

CONTROLE PÓS-COLHEITA DA ANTRACNOSE DO PIMENTÃO PELA LEVEDURA *Rhodotorula glutinis*

POST-HARVEST CONTROL ANTHRACNOSE IN PEPPER BY YEAST *Rhodotorula glutinis*

Gisely Santana de FRANÇA¹; Rejane Rodrigues da COSTA e CARVALHO²;
Rejane Pereira NEVES³; Emmanuelle Rodrigues ARAUJO⁴; Delson LARANJEIRA⁵

1. Mestranda, Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, PE, Brasil; 2. Professora, Doutora, Fitotecnia, UFRPE, Recife, PE, Brasil; 3. Professora, Doutora, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil; 4. Doutoranda em Fitopatologia, UFRPE, Recife, PE, Brasil; 5. Professor, Doutor, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, UFRPE, Recife, PE, Brasil. delson@depa.ufrpe.br

RESUMO: Considerando as perdas causadas em pós-colheita pela antracnose no pimentão e à ineficácia das medidas de controle atualmente utilizadas, este trabalho teve por objetivo estudar a potencialidade antagonista *in vitro* e *in vivo* de quinze isolados de leveduras à *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em pimentão. Foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento do fungo dos tratamentos em relação à testemunha nos testes *in vitro* e determinado o tamanho da área lesionada em frutos através da mensuração do comprimento da lesão em dois sentidos diametricamente opostos nos testes *in vivo*. As leveduras que obtiveram o melhor resultado no controle da antracnose foram identificadas através de características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, bioquímicas e por taxonomia molecular, sendo os isolados de levedura 13E e 13A1, os que obtiveram as melhores respostas no controle do fitopatógeno tanto *in vitro* quanto *in vivo*, identificados como pertencentes à espécie *Rhodotorula glutinis*.

PALAVRAS-CHAVE: *Colletotrichum* sp. Doenças pós-colheita. Controle biológico de doenças

INTRODUÇÃO

A antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é uma das doenças de maior importância para as solanáceas, como o pimentão (*Capsicum annuum*). Os sintomas da antracnose podem ocorrer durante o desenvolvimento da cultura no campo ou em pós-colheita, mas somente os frutos exibem sintomas típicos (LOPES; ÁVILA, 2003), que são caracterizados pela ocorrência de depressão circular de diâmetro variável, com a presença de uma massa alaranjada de esporos no centro das mesmas quando sob alta temperatura (TOZZE JÚNIOR et al., 2006). Em condições de temperatura amena a quente e chuvas frequentes e na ausência de controle adequado, os prejuízos podem chegar a 100% (KUROZAWA et al., 2005; AZEVEDO et al., 2006).

No Brasil, a antracnose do pimentão tem sido atribuída a *C. gloeosporioides* (LOPES; ÁVILA, 2003; KUROZAWA et al., 2005; AZEVEDO et al., 2006; TOZZE JÚNIOR et al., 2006), sendo este, também, o principal agente da antracnose do pimentão em Pernambuco (XAVIER FILHA; MICHEREFF, 2006).

A aplicação de fungicidas é, há muitos anos, o mais difundido método de controle da antracnose do pimentão no Brasil. Entretanto, a adoção contínua do controle químico pode acarretar o

surgimento de patógenos resistentes aos produtos utilizados, além da contaminação de alimentos e do ambiente, intoxicação de homens e animais, ressurgimento de algumas doenças e de outras, antes consideradas secundárias, tornando-se importantes (GHINI; KIMATI, 2000). A necessidade de métodos mais seguros, eficientes, econômicos e não poluentes têm estimulado a busca de métodos de controle de doenças de plantas alternativos ao uso de produtos químicos (STANGARLIN et al., 1999). Neste contexto, o controle biológico utilizando microrganismo antagonista tem sido uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos, com considerável sucesso no controle de doenças de pré e pós-colheita (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002).

Uma variedade de microrganismos antagonistas vem sendo utilizada para o controle de diferentes patógenos, em frutos e hortaliças (FRAVEL, 2005). Entre estes organismos, as leveduras têm sido relatadas como agentes de controle biológico eficazes no controle de fitopatógenos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000; QING; SHIPING, 2000; IRTWANGE, 2006). Essas podem atuar sobre os fitopatógenos através de antibiose, parasitismo, pela competição por nutrientes (BETTIOL, 1991) ou podem induzir a resistência.

Considerando as perdas causadas em pós-colheita pela antracnose em pimentão e à ineficácia

das medidas de controle atualmente utilizadas, este trabalho teve por objetivo avaliar a potencialidade antagônica *in vitro* e *in vivo* de isolados de leveduras à *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em pimentão (*Capsicum annuum* L.).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fungos do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco e no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Isolamento do fitopatógeno e preparo do inóculo

Frutos de pimentão, berinjala e folhas de tomateiro com sintomas de antracnose foram coletados em áreas de cultivo orgânico do município de Chã Grande-PE e enviados ao Laboratório de Fungos do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para que se procedesse ao isolamento.

Fragmentos da área lesionada ou massa de esporos foram depositados em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubadas por 8 dias à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, foram realizados o isolamento e a repicagem dos microrganismos para tubos de ensaio contendo meio BDA os quais foram mantidos em condição de laboratório para posterior utilização nos testes de patogenicidade.

As suspensões fúngicas foram preparadas pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada (ADE) ao meio de cultura contendo colônias de *Colletotrichum* sp. com 8 dias de idade e posterior raspagem com alça de Drigalski e filtragem em camada dupla de gaze esterilizada. Os inóculos foram ajustados à concentração de 1×10^6 esporos/mL.

Isolamento das leveduras e preparo das suspensões

Discos de 11mm de diâmetro foram retirados da casca de frutos sadios de pimentão com um furador e cinco desses colocados em tubo de ensaio contendo 10 mL de água de torneira esterilizadas (ATE) e cloranfenicol na concentração de 50 mg/L. Os tubos foram submetidos à agitação em banho de ultrassom por 15 minutos e no “vórtex” por 30 segundos. Posteriormente foi realizada a diluição da solução para 10^{-1} , da qual foram retiradas alíquotas de 0,1 mL, que foram uniformemente distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud-dextrose-ágar (DAS modificado) suplementado com extrato de

levedura e cloranfenicol. As placas foram incubadas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas. Os isolados puros obtidos foram repicados em tubos de ensaio contendo o meio DAS modificado e conservados em óleo mineral.

As suspensões de leveduras utilizadas nos teste de biocontrole foram preparadas pela da adição de 20 mL de ADE à superfície do meio contendo colônias com 48 horas de crescimento, seguida da raspagem com alça de Drigalski. Alíquotas de 1mL das suspensões foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada e submetidas à agitação em vórtex. A concentração das suspensões foi ajustada para 1×10^8 células/mL.

Antagonismo *in vitro* de leveduras a *Colletotrichum* sp.

Foram utilizados quinze isolados de leveduras. Alíquotas de 100 μL das suspensões de leveduras foram depositadas no centro de placas de Petri contendo meio BDA e espalhados uniformemente com alça de Drigalski. Após duas horas, discos de 0,5 mm de diâmetro contendo estruturas de *Colletotrichum* sp. foram depositados no centro das placas. O delineamento usado foi inteiramente casualizado, onde cada tratamento foi composto de cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. As placas foram mantidas à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

As avaliações foram realizadas diariamente, através de medições do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais (média das duas medições diametricamente opostas), iniciando-se 24 h após o preparo das placas e sempre no mesmo horário, até que um dos tratamentos atingisse o diâmetro total da placa de Petri. Foram realizadas avaliações, calculando-se a porcentagem de inibição do crescimento do fungo dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a fórmula:

$$\text{PIC} = \frac{(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento})}{\text{diâmetro da testemunha}} \times 100$$

Os dados obtidos nesse estudo foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Antagonismo *in vivo* de leveduras sobre *Colletotrichum* sp.

Foram utilizados os mesmos isolados de leveduras do teste *in vitro*. Frutos sadios no estágio de maturação comercial, foram lavados e desinfestados pela imersão em NaClO 0,05% por cinco minutos. Cada fruto foi marcado na superfície

em pontos equidistantes, onde foram efetuados ferimentos de aproximadamente 3mm de profundidade com uma almofada com alfinetes desinfestados e depositados 100µL das suspensões das leveduras na concentração de $1,0 \times 10^8$ células/mL. Após a inoculação, os frutos foram mantidos por 24 horas em câmara úmida constituída de placas de Petri envolvidas por sacos plásticos contendo chumaços de algodão umedecidos com ADE. Após uma hora de câmara úmida, foi depositado em cada ferimento 50 µL da suspensão do inóculo do fitopatógeno (1×10^6 conídios /mL).

A testemunha relativa consistiu de frutos de pimentão com ferimentos inoculados com o patógeno e tratados com ADE, enquanto que a testemunha absoluta foi constituída por frutos com ferimentos sem a inoculação do patógeno e tratados com ADE.

A avaliação ocorreu ao oitavo dia após a inoculação, determinando-se o tamanho da área lesionada através da mensuração do comprimento da lesão em dois sentidos diametricamente opostos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições, sendo cada repetição constituída por um fruto. Os dados obtidos nesse estudo foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Identificação dos isolados de leveduras utilizados

A identificação das leveduras foi realizada através de características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas e bioquímicas (KREGER VAN RIJ, 1984; BARNETT et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

Características macroscópicas

Foram observadas a textura, produção de pigmentos e o tempo de crescimento das leveduras.

Características microscópicas

Foram observadas as estruturas somáticas (produção de pseudo-micélio e/ ou micélio verdadeiro) e reprodutivas (formação de blastoconídios, arthroconídios e estruturas sexuadas) das leveduras ao microscópio de luz.

Características fisiológicas e bioquímicas

Assimilação de compostos de carbono

Após 72h de crescimento das colônias foi realizada uma suspensão de cada levedura em solução de extrato de levedura a 0,1% de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. As suspensões foram transferidas para placas de Petri e misturadas

ao meio C, isento de fontes de carbono. Após homogeneização e a posterior solidificação do meio, foi adicionado diferentes carboidratos *in natura* em pontos equidistantes. As culturas foram incubadas à 25°C. A leitura foi realizada a cada 24 horas por 3 dias consecutivos. A assimilação de determinada fonte de carbono é observada pela formação de um halo no local.

Assimilação de compostos de nitrogênio

O procedimento é semelhante ao teste de assimilação de compostos de carbono, sendo neste caso utilizado o meio N, isento de fontes de nitrogênio, em substituição ao meio C e em seguida foi adicionado diferentes fontes de nitrogênio.

Fermentação de compostos de carbono

Com a mesma suspensão de leveduras, foi verificada a capacidade de utilização de carboidratos em anaerobiose utilizando-se tubos de ensaio contendo em seu interior um tubo de Durham invertido. Em cada tubo preenchido com solução de carboidrato a 4% adicionou-se 100µL da suspensão. Os tubos foram incubados à temperatura de 25°C e a leitura foi realizada a cada 24h por 10 dias consecutivos. A fermentação de determinada fonte de carbono é observada pela produção de gás carbônico no interior do tubo de Durham.

Produção de urease

Após crescimento de 72h, cada levedura foi semeada no meio Agar uréia de Christensen e incubadas à 25°C por 5 dias. A produção de urease é sinalizada pelo indicador de pH vermelho de fenol, que muda a coloração do meio de amarelo para o vermelho.

Taxonomia molecular

Os isolados foram incubados em meio de cultura YPD (extrato de levedura 1%, peptona de carne 2% e D-glucose 2%) por 16 horas a 300°C. As amostras homogenizadas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas por 3 minutos a 10 000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e 600 µL de tampão de extração (TrisHCl pH8,0 200mM, EDTA pH 8,0 25mM, NaCl 250mM, SDS 1%) foi adicionado para a lise de células, seguido de incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de clorofane (fenol, clorofil 1:1) e os tubos centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos. Da fase aquosa foram retirados 500 µL e transferidos para novos microtubos aos quais foram acrescentados igual volume de clorofil (clorofórmio, álcool

isoamílico 24:1) e centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos. Novamente, 400µl da fase aquosa foram transferidos para outros microtubos aos quais foram adicionados 800µL de álcool absoluto gelado e incubados por 2 horas a -200°C para precipitação do DNA. A seguir as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos e o sedimento lavados com álcool a 70%, secados em estufa a 370°C e ressuspendido em 100µL de tampão TE.

Para identificação das leveduras foi utilizada a comparação das sequências de rDNA, onde a mistura de reação continha os primers específicos para a região D1/D2 da região 26S rDNA. Os primers utilizados para esta reação foram o NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Além disso, os primers para a região ITS (Espaçadores Internos Transcritos) ITS1 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3'), foram também utilizados para alcançar altos níveis de separação intraespecífica. Os produtos de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (P/V). As bandas foram coradas com brometo de etídio e fotografadas em um

transluminador de luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados usando o "kit" de purificação QIA-quick (QIAGEN, Alemanha). As sequências foram alinhadas e comparadas com aquelas já depositadas no NCBI utilizando a ferramenta BLAST (NCBI BLAST: Bethesda, MD,USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados 11A2, 7D2, 13E e 13A1 foram os mais eficientes no controle *in vitro* de *Colletotrichum* sp. (Tabela 1). No experimento *in vivo*, os isolados de leveduras 13E, 13A1, 11E2 e 11E1 foram os mais eficientes em inibir o crescimento do patógeno nos frutos de pimentão (Tabela 1).

O estudo do antagonismo *in vivo* foi crucial na escolha do melhor agente de biocontrole, uma vez os testes *in vitro* identificam principalmente os antagonistas que são produtores de antibióticos (DROBY et al, 2009) e não refletem o ambiente nutricional do local da lesão no hospedeiro (MARI et al, 2012).

Tabela 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Colletotrichum* sp. e diâmetro da lesão de frutos de pimentão inoculados com o fungo e tratados com leveduras.

Isolados de leveduras	PIC	Diâmetro lesão
11A2	54,12 a	1,95 b
7D2	51,79 a	1,95 b
13E	47,99 a	1,90 a
13A1	47,78 a	1,85 a
11E2	47,14 b	1,84 a
11E1	47,45 b	1,89 a
11B	41,01 c	2,32 b
7B	40,38 c	2,06 c
11F	39,95 c	2,20 d
15	39,11 c	2,14 c
40	37,84 c	2,16 d
22A	37,42 d	2,02 c
35	37,42 d	2,22 d
31	35,94 d	2,13 c
18	34,03 d	2,10 c
Testemunha	00,00 e	2,91 c
Média Geral	2,84	2,10
CV (%)	8,65	12,14

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Grande parte dos isolados de leveduras utilizados foram identificados como sendo do gênero *Rhodotorula*, sendo neste caso, encontrada as espécies *R. minuta*, *R. aurantiaca* e *R. glutinis* (Tabela 2). Entretanto, também foram identificadas

as espécies *Brettanomyces custersianus*, *Debaryomyces etchellsii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida kefir* e *Debaryomyces yamadae* entre os isolados testados (Tabela2).

Tabela 2. Identificação das leveduras utilizadas no experimento de controle biológico de *Colletotrichum* sp. por meio de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

Registro	Espécie	Coloração	Hospedeiro
11A2	<i>Rhodotorula minuta</i>	Pigmentada	Pimentão
11E1	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Pigmentada	Pimentão
31	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Pigmentada	Pimentão
40	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Pigmentada	Pimentão
11E2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pigmentada	Pimentão
13A1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pigmentada	Pimentão
13E	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pigmentada	Pimentão
15	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pigmentada	Pimentão
22A	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pigmentada	Pimentão
35	<i>Brettanomyces custersianus</i>	Não Pigmentada	Pimentão
18	<i>Debaryomyces etchellsii</i>	Não pigmentada	Pimentão
7B	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Não Pigmentada	Pimentão
7D ₂	<i>Candida kefyr</i>	Não Pigmentada	Pimentão
11F	<i>Debaryomyces yamadae</i>	Não Pigmentada	Pimentão
11B	<i>Debaryomyces yamadae</i>	Não Pigmentada	Pimentão

A taxonomia convencional de leveduras, baseada em caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (KURTZMAN et al., 2011) nem sempre alcança resultados conclusivos. Dessa forma, para que a identificação seja segura, além dos métodos convencionais, deve-se lançar mão de métodos moleculares, tais como a amplificação de regiões conservadas do genoma via reação da polimerase em cadeia (PCR) (LANDELL, 2009).

No presente trabalho, a identificação das leveduras por meio de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Tabela 2) confere com a identificação realizada por taxonomia molecular (Tabela 3), sendo os isolados 13E e 13A1, que obtiveram as melhores respostas no controle do fitopatógeno tanto *in vitro* quanto *in vivo* pertencentes à espécie *Rhodotorula glutinis*.

Tabela 3. Tamanhos de fragmentos resultantes de digestão dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA com a enzima *Hinf* I e identificação das leveduras obtidas de frutos de pimentão.

Levedura	Espécie	<i>Hinf</i> I
11A2	<i>Rhodotorula minuta</i>	340+225+75
11E1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	340+225+75
11E2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	340+225+75
13A ₁	<i>Rhodotorula glutinis</i>	340+225+75
13E	<i>Rhodotorula glutinis</i>	340+225+75

Inúmeras leveduras têm sido identificadas e utilizadas em frutos e vegetais para controle de doenças de pós-colheita (SHARMA et al., 2009). Dentre estas leveduras, o gênero *Candida* abriga um grande número de espécies antagonistas como a *Candida sake* utilizada no controle de *Penicillium expansum* em maçã (MORALES et al., 2008) e em pêra (TORRES et al., 2006); *Candida oleophila* utilizada em citros controlando *Penicillium italicum* e *P. digitatum* (LAHLALI et al., 2005) e em banana para o controle de *Colletotrichum musae* (LASSOIS et al., 2008). No entanto, outras espécies mostraram-se eficientes no controle de diversas patologias pós-colheita, como a levedura *Pichia guilliermondii*, que tem sido relatada no controle da antracnose em

pimenta causada por *Colletotrichum capsici* (CHANCHAICHAOVIVAT et al. 2008), no controle de *Botrytis cinerea* em nectarina, pêssego e tomate (TIAN et al., 2002; SALIGKARIAS et al., 2002) e no controle de *Penicillium italicum* em laranjas (LAHLALI et al., 2011).

Diversos trabalhos relatam a eficácia de *R. glutinis* no controle de doenças em pós-colheita, como no controle de podridões em frutos de maçãs causadas por *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* (ZHANG et al., 2009a; LI et al., 2011), em combinação com metil jasmonato (MeJA) no controle da podridão cinzenta causada por *P. expansum* (ZHANG et al., 2009b); no controle da podridão negra pós-colheita em abacaxi causada por

Ceratocystis paradoxa (REYES et al., 2004); em combinação com ácido salicílico no controle da podridão pós-colheita em morango causado por *Rhizopus stolonifer* (ZHANG et al., 2010a) e *Botrytis cinerea* (ZHANG et al., 2007; Zhang et al., 2010b; Ge et al., 2010), no controle de podridões verde ou bolor verde de laranjas causadas por *Penicillium digitatum* (ZHENG et al., 2005) e integrado com água quente no controle de podridões em pêras causadas por *Penicillium expansum* e *B. cinerea* (ZHANG et al., 2008a; ZHANG et al., 2008b)

O presente estudo, bem como os inúmeros exemplos citados acima, demonstram a eficácia de *R. glutinis* no controle de doenças em pós-colheita. Somado a isso, Zhang et al. (2009a) observaram que o tratamento com *R. glutinis* não afetou os parâmetros de qualidade pós-colheita de maçãs, como perda de massa, firmeza, sólidos solúveis totais (SST), ácido ascórbico (AA), e acidez titulável (AT).

As leveduras podem atuar reduzindo o crescimento e desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por meio de diversos mecanismos, como a competição por espaços e nutrientes, indução de resistência na planta hospedeira, parasitismo, produção de enzimas extracelulares, produção de antibióticos, interferência nos fatores de patogenicidade, sendo que prováveis mecanismos diferentes de controle atuam em sinergismo durante a interação antagonista (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Embora os mecanismos de ação dos antagonistas aqui avaliados não tenham sido determinados na presente pesquisa, supõe-se que o sucesso de *R. glutinis* no controle da antracnose do pimentão pode ser devido: a capacidade da levedura em produzir enzimas como as pectinases, quitinases

e glucanases (SARAVANAKUMAR et al. 2009; BAUERMAISTER et al. 2010), responsáveis pela despolimerização da parede celular de determinados fungos fitopatogênicos, bem como pela competição por nutrientes (CASTORIA et al. , 1997), uma vez que as leveduras são hábeis, principalmente, na colonização e competição por espaços e nutrientes na superfície de frutos e folhas (MCLAUGHLIN et al., 1990; FILONOW, 1998).

A utilização de *R. glutinis* no controle da antracnose do pimentão pode ser considerada uma alternativa promissora aos fungicidas sintéticos químicos, uma vez que apesar da eficácia obtida não ser tão alta quando comparada com a utilização de fungicidas, seu uso pode prevenir o aparecimento de resistência de fungos fitopatogênicos, tornando o controle biológico uma medida mais eficaz. Além disso, as leveduras não são produtoras de antibióticos ou outros metabólitos secundários tóxicos e, portanto, ditos seguros como agentes de biocontrole de fitopatógenos. Estes fatores contribuem para aceitação de frutos e vegetais tratados com este tipo de produto biológico, uma vez que normalmente são consumidos *in natura*.

Embora novas investigações sejam necessárias para elucidar o mecanismo de ação destas leveduras, os resultados deste estudo demonstram o potencial de aplicação destes isolados como agentes biológicos para a proteção em pós-colheita de pimentão contra *Colletotrichum sp.*

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de iniciação científica.

ABSTRACT: Considering the losses caused by post-harvest anthracnose in sweet pepper chili and ineffectiveness of control measures currently used, this study had the objective of evaluate the antagonistic potential *in vitro* and *in vivo* of fifteen isolates of yeast to *Colletotrichum sp.*, the causal agent of anthracnose on pepper. By calculating the percentage growth inhibition of the fungus treatment compared to the control tests *in vitro* and determining the size of lesions via the measurement of lesion length in both directions diametrically affixed *in vivo* tests. Yeasts who obtained the best result in controlling anthracnose were identified by characteristic macroscopic, microscopic, physiological, biochemical and molecular taxonomy. In this study, the yeast isolates 13E and 13A1, which obtained the best results in controlling the pathogen both *in vitro* and *in vivo* of the species *Rhodotorula glutinis*.

KEYWORD: *Colletotrichum sp.* Postharvest disease. Biological control.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, C. P.; CAFÉ FILHO, A. C.; HENZ, G. P.; REIS, A. **Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 4 p. (Embrapa Comunicado Técnico, 35).

- BARNETT, J. A. **Yeast, Characteristics and Identification**, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811p.
- BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GIESE, E. C.; DEKER, F. H.; BARBOSA, A. M. β -1,3-glucanases fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 75-86, 2010.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991. 388p.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCIO, V. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v. 12, n. 3, p. 293-300, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00061-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00061-6)
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, Orlando, v. 42, n. 3, p. 326-335, 2007.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 137-145, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 243-256, 1998. <http://dx.doi.org/10.1080/09583159830315>
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 337-359, 2005. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- GE, L., ZHANG, H., CHEN, K., MA, L., XU, Z. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved. **Food Chemistry**, Reading, v. 120, n. 2, p. 490-495, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.042>
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.
- IRTWANGE, S. V. Application of biological control agents in pre- and postharvest operation. **Agricultural Engineering International**, Hokkaido, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2006.
- JANISIEWICZ, W. J., KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 2, p. 411-444, 2002. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>
- KREGER VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 1984. 1082p.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v. 2, cap. 65, p. 589-596.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a taxonomic study**. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 2, 2011. 1062 p.
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9ed. São Paulo, SP: Sarvier, 2002. 1104p.
- LAHLALI, R.; HAMADI, Y.; GUILLI, M. E.; JIJAKLI, M. H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**, Orlando, v. 56, n. 3, p. 217-224, 2011.

- LAHLALI, R.; SERRHINI, M. N.; JIJAKLI, M. H. Development of a biological control method against postharvest diseases of citrus fruit. **Communications on Agriculture and Applied Biological Sciences**, Ghent, v. 70, n. 2, p. 47-58, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.12.001>
- LANDELL, M. F. Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no parque de Itapuã-Viamão/RS. Porto Alegre, 2009. 187p.
- LASSOIS, L.; De BELLAIRE, L.; JIJAKLI, M. H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. **Biological Control**, Orlando, v. 45, n. 3, p. 410-418, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.013>
- LI, R., ZHANG, H., LIU, W., ZHENG, X. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 151–156, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.015>
- LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 96 p.
- MARI, M.; MARTINI, C.; GUIDARELLI, M.; NERI, F. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. **Biological Control**, Orlando, v. 60, n. 2, 2012.
- McLAUGHLIN, R. J.; WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L.; CHALUTZ, E. Effect of inoculum concentration and salts solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 80, n. 5, p. 456-461, 1990. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-80-456>
- MORALES, H.; SANCHIS, V.; USALL, J.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 61-67, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.056>
- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00193-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00193-8)
- QING, F.; SHIPING, T., Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 11, p. 1212-1216, 2000.
- REYES, M. E. Q.; ROHRBACH, K. G.; PAULL, R. E. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 193-203, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.003>
- SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTONA, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains and US 7 and *Candida Oleophila* strarin I-182: II. A study on mode of action. **Biological Control**, Orlando, v. 25, n. 2, p. 151-161, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00052-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00052-X)
- SARAVANAKUMAR, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. I. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 4, p. 183-193, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-008-9355-5>
- SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>

- TIAN, S. P.; FAN, Q.; XU, Y.; QIN, G. Z.; LIU, H. B. Effect of biocontrol antagonists applied in combination with calcium on the control of postharvest diseases in different fruit. **Bulletin-OILB/SROP**, Dijon, v. 25, n. 2, p. 193-196, 2002.
- TORRES, R.; TEIXIDO, N.; VINAS, I.; CASALINI, L.; GIRAUD, M.; USALL, J. Efficacy of Candida sake CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 3, p. 2703-2711, 2006.
- TOZZE JR., H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JR., N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000, v. 3, cap. 2, p. 41-56.
- XAVIER FILHA, M. S.; MICHEREFF, S. J. **Antracnose do pimentão**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006. 2p. (Manejo de Doenças de Hortaliças. Informativo Técnico 1).
- ZHANG, H. Y., MA, L., JIANG, S., LIN, H., ZHANG X., GE, L., XU, Z. Enhancement of biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* by salicylic acid against gray mold spoilage of strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. 122-125, 2010a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.022>
- ZHANG, H. Y., WANG, L., DONG, Y., JIANG, S., CAO, J. AND MENG, R. J. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. **Biological Control**, Orlando, v. 40, n. 2, p. 287-292, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.10.008>
- ZHANG, H. Y.; MA, L.; TURNER, M.; XU, H.; ZHENG, X.; DONG, X.; JIANG, S. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* against postharvest *Rhizopus* rot of strawberries and the possible mechanisms involved. **Food Chemistry**, Reading, v. 122, n. 3, p. 577-583, 2010b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.013>
- ZHANG, H. Y., WANG, L.; S DONG, Y.; ZHENG, X. D. Integrated control of postharvest blue mold decay of pears with hot water treatment and *Rhodotorula glutinis* **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 308-313, 2008.
- ZHANG, H. Y.; MA, L.; Turner, M.; Xu, H.; Ying Dong a, Song Jiang a. Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. **Food Chemistry**, Reading, v. 117, n. 3, p. 621-626, 2009a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.054>
- ZHANG, H. Y.; MA, L.; WANG, L., Jiang, S.; Dong, Y.; Zheng, X. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. **Biological Control**, Orlando, v. 47, n. 1, p. 60-65, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.06.012>
- ZHANG, H. Y.; WANG, L.; MA, L.; DONG, Y.; JIANG, S.; XU, B.; ZHENG, X. Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 167-171, 2009b.
- ZHENG, X. D., ZHANG, H. Y., SUN, P. Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. **European Food Research and Technology**, Germany, v. 220, n. 2, p. 353-357, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-004-1056-5>