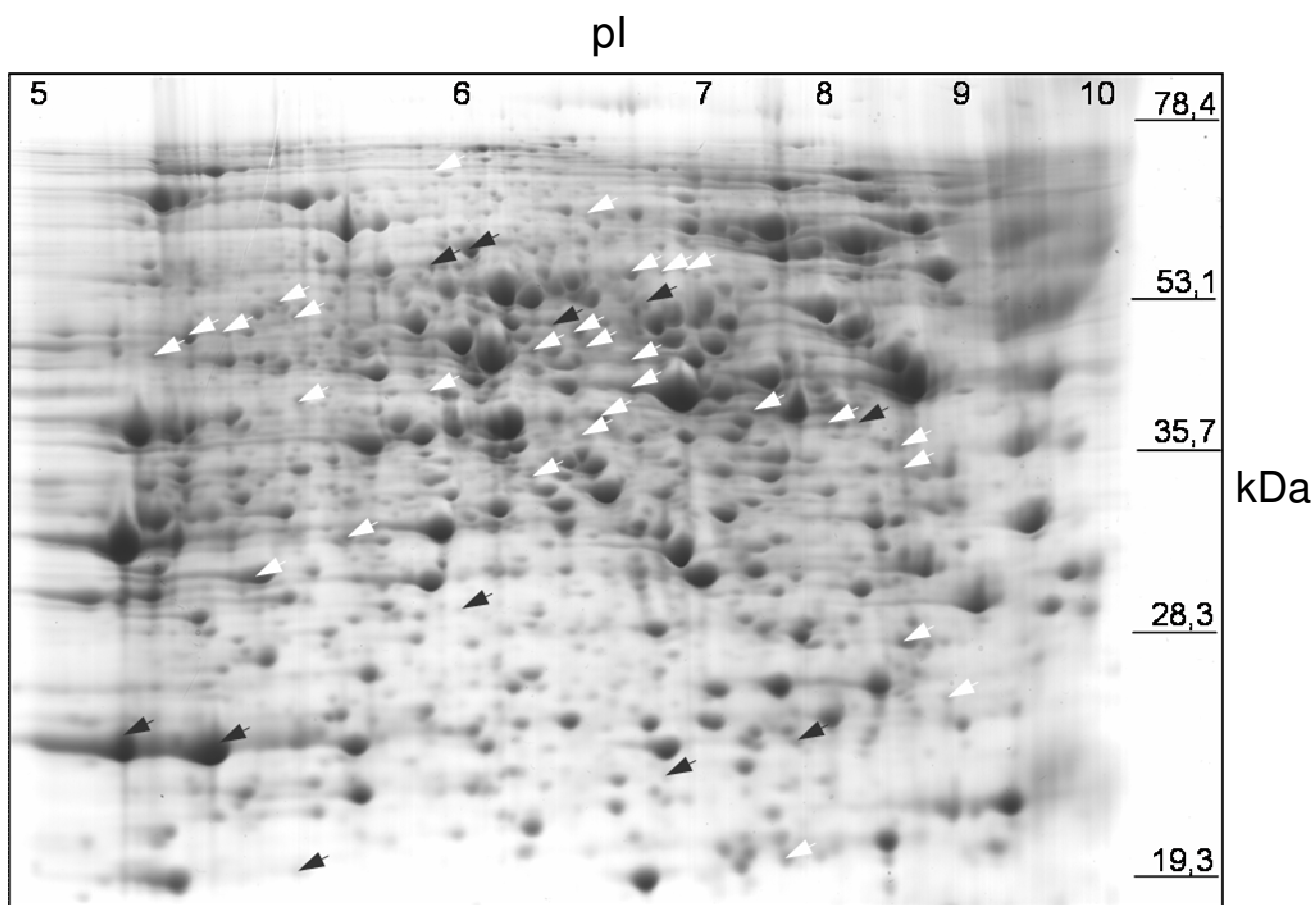


Figura 22 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em *G. citricarpa*, após 12h de exposição aos compostos orgânicos voláteis ( $0,48 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar). Setas brancas indicam redução e as pretas, aumento da expressão

Tabela 3 - Caracterização das proteínas diferencialmente expressas por *G. citricarpa* em função da exposição aos compostos orgânicos voláteis

Spot	Abundância relativa (%)		Variação (%)	MM kDa	pI	Spot	Abundância relativa (%)		Variação (%)	MM kDa	pI
	Controle	Voláteis					Controle	Voláteis			
713	0,137	0,057	-58,3	45,16	6,32	727	0,054	0,033	-38,7	45,04	7,93
133	0,164	0,073	-55,5	56,38	6,24	716	0,038	0,024	-37,8	58,42	5,69
13	0,043	0,019	-55,3	82,76	5,97	532	0,137	0,087	-36,5	15,35	7,53
681	0,116	0,057	-50,7	52,75	6,50	704	0,047	0,030	-35,7	47,67	5,70
74	0,054	0,027	-50,4	65,69	6,85	732	0,097	0,067	-31,6	42,72	8,53
146	0,076	0,038	-50,3	55,17	6,26	664	0,049	0,033	-31,6	53,42	6,11
611	0,013	0,006	-48,9	74,74	6,27	403	0,233	0,163	-29,8	26,23	8,57
766	0,058	0,030	-48,0	40,91	8,56	138	0,275	0,194	-29,6	56,68	5,45
700	0,067	0,037	-45,5	48,27	5,95	352	0,629	0,448	-28,8	31,14	5,61
672	0,087	0,047	-45,5	54,22	5,37	480	1,199	1,759	46,6	20,72	5,50
439	0,081	0,045	-44,5	22,91	8,87	812	0,011	0,016	48,4	28,69	6,00
265	0,047	0,027	-42,7	39,24	6,11	890	1,026	1,556	51,6	21,10	5,27
908	0,078	0,045	-41,8	34,15	5,80	212	0,167	0,266	59,0	45,13	8,24
83	0,160	0,095	-41,1	64,90	6,49	487	0,034	0,055	59,3	18,71	6,70
204	0,150	0,089	-40,5	46,49	7,37	71	0,069	0,110	59,5	65,63	5,95
134	0,076	0,045	-40,4	56,64	5,54	647	0,054	0,087	60,8	60,31	6,57
78	0,036	0,022	-40,4	65,49	6,68	623	0,020	0,033	67,9	66,78	6,02
643	0,103	0,062	-39,5	60,81	5,65	652	0,027	0,052	90,5	57,88	6,19
224	0,096	0,058	-39,4	43,28	6,25	844	0,036	0,069	91,2	20,51	7,62
688	0,164	0,100	-39,1	48,73	6,48	535	0,095	0,188	97,1	15,14	5,69



O estudo do proteoma de fungos é relativamente novo, mas alguns estudos foram iniciados com os fungos micoparasitas *T. harzianum* e *T. atroviride*, contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos no controle biológico de fungos fitopatogênicos (BHADAURIA et al., 2007; KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007).

A abordagem proteômica para elucidar os mecanismos envolvidos na interação entre os microrganismos mediada por voláteis, ainda não havia sido empregada. Mesmo estudos envolvendo o antagonismo através de substâncias difusíveis em meio aquoso são escassos.

A natureza do antagonismo de *Streptomyces halstedii* contra o fungo *A. nidulans* foi investigada por Melin, Schnürer e Wagner (2002). A eletroforese bidimensional revelou que 20 proteínas de *A. nidulans* tiveram o nível de expressão aumentado ou reduzido quando na presença do composto antibiótico concanamicina A, produzido por *Streptomyces*. Mais tarde foi relatado que o crescimento de *A. nidulans* foi reduzido em 36% quando na presença de *Lactobacillus plantarum*, produtor de uma ampla gama de compostos antifúngicos. A expressão de diversas proteínas em *A. nidulans* foi alterada quando na presença da bactéria ou de seus compostos antifúngicos. A inibição e as mudanças morfológicas causadas no fungo foram correlacionadas com a alteração na expressão de proteínas (STRÖM; SCHNÜRER; MELIN, 2005).

A análise do proteoma de *S. cerevisiae*, através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, após exposição ao metal pesado cádmio demonstrou que 54 proteínas foram induzidas e 43 reprimidas. Proteínas induzidas incluíam enzimas antioxidativas, proteínas *heat shock*, proteases, enzimas envolvidas nas vias de biosíntese de aminoácidos contendo enxofre e metabolismo de carboidratos, além de proteínas não identificadas ou de função desconhecida. Por outro lado, as proteínas reprimidas pelo metal estavam relacionadas principalmente com o aparato transducional e enzimas do metabolismo (VIDO et al., 2001).

As alterações no proteoma do fungo ectomicorrizico *Boletus edulis* quando exposto ao estresse osmótico foram analisadas. Vinte e duas proteínas sofreram alteração (14 induzidas e 8 reprimidas), sendo que as proteínas estavam envolvidas na biosíntese de metionina e S-adenosilmetionina, glicólise, reparo de DNA, controle do ciclo celular e tolerância ao estresse (LIANG et al., 2007).

Com base nos resultados da eletroforese bidimensional, a próxima etapa da investigação deve ser a identificação das proteínas diferencialmente expressas, através do seqüenciamento pelo uso da espectrometria de massa. Os resultados devem fornecer um mapa global das proteínas e vias metabólicas afetadas pelos voláteis em *G. citricarpa*, e poderá complementar e confirmar os dados obtidos através das análises enzimáticas realizadas no presente trabalho. Além disso, as informações geradas poderão contribuir para o entendimento sobre os mecanismos atuantes nas interações microbianas mediadas por compostos voláteis na natureza.

Com relação às implicações práticas, é possível vislumbrar que esse conhecimento poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de antimicrobianos que afetem especificamente vias metabólicas particularmente vulneráveis em *G. citricarpa*, possibilitando o controle da pinta preta dos citros.

### **2.3.7 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre outros organismos**

#### **2.3.7.1 Fungos e bactérias**

No intuito de verificar o espectro de atividade da mistura artificial de voláteis, diferentes fungos (Figura 23) e bactérias de diferentes grupos foram expostos à concentração de  $2 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar.

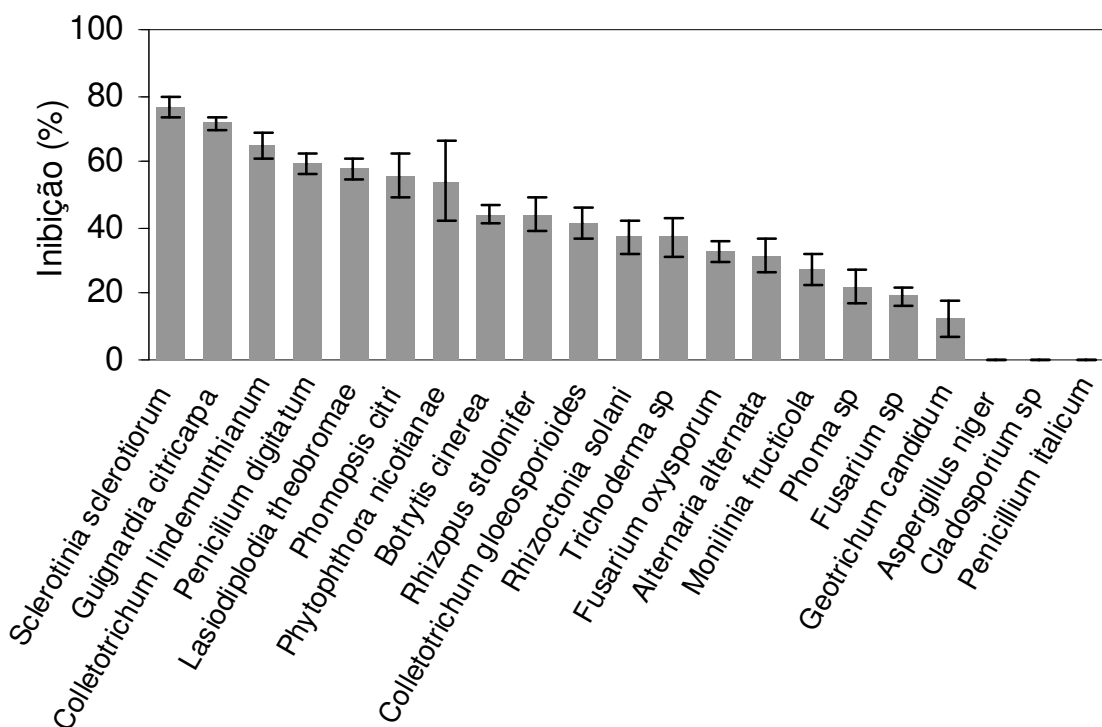


Figura 23 - Influência da adição da mistura artificial de voláteis (100  $\mu\text{L}/\text{placa} = 2 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, sobre o desenvolvimento micelial de diversos fungos. Os valores médios de 5 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição, comparado as placas controle na ausência da mistura artificial de voláteis

A inibição foi verificada em uma ampla gama de fungos pertencentes ao grupo dos ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos, oomicetos e mitospóricos, variando entre 77% (*S. sclerotiorum*) e 12% (*G. candidum*). Além de *S. sclerotiorum*, os fungos *G. citricarpa*, *C. lindemuthianum*, *P. digitatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Phomopsis citri* apresentaram maior sensibilidade aos compostos orgânicos voláteis (inibição acima de 50%).

Os fungos *A. niger*, *Cladosporium sp* e *P. italicum*, e nenhuma das bactérias avaliadas (*Bacillus subtilis*, *Erwinia caratovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas sp* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*) foram inibidas (dados não apresentados). Kerszman (1993) propôs que um dos fatores determinantes da diferença de sensibilidade entre células procarióticas e eucarióticas é a constituição da membrana plasmática.

Também foi avaliada a inibição individual de cada um dos compostos identificados em *S. cerevisiae* sobre os fitopatógenos *C. gloesporioides*, *P. digitatum*, *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* na concentração de  $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ .

O fungo *C. gloesporioides* apresentou maior sensibilidade aos compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol (inibição de 100%). Embora a mistura sintética, contendo todos os componentes, e os compostos isolados (acetato de etila, feniletilalcool e etanol), tenham inibido o fungo significativamente em relação à água, essa inibição pode ser considerada baixa, variando entre 32 e 17%, quando comparada ao 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol (Figura 24).

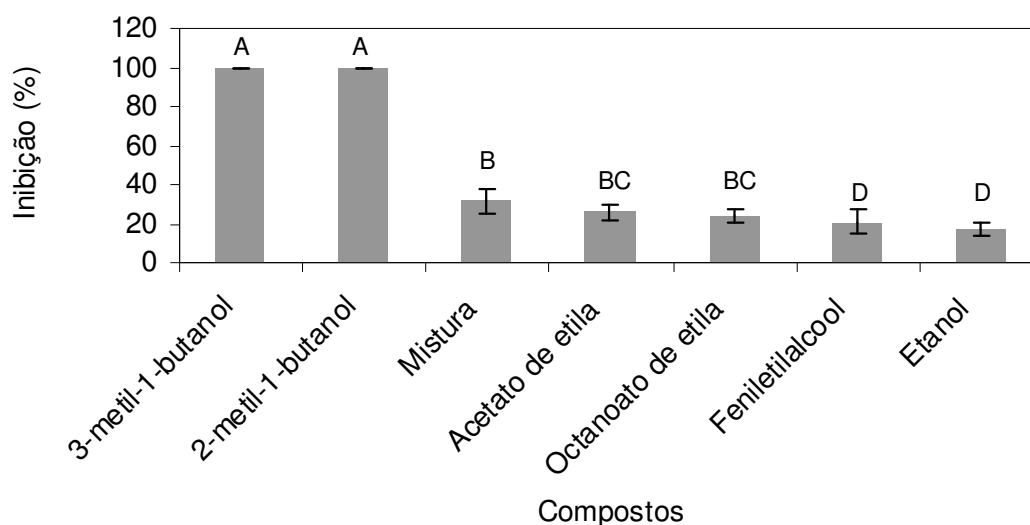


Figura 24 - Influência da adição de compostos orgânicos voláteis ( $50 \mu\text{L/placa} = 1 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, sobre o desenvolvimento micelial de *C. gloesporioides*. Os valores médios de 4 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição, comparado as placas controle na ausência de voláteis. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

*P. digitatum* também apresentou maior sensibilidade aos compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol não sendo, no entanto, totalmente inibido pelos compostos (99 e 89%, respectivamente). O octanoato de etila reduziu o crescimento micelial em 39% e a inibição somada dos outros compostos (feniletilalcool, etanol e acetato de etila) atingiu apenas 25% (Figura 25).

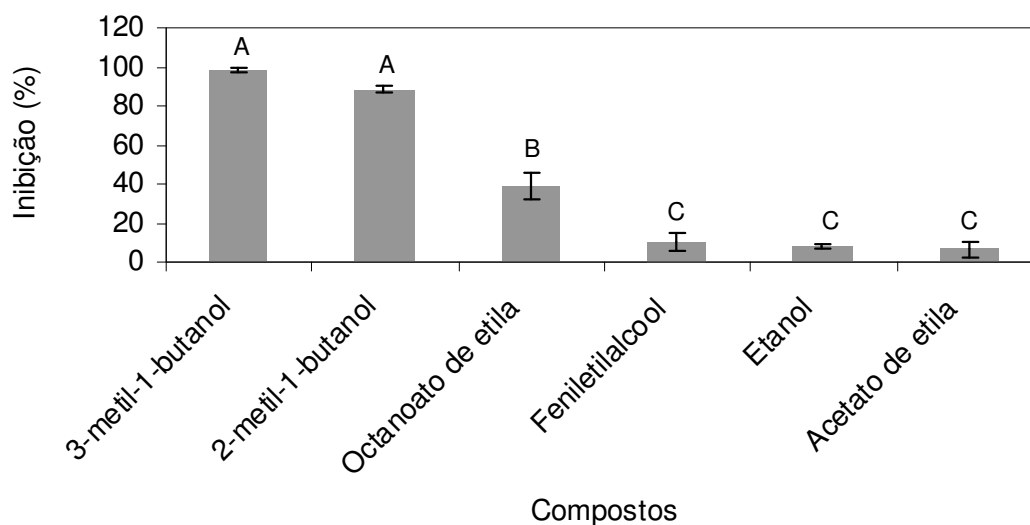


Figura 25 - Influência da adição de compostos orgânicos voláteis (50  $\mu\text{L}/\text{placa} = 1 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, sobre o desenvolvimento micelial de *P. digitatum*. Os valores médios de 4 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição, comparado as placas controle na ausência de voláteis. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi inibido em 99% pelos compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, sendo que o acetato de etila também demonstrou elevada atividade inibitória (87%). Os outros compostos apresentaram baixa atividade sobre o fitopatógeno: octanoato de etila (34%), mistura artificial (17%), feniletilalcool (8%) e etanol (4%) (Figura 26).

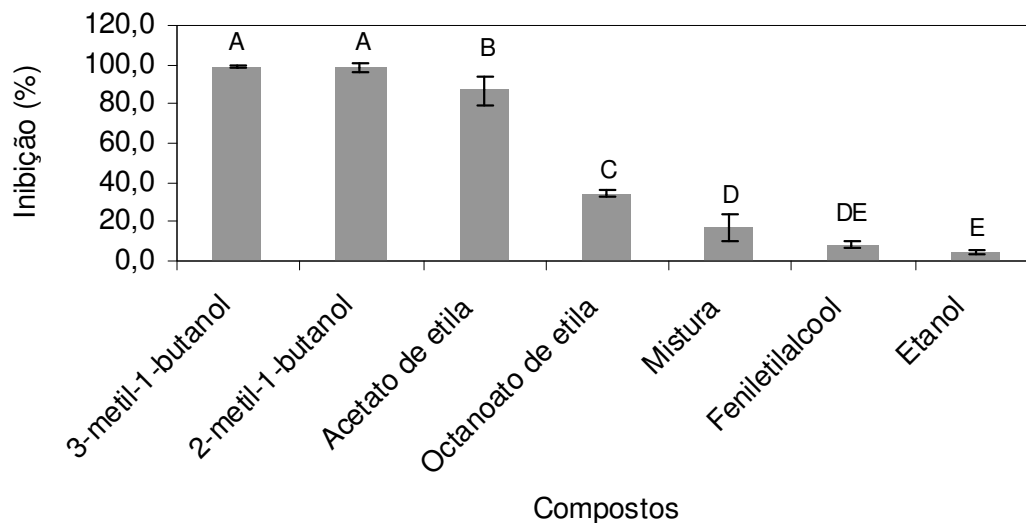


Figura 26 - Influência da adição de compostos orgânicos voláteis ( $50 \mu\text{L}/\text{placa} = 1 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, sobre o desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum*. Os valores médios de 3 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição, comparado as placas controle na ausência de voláteis. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

*F. oxysporum* sofreu maior redução no crescimento micelial quando exposto aos compostos 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (96 e 95% de inibição, respectivamente), enquanto que o octanoato de etila promoveu inibição de 50%. A mistura artificial, acetato de etila e etanol inibiram o fungo em 19% e o feniletalcoool 15% (Figura 27).

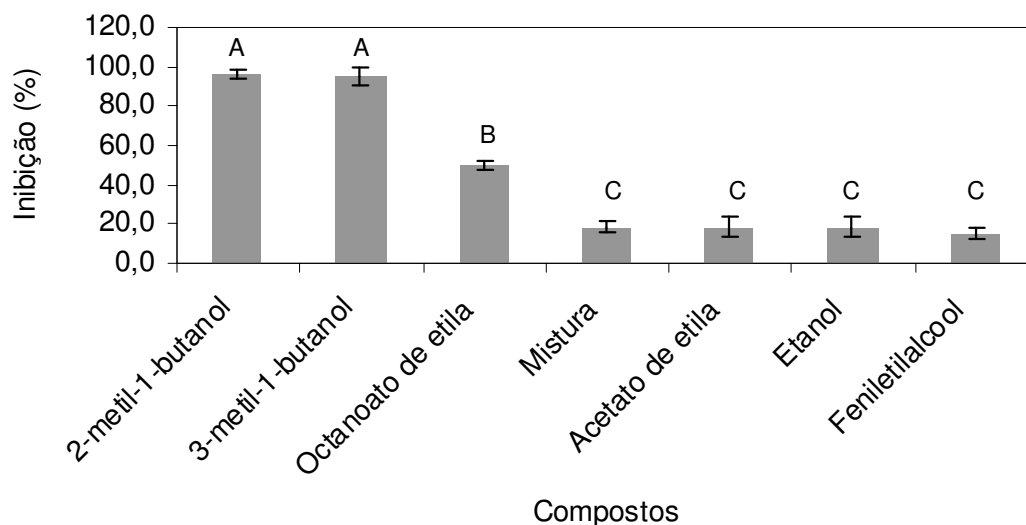


Figura 27 - Influência da adição de compostos orgânicos voláteis ( $50 \mu\text{L}/\text{placa} = 1 \mu\text{L mL}^{-1}$  de ar), identificados em *S. cerevisiae*, sobre o desenvolvimento micelial de *F. oxysporum*. Os valores médios de 3 repetições ( $\pm$  DP) foram calculados como porcentagem de inibição, comparado às placas controle na ausência de voláteis. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

Além de controlar a pinta preta dos citros, é desejável que um método de controle alternativo tenha efetividade sobre outros patógenos de ocorrência na pós-colheita de citros. O fungo *P. digitatum* é o agente causal do bolor verde, considerada a principal doença na pós-colheita de citros. A infecção é dependente de ferimentos e pode ocorrer desde o pomar até a chegada ao consumidor, portanto, podendo ocorrer tanto no armazenamento como durante o transporte. A antracnose, causada por *C. gloesporioides*, outra doença importante na pós-colheita de citros, também ocorre após ferimentos devido a choques ou ataque por pragas.

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

A atividade antimicrobiana de *P. anomala* sobre *P. roqueforti* em grãos de trigo se deu através da produção de etanol e acetato de etila (DRUVEFORS; PASSOTH;

SCHNURER, 2005). Os compostos orgânicos voláteis oriundos de plantas, carvacrol, alil-isotiocianato e cinamaldeído, inibiram o desenvolvimento de *P. notatum* e foram mais eficientes do que o etanol e dióxido de enxofre. Os mesmos autores verificaram sinergia entre os três compostos de forma que a combinação permitiu a redução da concentração individual dos compostos (TUNC et al., 2007).

*S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* são fungos habitantes do solo, agentes causais do mofo branco e da murcha ou amarelecimento de *Fusarium* em feijoeiro, respectivamente. A ocorrência desses patógenos em sementes, mesmo em taxas relativamente baixas, pode gerar grandes perdas na produção e a tolerância para esses fungos no teste de sanidade em amostras de sementes é zero. Tal preocupação se deve ao fato de uma vez introduzidos e estabelecidos em uma área, a sua erradicação é praticamente impossibilitada em curto prazo (MENTEN et al., 2008).

Os resultados demonstram que os álcoois 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol são os principais responsáveis pela bioatividade dos voláteis produzidos por *S. cerevisiae*. Embora *C. gloesporioides*, *P. digitatum* e *F. oxysporum* sejam menos suscetíveis do que *G. citricarpa* à mistura artificial de voláteis (Figura 23), a utilização dos compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, em concentrações superiores às naturalmente produzidas pela levedura, é capaz de suprimir de forma completa o desenvolvimento dos fitopatógenos. Nenhum dos compostos testados em misturas ou isoladamente exibiram atividade fungicida e os fungos retomaram o crescimento após transferência para novo meio na ausência dos voláteis.

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

O valor da concentração inibitória mínima da mistura artificial de voláteis de *Gliocladium sp*, capaz de inibir em 100% *F. oxysporum*, foi de  $0,66 \mu\text{L mL}^{-1}$ , enquanto que *S. sclerotiorum* foi mais sensível ( $0,18 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) e não recuperou o crescimento após a exposição aos voláteis (STINSON et al., 2003b).

Além da própria natureza do composto, a suscetibilidade diferencial dos microrganismos reflete os mecanismos de resistência utilizados para contrabalançar os efeitos deletérios da exposição aos compostos orgânicos voláteis. As respostas a



compostos antimicrobianos em geral incluem mecanismos tais como detoxificação, transporte de efluxo e armazenamento. No entanto, os mecanismos particularmente envolvidos na defesa contra voláteis antimicrobianos ainda não foram estudados em detalhes.

Foi relatado por Mercier e Jimenez (2003) que diversas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, além de outros gêneros de fungos, foram inibidos pelos compostos voláteis produzidos por *M. albus*. No entanto, *T. viride* foi o único fungo que não foi afetado. Os autores sugeriram que pelo fato desse fungo também ser um produtor de voláteis antimicrobianos, é provável que ele possua mecanismos de resistência contra voláteis, entre eles os produzidos por *M. albus*.

O cianeto de hidrogênio (HCN) é provavelmente o exemplo mais conhecido de composto volátil envolvido no biocontrole (HAAS; KEEL; REIMMANN, 2002). Estudos empregando mutantes de *P. fluorescens* defeituoso na biosíntese de HCN demonstraram que o volátil possui papel na supressão de *Thielaviopsis basicola*, agente causal da podridão parda da raiz em plantas de fumo (VOISARD et al., 1989).

Com relação às estratégias de defesa em fungos contra HCN, foi sugerido que a exposição prolongada a agentes de biocontrole produtores de HCN podem selecionar patógenos contendo vias de respiração resistentes ao volátil (HANDELSMAN; STABB, 1996). Além disso, Osbourn (1996) relatou que uma ampla gama de fitopatógenos fúngicos pode tolerar HCN e para alguns desses fungos, incluindo *Microcyclus ulei*, essa tolerância é atribuída à respiração resistente ao HCN. Outros fungos incluindo *F. lateritium*, *Gloeocercospora sorghi* e *Stemphylium loti* são capazes de detoxificar HCN pela conversão do composto para formamida, através de uma enzima induzida na presença de HCN, a cianeto hidratase.

Duffy, Schouten e Raaijmakers (2003) verificaram através de buscas no banco de dados NCBI, a presença da enzima cianeto hidratase em pelo menos dois outros fungos fitopatogênicos, *F. solani* e *Leptosphaeria maculans*. Coletivamente essas observações sugerem que mecanismos específicos de defesa contra HCN, e possivelmente contra outros compostos voláteis, estão presentes em fitopatógenos fúngicos. No entanto, a importância de tais mecanismos de defesa nas interações entre fitopatógenos e agentes de biocontrole ainda deve ser avaliada.

O acúmulo de solventes na membrana plasmática pode afetar a organização e estabilidade da mesma. As mudanças físico-químicas geradas podem afetar a permeabilidade seletiva e a atividade de enzimas associadas à membrana. Como consequência, a viabilidade do microrganismo é afetada. Portanto, os microrganismos também podem possuir mecanismos adaptativos induzíveis a fim de minimizar a desordem da bicamada lipídica ou mesmo reduzir a afinidade dos solventes pela membrana (WEBER; de BONT, 1996). Muitos desses mecanismos são utilizados por *S. cerevisiae* a fim de tolerar altas concentrações de etanol. A levedura pode aumentar a fluidez da membrana através do aumento da proporção de ácidos graxos insaturados (BEAVEN; CHARPENTIER; ROSE, 1982), ergosterol (NOVOTNY et al., 1992) e acúmulo intracelular de trealose. A resistência ao solvente também pode ser obtida pela elevação da atividade da ATPase de membrana, a fim de compensar o aumento da permeabilidade da membrana aos prótons (ALEXANDRE; ROUSSEAU; CHARPENTIER, 1993). Por outro lado, outros microrganismos podem utilizar estratégia oposta, como é o caso de *Kluyveromyces lactis*, que reduz a fluidez da membrana através da redução na concentração de ácidos graxos insaturados quando na presença de etanol e 1-octanol (HEIPIEPER; ISKEN; SALIOLA, 2000).

#### **2.3.7.2 Fumigação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) infectadas com *S. sclerotiorum***

A fumigação das sementes de feijão inoculadas artificialmente com *S. sclerotiorum* reduziu significativamente a incidência do fungo (Figura 28).

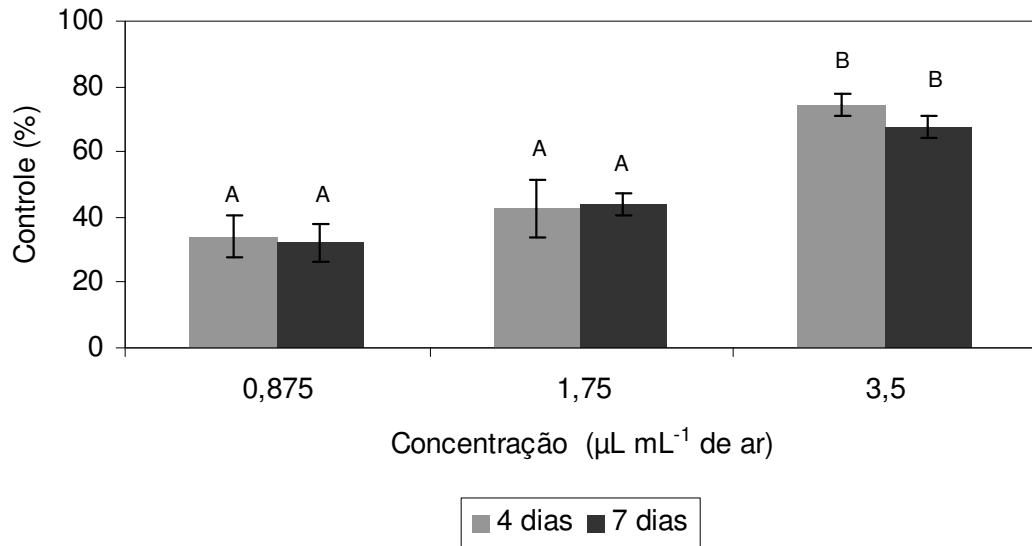


Figura 28 - Influência da mistura artificial de voláteis, identificados em *S. cerevisiae*, no controle de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão. Os valores são médias de 4 repetições ( $\pm$  DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

No tratamento controle, a incidência foi de 29,5%, no entanto, o tratamento das sementes com a menor concentração ( $0,875 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) da mistura artificial de voláteis durante 4 dias, promoveu redução de 34%. O tratamento na concentração  $1,75 \mu\text{L mL}^{-1}$  reduziu a incidência em 44% após 4 dias, no entanto, sem diferença estatística em relação à menor dose. Na concentração de  $3,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ , a redução foi de 75% em relação ao tratamento controle. Não foi verificada diferença estatística com relação ao tempo de exposição das sementes aos voláteis (4 e 7 dias).

Embora o tratamento das sementes nas condições empregadas não tenha erradicado o fungo, atendendo a exigência de tolerância zero para a presença desse patógeno em sementes, ainda assim pode-se considerar que a fumigação com a mistura artificial de voláteis foi efetiva no controle. Deve-se levar em consideração que as sementes foram inoculadas artificialmente, e nessa circunstância o fungo pode penetrar mais profundamente na semente, o que poderia dificultar o acesso dos compostos voláteis ao fungo. Além disso, a incidência do fungo no presente trabalho foi de quase 30%, sendo que em condições naturais a incidência é muito baixa (0,2% em média) (MENTEN et al., 2008).

Ezra e Strobel (2003) relataram que a fumigação de sementes de trigo, milho, cevada, canola e grão de bico com os voláteis produzidos por *M. albus* ou sua mistura artificial, causou redução na incidência dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp, *Fusarium* sp. e *Leptosphaeria maculans*, de ocorrência natural ou inoculado artificialmente (*Aspergillus ochraceus* - trigo). Os autores também comentaram que o tratamento foi pouco eficiente em sementes que apresentavam contaminação fúngica elevada, provavelmente devido à infecção estar mais profunda.

Do ponto de vista fitopatológico, a importância da associação patógeno-semente não reside apenas no fato de ser mais um processo de disseminação, mas também, por constituir um meio de sobrevivência do patógeno em contato direto com o hospedeiro. Esse fato implica em conseqüências diretas, tais como a introdução de novos patógenos ou novas raças mais virulentas, ainda não existentes na área, e assegura a introdução do patógeno já nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta. Além disso, a incidência de doenças já existentes em uma área, tende a aumentar com a freqüente introdução de patógenos pelas sementes (MENTEN, 1995; SANTOS et al., 1996; FREITAS, 2008; MENTEN et al., 2008).

Além do tratamento das sementes, outra abordagem seria a fumigação do solo com os compostos voláteis, a fim de eliminar a população de fitopatógenos associados ao solo, como é o caso de *S. sclerotiorum*. O brometo de metila, substância amplamente utilizada para a fumigação de solo contaminado teve o seu uso proibido devido à toxicidade e aos danos causados à camada de ozônio. Portanto, busca-se por novos produtos, preferencialmente de baixa toxicidade ao ser humano e meio ambiente. Embora o experimento conduzido no presente trabalho, tenha sido feito em caráter exploratório, o resultado fornece subsídios para estudos posteriores, a fim de desenvolver um fumigante à base de compostos voláteis.

### 2.3.7.3 Efeito da mistura artificial de voláteis sobre o fitonematóide *Meloidogyne javanica*

Os resultados anteriores demonstraram que a mistura artificial ou mesmo alguns de seus componentes utilizados isoladamente são capazes de reduzir o desenvolvimento de fitopatógenos fúngicos. Desta forma, demonstrou-se interesse em avaliar o efeito sobre outros organismos de interesse fitopatológico. Nesse contexto, foi avaliado o potencial dos compostos voláteis no controle do nematóide *M. javanica*, causador de galhas radiculares nas mais diversas culturas, e de grande importância agrícola.

O efeito nematicida dos compostos voláteis sobre *M. javanica* foi avaliado através da fumigação do substrato (vermiculita), contendo o nematóide e posterior avaliação do número de sobreviventes. Embora o experimento tenha sido realizado apenas em caráter exploratório, os resultados demonstraram ser promissores, a fim de se utilizar voláteis na fumigação de solos infestados com fitonematóides. Na menor dose testada (50  $\mu\text{L/placa}$ ), os voláteis causaram a morte de 31% dos nematóides, em relação ao controle, após 5 dias de fumigação, enquanto que nas doses de 100 e 200  $\mu\text{L/placa}$ , 100% dos nematóides estavam mortos após o tratamento (Figura 29).

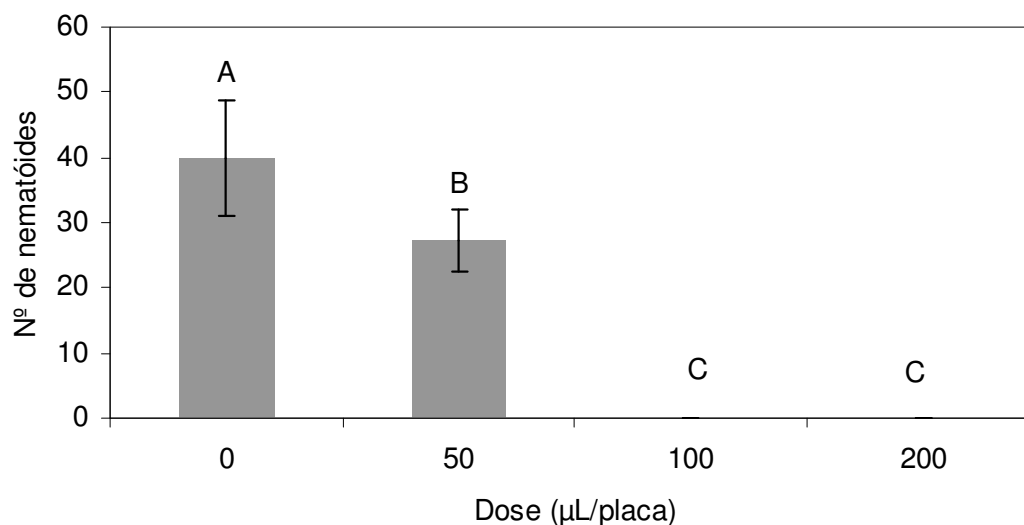


Figura 29 - Efeito da mistura artificial de voláteis, identificados em *S. cerevisiae*, na sobrevivência do fitonematóide *M. javanica*. Os valores são médias de 10 repetições ( $\pm$  DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ )

Nos últimos anos, a freqüente ocorrência dos nematóides de galhas, como *M. javanica*, tornou-se motivo de grande preocupação, no sentido de inviabilizar o uso agrícola das áreas infestadas. O fato desses nematóides serem polípagos, incluindo entre seus hospedeiros desde espécies de importância econômica até plantas daninhas, tem dificultado a viabilização de medidas de controle por parte dos agricultores (SILVA, 2001).

Várias medidas de controle são empregadas na redução populacional dos fitonematóides, porém nem sempre são aplicáveis em todas as condições de cultivo e algumas delas, como o uso de nematicidas, são bastante difundidas. No entanto, os efeitos danosos ao ambiente, e o elevado custo, tornam essa prática indesejável (CAMPOS, 1999). A fumigação de solo com brometo de metila é altamente eficiente para o controle de fitopatógenos de solo, ervas daninhas, insetos e nematóides. Entretanto, o seu uso não é mais permitido devido à toxidez e aos danos causados à camada de ozônio (RAABE et al., 2008). Esse fato reduz seriamente as opções para o tratamento de solo e por conseqüência estimula a busca por novos produtos com eficiência de controle e que proporcione mínimo impacto ambiental e toxicidade ao ser humano.

Estudos envolvendo o efeito de compostos voláteis sobre nematóides começaram a ser realizados apenas recentemente. Grimme et al. (2007) verificaram que a fumigação de solo infestado com *M. incógnita*, através de voláteis produzidos pelo fungo *M. albus*, causou 74 e 100% de mortalidade dos nematóides após 72h e 7 dias de tratamento, respectivamente. A mistura sintética de voláteis se mostrou mais efetiva. Em ensaio *in vitro*, 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da mistura foi necessária para causar 100% de morte após 24h. Em ensaios *in vivo*, a dose de 1,67  $\mu\text{L}$  por  $\text{cm}^3$  de areia resultou em menor número de galhas em raízes de tomateiro.

Em outro trabalho, também com *M. albus*, a fumigação do solo com os voláteis produzidos pelo fungo reduziu significativamente os nematóides *M. chitwoodi*, *M. hapla*, *Paratrichodorus allius* e *Pratylenchus penetrans* nas raízes e rizosfera de plantas de feijão, batata e pimenta. Nesse estudo, os voláteis de *M. albus* demonstraram possuir efeito nematostático e nematicida (RIGA et al., 2008).

As informações aqui apresentadas estimulam estudos futuros mais aprofundados sobre a potencialidade desses compostos no controle de fitonematóides e abrem perspectivas para uma nova opção de controle.

### 3 CONCLUSÃO

*S. cerevisiae* produz compostos orgânicos voláteis antimicrobianos, constituídos primordialmente por álcoois, e a mistura artificial mimetiza o efeito inibitório sobre *G. citricarpa*. Algum dos possíveis mecanismos de ação atuantes é a redução da síntese de proteínas e atividade de enzimas envolvidas na morfogênese. Além disso, foi observado que a exposição aos voláteis desencadeia processos de estresse oxidativo.

Os compostos orgânicos voláteis produzidos pela própria levedura ou misturas artificiais possuem potencial no controle da pinta preta dos citros, bem como de outros organismos de importância agrônômica, através da fumigação em câmaras fechadas durante o transporte e armazenamento.



## REFERÊNCIAS

- ABELES, F.B.; FOENCE, L.E. Temporal and hormonal control of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.45, p. 395-400, 1970.
- ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 2029-2035, 2004.
- ADASKAVEG, J.E.; FÖRSTER, H.; SOMMER, N.F. Principles of post harvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: Kader, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Oakland: University of California Publication, 2002. p. 163-195.
- AGOSTINI, J.P.; PERES, N.A.; MACKENZIE, S.J.; ADASKAVEG, J.E.; TIMMER, L.W. Effect of fungicides and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. **Plant Disease**, St Paul, v. 90, p. 1419-1424, 2006.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I. (Coord.). **Manual técnico de procedimientos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002. 72p.
- AGUIRRE, J.; RÍOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D.; HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 111-118, 2005.
- ALCOBA, N.J.; VIGIANI, A.R.; VEJARANO, N.V.; SLVARES, E.E; SERRANO, M.A.; BONILLO, M.C. **Mancha negra de los citros: epidemiología y control**. San Salvador de Jujuy: Ediciones Universidad Nacional de Jujuy, 2000. 56p.
- ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, I.; CHARPENTIER, C. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 20, p. 173-183, 1993.
- AMO, T.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. Unique presence of a manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis* VA1. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 184, p. 3305-3312, 2002.
- ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Port Talbot, v. 109, p.195-200, 2007.

ANGELOVA, M.B.; SVETLANA, B.P.; BORYANA, K.S.; SPASSEN, V.V.; LYUDMILA, S.S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 150-158, 2005.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

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

AUGUSTO, F.; SARTORATTO, A. Application of headspace solid phase microextraction and gas chromatography to the screening of volatile compounds from some brazilian aromatic plants. **Chromatographia**, Oxford, v. 57, p. 351-356, 2003.

AYRAPAA, T. Formation of higher alcohols from <sup>14</sup>C labeled valine and leucine. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 73, p.17-30, 1967.

AZEVEDO, M.M.; CARVALHO, A.; PASCOAL, C.; RODRIGUES, F.; CÁSSIO, F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. **Science of the Total Environment**, Shannon, v. 377, p. 233-243, 2007.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 104, p. 280-292, 2002.

BAI, Z.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 83, p. 772-779, 2003.

BALDASSARI, R.B.; BRANDIMARTE, I.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, D.C.G.; MORETTO, C.; GÓES, A. de. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja "Pêra-rio". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, p. 269-275, 2007.

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

BALDASSARI, R.B.; REIS, R.F.; GÓES, A. de. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 337-341, 2006.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – Occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 30, p. 215-242, 2006.

BEAVEN, M.J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A.H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. **Journal General Microbiology**, Reading, v. 128, p. 1447-1455, 1982.

BEERS, R.F. JR.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 195, p. 133-140, 1952.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 411-451, 1986.

BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. (Ed.). **Fermented beverage production**. London: Blackie, 1995, p. 32-61.

BHADOURIA, V.; ZHAO, W.S.; WANG, L.X.; ZHANG, Y.; LIU, J.H.; YANG, J.; KONG, L.A.; PENG, Y.L. Advances in fungal proteomics. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 162, p. 193-200, 2007.

BINZ, T.; CANEVASCINI, G. Differential production of laccases in Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 1060-1064, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-257, 1976.

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

BRUCE, A.; DOUGLAS, S.; SUSAN, V.; RON, E.W. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, p. 101-108, 2003.

BRUCE, A.; KUNDZEWICZ, A.; WHEATLEY, R.E. Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviride* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. **Materials and Organisms**, Berlin, v. 30, p. 79-94, 1996.

BRUCE, A.; VERRALL, S.; HACKETT, C.A.; WHEATLEY, R.E. Identification of volatile organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi. **Holzforschung**, Berlin, v. 58, p. 193-198, 2004.

BRUCE, A.; WHEATLEY, R.E.; HUMPHRIS, S.N.; HACKETT, C.A.; FLORENCE, M.E.J. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. **Holzforschung**, Berlin, v. 54, p. 481-486, 2000.

- BUSSINK, H.J.; OLIVER, R. Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 268, p. 15-24, 2001.
- CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. In: MEISLER, A. (Ed.). **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, New York: Willey, 1987, p. 59-101.
- CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 81-123.
- CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDP, I.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 75-81, 2005.
- CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 5504-5516, 2006.
- CHITARRA, G.S.; ABEE, T.; ROMBOUTS, F. M.; POSTHUMUS, M. A.; DIJKSTERHUIS, J. Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-Octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 2823-2829, 2004.
- CHUANKUN, XU.; MINGHE, M.; LEMING, Z.; KEQIN, Z. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1997-2004, 2004.
- COLE, G.T.; HUNG, C.Y. The parasitic cell wall of *Coccidioides immitis*. **Medical Mycology**, Abingdon, v. 39, p. 31-40, 2001
- DAS, N.; SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, M. Importance of Laccase in Vegetative Growth of *Pleurotus florida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, p. 4120-4122, 1997.
- DEISING, H.B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S.F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 286-295, 2008.
- DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal Science**, Pretoria, v. 26, p. 320-325, 1929.
- DONAHAYE, E.J. Current status of non-residual control methods against stored product pests. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 571-576, 2000.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L. Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. **Postharvest News and Information**, Wallingford, v. 2, p. 169-173, 1991.

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

DUFFY, B; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 501-538. 2003.

DURAN, N.; ROSA, M.A.; ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 31, p. 907-931, 2002.

EMRI, T.; POCSI, I.; SZENTIRMAI, A. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 23, p. 809-814, 1997.

ESPIN, J.C. Study of the oxidation of resveratrol catalyzed by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, laccase and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v. 24, p. 225-250, 2000.

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.

EZRA, D.; STROBEL, G.A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, p. 1229-1238, 2003.

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

FEICHTENBERGER, E. Pinta preta dos citros. **Frutas e Derivados**, São Paulo, p. 41-43, 2007.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p.261-296.

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 yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 8, p. 243-256, 1998.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Laranja. In \_\_\_\_\_. **Agrianual 2005**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p. 287-291

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.Ä.; OLSTORPE, M.N.; PASSOTH, V.; SCHNÜRER, J. Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 238, p. 133-137, 2004.

FREITAS, R.A. **Patologia de sementes**. Disponível em: <<http://www.patologiadesementes.com.br>>. Acesso em: 15 novembro 2008.

FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 277-288, 1992.

FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 60, p. 1-21, 1973.

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre pinta preta**. Araraquara, 2005. 11p. (Boletim Técnico).

GARDE-CERDAN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 501-510, 2008.

GEORGIU, C.D.; PATSOUKIS, N.; PAPAPOSTOULOU, L.; ZERVOUDAKIS, G. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. **Integrative and Comparative Biology**, Orlando, v. 46, p. 691-712, 2006.

GESSLER, N.N.; LEONOVICH, O.A.; RABINOVICH, YA.M.; RUDCHENKO, M.N.; BELOZERSKAYA, T.A. A comparative study of the components of the antioxidant defense system during growth of the mycelium of a wild-type *Neurospora crassa* strain and mutants, *white collar-1* and *white collar-2*. **Applied Biochemistry Microbiology**, Moscow, v. 42, p. 332-337, 2006.

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

GÓES, A. de Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 9, p. 293-304, 1998.

GÓES, A. de; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Brazil. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 9., 2000, Orlando. **Programs and Abstracts...** Riverside: International society of citriculture, 2000, p. 145.

GÓES, A. de; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 138, 1993. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 1993, Aracajú – Resumo

GOODAY, G.M. Cell walls. In: GOW, N.R.; GADD, G.M. (Ed.). **The growing fungus**. London: Chapman and Hall, 1995, p. 43-62.

GOODAY, G.W.; HUMPHREYS, A.M.; MCINTOSH, W. H. Roles of chitinases in fungal growth. In: MUZZARELLI, R.A.A.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G.W. (Ed.). **Chitin in Nature and Technology**, New York: Plenum Press, 1986, p. 83-91.

GOODAY, G.W.; ZHU, W.Y.; O'DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 100, p. 387-392, 1992.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. New York: Springer-Verlag, 1986. 380p.

GRANT, C.M.; COLLINSON, L.P.; ROE, J.H.; DAWES, I.W. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 21, p. 171-179, 1996.

GRIFFITH, G.S.; RAYNER, A.D.M.; WILDMAN, H.G. Interspecific interactions and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* (Agaricaceae). **Nova Hedwigia**, Braunschweig, v. 59, p. 47-75, 1994.

GRIMME, E.; ZIDACK, N.K.; SIKORA, R.A.; STROBEL, G.A.; JACOBSEN, B.J. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. **Plant Disease**, St Paul, v. 91, p. 220-225, 2007.

GUELFY, A.; AZEVEDO, R.A.; LEA, P.L.; MOLINA, S.M.G. Growth inhibition of filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 49, p. 63-73, 2003.

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

GUTIERREZ, L.E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 50, p. 464-472. 1993.

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

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

HAZELWOOD, L.A.; DARAN, J.M.; MARIS, A.J.A.; PRONK, J.T.; DICKINSON, J.R. The Ehrlich Pathway for Fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, p. 2259-2266, 2008.

HEARN, V.M.; ESCOTT, G.M.; EVANS, E.G.V.; ADAMS, D.J. Intracellular and wall-associated chitinases of *Aspergillus fumigatus*. In: SUZUKI, S.; SUZUKI, M. (Ed.). **Fungal cells in biodefense mechanism**. Tokyo: Saiken Publishing Co., 1997, p. 247-252.

HEIPIEPER, H.J.; ISKEN, S.; SALIOLA, M. Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in *adh* multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 777-784, 2000.

HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J.A.M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends Biotechnology**. Cambridge, v. 12, p. 409-415, 1994.

HOOPER, D.J. Extration of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J.F. (Ed.). **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986, p. 5-30.

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

HUMPHRIS, S.N.; WHEATLEY, R.E.; BRUCE, A. The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma* spp. on the growth of wood decay basidiomycetes. **Holzforschung**, Berlin, v. 55, p. 233-237, 2001.

HUNG, C.Y.; YU, J.J.; LEHMANN, P.F.; COLE, G.T. Cloning and expression of the gene which encodes a tube precipitin antigen and wall-associated  $\beta$ -glucosidase of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 69, p. 2211-222, 2001.

INGRAM, L.O.; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

JACOBSEN, T. Acute Toxicity of 16 Water-soluble Chemicals to the Fungus *Geotrichum candidum* Measured by Reduction in Glucose Uptake. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 9, p. 169-173, 1995.

JAMIESON, D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* **Yeast**, Davis, v. 14, p. 1511-1527, 1998.



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

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; BIRGIT, P. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 187, p. 351-360, 2007.

KAWASAKI, L.; AGUIRRE, J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 183, p. 1434-1440, 2001.

KAWASAKI, L.; WYSONG, D.; DIAMOND, R.; AGUIRRE, J. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 179, p. 3284-3292, 1997.

KERMASHA, S.; GOETGHEBEUR, M.; MONFETTE, A.; METCHE, M.; ROVEL, B. Inhibitory effects of cysteine and aromatic acids on tyrosinase activity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, p. 349-353, 1993.

KERSZMAN, G. Toxicity of the first ten MEIC chemicals to bacteria. **Alternatives to Laboratory Animals**, Nottingham, v. 21, p. 151-155, 1993.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the linnean society of new south wales**, Sidney: Linnean society of new south wales, v. 73, p. 249-292, 1948.

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M.P.; MARTEN, M.R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 25, p. 395-400, 2007.

KIM, Y.J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources, structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Heidelberg, v. 62, p. 1707-1723, 2005.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: REUTHER, W., CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E (Ed.). **The citrus industry**. Davis: University of California, 1978, p.1-66, v. 4.

KO, W.H.; CHOW, F.K. Soil fungistasis: role of volatile inhibitors in two soils. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 104, p. 75-78, 1978.

KOCH, E.F.A.; MENTEN, J.O.M. Método alternativo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, p. 276-279, 2000.

KOTZÉ, J. M. Black spot. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. St Paul: Academic Press Society. 2000. p. 23-25.

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

\_\_\_\_\_. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, St Paul, v. 65, p. 945-950, 1981.

\_\_\_\_\_. History and epidemiology of Citrus Black Spot in South Africa. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City. **Proceedings**. Sun City: international society of viticulture, 1996, p. 1296-1299.

LACEY, L.A.; HORTON, D.R.; JONES, D.C. The effect of temperature and duration of exposure of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in infested tubers to the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 97, p. 159-164, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, 680-685, 1970.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeast and its importance to wine aroma. A review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 21, p. 97-129. 2000.

LAUFER, Z.; BECKETT, R.P.; MINIBAYEVA, F.V. Co-occurrence of the multicopper oxidases tyrosinase and laccase in lichens in sub-order Peltigerineae. **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 1035-1042, 2006.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEEA, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 113-121, 2008.

LEHTONEN, M.; JOUNELA-ERIKSSON, P. Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. In: PIGGOTT, J.R. (Ed.). **Flavour of distilled beverages: origin and development**. Chichester: Ellis Horwood, 1983, p. 64-78.

LI, Q.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 44, p. 394-40, 2008.

LIANG, Y.; CHEN, H.; TANG, M.; SHEN, S. Proteome analysis of an ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* under salt shock. **Mycological Research**, Cambridge, v. 3, p. 939-946, 2007.

LUPE, F.A.; LEMES, A.C.; AUGUSTO, F.; BARATA, L.E. Fragrant lactones in the steam distillation residue of *Aeollanthus suaveolens* mart. ex spreng and analysis by HS - SPME. **The Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, p. 271-273, 2007.

MACKIE, A.; WHEATLEY, R.E. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford v. 31, p. 375-385, 1999.

MACLEAN, C.R.; GUDELJ, I Resource competition and social conflict in experimental population of yeast. **Nature**, London, v. 441, p. 498-501. 2006.

MALOLEPSZA, U. The influence of o-hydroxyethylorutin on *Botrytis cinerea* oxidant-antioxidant activity. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 122-126, 2004.

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

MCNEIL, B.; BERRY, D.R.; HARVEY, L.M.; GRANT, A.; WHITE, S. Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 57, p. 297-305, 1998.

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, Lancaster, v. 57, p. 743-746, 1967.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and others hosts of a *Guignardia easiluy* confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 54, p. 40-43, 1964.

MELIN, P.; SCHNÜRER, J.; WAGNER, E.G.H. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 267, p. 695-702, 2002.

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: CibaAgro, 1995. 321p.

MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D.; NOVENBRE, A.D.L.C.; ITO, M.A. **Qualidade das sementes de feijão no Brasil**. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/SementesFeijao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SementesFeijao/index.htm)> Acesso em: 18 nov. 2008.

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

\_\_\_\_\_. Potential of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* for control of building molds. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 404-410, 2007.

MERCIER, J.; MANKER, D.C. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in glasshouse soilless mix by the volatileproducing fungus *Muscodor albus*. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 355-362, 2005.

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

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

MERICO, A.; SULO, P.; PIŠKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, Oxford, v. 274, p. 976-989, 2007.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v.31, p. 426-429, 1959.

MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V.; PIPER, P.; MAGER, W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 19, p. 651-658, 1996.

MULLER, E.D. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 7, p. 1805-1813, 1996.

NAVARRO, R.E.; AGUIRRE, J. Posttranscriptional control mediates cell typespecific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 180, p. 5733-5738, 1998.

NICHOLLS, D.G. **Bioenergetics**: an introduction to chemiosmotic theory. New York: Academic Press, 1982. 190p.

NOUT, M.J.R.; BARTELT, R.J. Attraction of a flying nitidulid (*Carpophilus humeralis*) to volatiles produced by yeasts grown on sweet corn and a corn-based medium. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, p. 1217-1239, 1998.

NOVOTNY, C.; FLIEGER, M.; PANOS, J.; KARST, F. Effect of 5,7-unsaturated sterols on ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 15, p. 314-320, 1992.

OEPP/EPPO 2007. **EPPO Standard PM 1/2 A1 and A2 lists of pest recommended for regulation as quarantine pests**. Disponível em: <<http://archives.eppo.org/EPPOStandards/general.htm>>. Acesso em: 5 ago. 2008.

OEPP/EPPO *Guignardia citricarpa*. In: Diagnostic protocols for regulated pests, **OEPP/EPPO Bulletin**, Oxford, v. 33, p. 271-280, 2003.

OFFICE OF HEALTH AND SAFETY. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories** (BMBL) 5th. ed. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm>>. Acesso em 12 jul. 2008.

OLIVEIRA, A.M.; PEREIRA, N.R.; MARSAIOLI JR., A.; AUGUSTO, F. Studies on the aroma of cupuassu liquor using headspace solid phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1025, p. 115-124, 2004.

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

OUCHI, K.; YAMAMOTO, Y.; TAKAGISHI, M.; ADIYAMA, H. Regulation of isoamyl alcohol formation via Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v 58, p. 301-309, 1980.

OWENS, L.D.; GILBERT, R.G.; GRIEBEL, G.E.; MENZIES, J.D. Identification of plant volatiles that stimulate microbial respiration and growth in soil. **Phytopathology**, Lancaster, v. 59, p. 1468-1472, 1969.

PERES, A.P. **Deteção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycines max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias.** 1996. 51p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

PFEIFFER, T.; SCHUSTER, S.; BONHOEFFER, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. **Science**, Washington, DC, v. 292, p. 504-507, 2001.

PINI, G.F.; BRITO, E.S.; GARCIA, N.H.P.; VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. A Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, 267-271, 2004.

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

POPOLO, L.; VAI, M. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1426, p. 385-400, 1999.

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Enzymatic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 468-477, 1989.

PRONK, J.T.; STEENSMA, H.Y.; VAN DIJKEN, J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 12, p. 1607-1633, 1996.

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

RAABE, R.D.; GREBUS, M.E.; WILEN, C.A.; MCCAIN, A.H. **UC IPM Pest management guidelines: floriculture and ornamental nurseries**. Disponível em: <<http://ucipm.ucdavis.edu/PMG/r280110611.html>>. Acesso em: 15 novembro 2008.

RIGA, E.; LACEY, L.A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 380-385, 2008.

ROBBS, C.F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, p. 87-95, 1990.

ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. **A mancha preta dos frutos**: um dos fatores limitantes à produção citrícola do Estado do Rio de Janeiro. Guaratiba: EMBRAPA/CTAt, 1995, 5p. (Comunicado Técnico, 19).

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 455, 1980. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 13., 1980, Rio de Janeiro – Resumo.

\_\_\_\_\_. A mancha preta dos citros: indentificação da forma perfeita *Guignardia citricarpa* no Estado do Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 248, 1985. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 18., 1985, Fortaleza – Resumo.

SÁMI, L.; PUSZTAHELYI, T.; EMRI, T.; VARECZA, Z.; FEKETE, A.; GRALLERT, Á.; KARÁNYI, Z.; KISS, L.; PÓCSI, I. Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tóquio, v. 47, p. 201-211, 2001.

SANTOS, G.R.; COSTA, H.; PELÚZIO, J.M.; MIRANDA, G.V. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da microflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 43, p.621-627, 1996.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38: p. 995-1014, 2005.

SCHÖLLER, C.E.G.; GÜRTLER, H.; PEDERSEN, R.; MOLIN, S.; WILKINS, K. Volatile Metabolites from Actinomycetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 50, p. 2615-2621, 2002.

- SEWARD, R.; WILLETTS, J.M.; DINSDALE, M.G.; LLOYD, D. The effects of ethanol, hexan-1-ol, and 2-phenylethanol on cider yeast growth, viability, and energy status; synergistic inhibition. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 102, p. 439-443, 1996.
- SIKKEMA, J.; de BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 201-222, 1995.
- SILVA, J.F.V; DIAS, W.P.; MANZOTE, U.; GOMES, J. **Produção de grãos em ambientes com nematóides de galhas**. Londrina: Fapeagro, 2001. 15p.
- SMITH, J.H. A study of the effect of various disease control programs on spore releases of the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* Kiely. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City. **Proceedings...** Sun City: International Society of Citriculture, 1996, p. 351-352.
- SONG, JUN; BEAUDRY, R.M.; FAN, L.; DENG, W.; LEEPIPATTANAWIT, R. (United States). **Method for the inhibition of fungal growth in fruits and vegetables U.S. 6045844**. 4 Apr. 2000.
- SPÓSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha-preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros**. 2003. 112p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.
- STEPHEN, D.W.; JAMIESON, D.J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 141, p. 207-212, 1996.
- STINSON, A.M.; ZIDACK, N.K.; STROBEL, G.A.; JACOBSON, B.J. Mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* for control of seedling diseases of sugar beet and *Verticillium* wilt of eggplant. **Plant Disease**, St Paul, v. 87, p. 1349-1354, 2003a.
- STINSON, M.; EZRA, D.; HESS, W.M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, 913-922, 2003b.
- STOTZKY, G.; SCHENCK, S.; PAPAIVIZAS, G.C. Volatile organic compounds and microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 4, p. 333-382, 1976.
- STROBEL, G. *Muscodor albus* and its biological promise. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 33, p. 514-522, 2006.

STROBEL, G.A.; DIRKSE E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

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

STRÖM, K.; SCHNÜRER, J.; MELIN, P. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 246, p. 119-124, 2005.

SUTTON, B.C.; WATERSON, J.M. *Guignardia citricarpa*. **Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. Surrey: Common wealth mycological institute, 1966. 2p.

SZKLARS, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAKAYA, N.; YAMAZAKI, D.; HORIUCHI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v. 62, p. 60-65, 1998.

TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. 1990. 111p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

TARKKA, M.T.; PIECHULLA, B. Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles. **The New Phytologist**, London, v. 175, p. 381-383, 2007.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALNI, L.M.S. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 163, p. 329-336, 2008.

TRONSMO, A.; DENNIS, C. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 71, p. 469-474, 1978.

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

VAN LEEUWEN, J.; WICHERS, H.J. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 413-418, 1999.



- VELD, G.I.; DRIESSEN, A.J.M.; OP DEN KAMP, J.A.F.; KONINGS, W.N. Hydrophobic membrane thickness and lipid-protein interactions of the leucine transport system of *Lactococcus lactis*. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, Amsterdam, v. 1065, p. 203-212, 1991.
- VIDO, K.; SPECTOR, D.; LAGNIEL, G.; LOPEZ, S.; TOLEDANO, M.B.; LABARRE, J. A Proteome Analysis of the Cadmium Response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, p. 8469-8474, 2001.
- VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E.L.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, p. 143-148, 2006.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions, **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1-10, 2008.
- VITERBO, A.; BAR, N.N.; MAYER, A.M. The function of laccase from *Botrytis cinerea* in host infection. In: VERHOEFF, K.; MALATHRAKIS, N.E.; WILLIAMSON, B. (Ed.). **Recent advances in Botrytis research**. Wageningen: Pudoc Scientific Publishers, 1992. p. 76-82.
- VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 8, p. 351-358, 1989.
- WEBER, F.J.; de BONT, J.A.M. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1286, p. 225-245, 1996.
- WEI, X.; YANG, F.; STRANEY, D.C. Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 423-429, 2005.
- WHEATLEY, R.E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 357-364, 2002.
- WHEATLEY, R.E.; HACKETT, C.; BRUCE, A.; KUNDZEWICZ, A. Effect of substrate composition on the production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 39, p. 199-205, 1997.
- WHITE, N.A.; BODDY, L. Extracellular enzyme location during interspecific fungal interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 98, p. 75-79, 1992.

WHITE, S.; McINTYRE, M.; BERRY, D.R.; McNEIL, B. The autolysis of industrial filamentous fungi. **Critical Review in Biotechnology**, London, v. 22, p. 1-14, 2002.

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

WORAPONG, J.; STROBEL, G.; FORD, E.J.; LI, J.Y.; BAIRD, G.; HESS, W.M. *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 79, p. 67-79, 2001.

ZHANG, J.; KJONAAS, R.; FLURKEY, W.H. Does N-hydroxyglycine inhibit plant and fungal laccases? **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, p. 775-783, 1999.

ZOU, C.S.; MO, M.H.; GU, Y.Q.; ZHOU, J.P.; ZHANG, K.Q. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2371-2379, 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)