

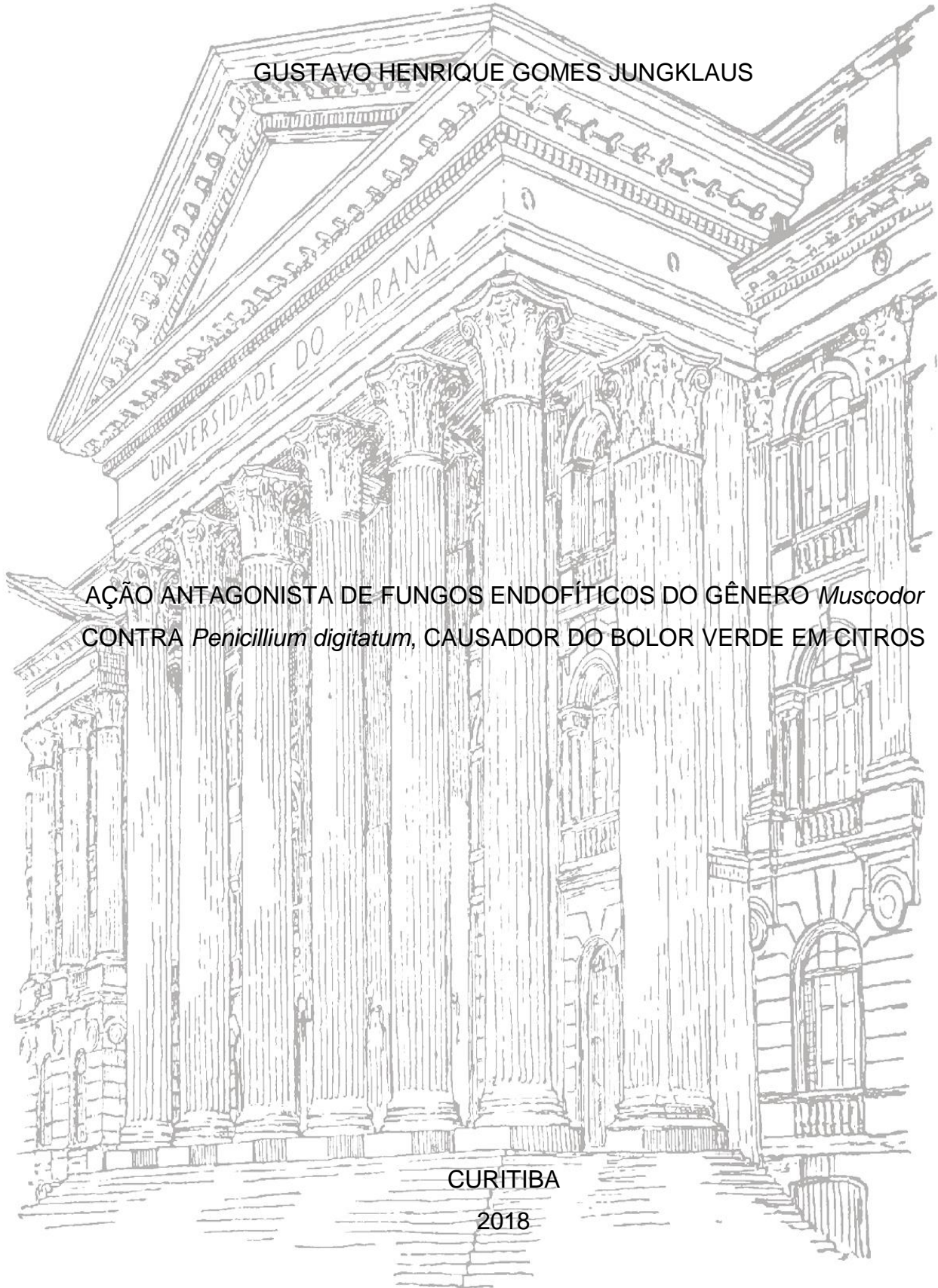
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO HENRIQUE GOMES JUNGCLAUS

AÇÃO ANTAGONISTA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Muscodor*
CONTRA *Penicillium digitatum*, CAUSADOR DO BOLOR VERDE EM CITROS

CURITIBA

2018



GUSTAVO HENRIQUE GOMES JUNGKLAUS

AÇÃO ANTAGONISTA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Muscodor*
CONTRA *Penicillium digitatum*, CAUSADOR DO BOLOR VERDE EM CITROS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, como requisito para obtenção do grau de Biólogo Bacharel, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Merlo Kava

Co-orientadora: Dr^ª. Lorena Carolina Pena

CURITIBA
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha Família, por me educarem, e por me amarem, por me encorajarem e por me guiarem.

Agradeço aos meus amigos, por estarem do meu lado nessa jornada chamada vida, por sorrirem e chorarem junto comigo, por estenderem a mão quando caí, e que sempre demonstram seu amor por mim.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Luciane Marinoni, por ter sido minha primeira orientadora, por ter aberto as portas de seu laboratório para mim, e me dar ensinamentos que, assim como nossa amizade, levo comigo até hoje, e levarei para sempre comigo.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Ida Chapaval Pimentel e Prof.^a Dr.^a Patrícia Dalzoto, pela amizade que remonta desde o início da minha graduação, que posteriormente foram minhas orientadoras na monitoria de suas disciplinas de microbiologia, atividade que me trouxe ensinamentos inestimáveis para a minha formação.

Agradeço imensamente à Prof.^a Dr.^a Vanessa Merlo Kava, pelo acolhimento e amizade, por todos esses anos de trabalho na Iniciação Científica, pela orientação nesta monografia, e pelos próximos 2 anos de mestrado que estão apenas começando.

Agradeço à Dr.^a Lorena Carolina Pena, pelos anos de parceria e amizade, com quem conduzi este trabalho na Iniciação Científica, e que darei continuidade no meu mestrado sob sua Co-orientação.

Agradeço cordialmente aos meus colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos e a todos os professores que, direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação, seja com conhecimento científico, conhecimentos para a vida, ou apenas amizade.

Por fim, agradeço cordialmente também à Prof.^a Dr.^a Ida Chapaval Pimentel e Prof.^a Dr.^a Lygia Vitória Galli-Terasawa, por aceitarem comporem a banca de avaliação deste trabalho, cujas considerações julgo de valor inestimável.

Não se pode aprender nada de uma lição que não seja acompanhada por dor, já que não se pode conseguir nada sem um sacrifício. Mas quando você aguenta essa dor e a supera, você consegue um coração forte que não perde para nada. Um coração de aço.

Edward Elric (Personagem de Hiromu Arakawa).

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de citros do mundo e doenças de pós colheita como o bolor verde, causado pelo fungo *Penicillium digitatum*, causam prejuízos na comercialização de frutos, e o seu controle acarreta aumento de custos na produção. Conjuntamente, a crescente preocupação com as consequências, tanto ambientais como na saúde humana, pelo uso de fungicidas no controle de doenças, abre uma demanda por alternativa aos agroquímicos. Os fungos do gênero *Muscodora* se destacam pela sua produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) com atividade antimicrobiana, podendo ser uma possível alternativa ao uso de fungicidas. Três isolados deste gênero, LGMF1254, LGMF1255 e LGMF1256, do Laboratório de Genética de Microrganismos, apresentaram resultados promissores em ensaios de antagonismo contra *P. digitatum* em testes em placas de Petri com divisória. Destes, o isolado LGMF1256 causou inibição total do patógeno, motivando outros experimentos para testar sua capacidade de inibir o crescimento do patógeno utilizando outros substratos para o crescimento de *Muscodora*, sendo estes, aveia e trigo, e em ensaios com frutos de laranja. No ensaio com substratos alternativos, o isolado LGMF1256 também causou inibição total do crescimento do patógeno, comprovando a atividade antimicrobiana dos COVs. Nos testes com laranjas de produção orgânica, a inibição foi significativa (67,02%), demonstrando que o isolado LGMF1256 é o mais promissor para futuros ensaios de controle da doença bolor verde. Com uso em frutos embalados ou armazenados em ambiente fechado, durante o transporte, por exemplo, esse isolado pode no futuro ser uma alternativa aos fungicidas atualmente utilizados.

ABSTRACT

Brazil is one of the greatest producers of citrus in the world, and post-harvest diseases, like the green mold, caused by *Penicillium digitatum*, is the main cause of production losses, and the control of this disease generates increase on production expenses. Also, the increasing concern on the usage of fungicides on environment and human health, brings a need for alternatives to agrochemicals. The fungi of genus *Muscodor* are highlighted for their production of volatile organic compounds (VOCs) with antimicrobial activity, being a possible alternative to the usage of fungicides. Three isolates of this genus, LGMF1254, LGMF1255 and LGMF1256, from Laboratory of Genetics of Microorganisms (LabGeM), presented promising results in antagonism assays against *P. digitatum* in tests in Petri dishes with division. Amongst them, the isolate LGMF1256 caused total inhibition of the pathogen, motivating the continuation of experiments to determine its capacity to inhibit the pathogen using other substrate for the development of *Muscodor*, oat and wheat, and assays with orange fruits. In assay using alternative substrates, the isolate also showed total inhabitation of the pathogen, attesting its VOCs antimicrobial activities. In tests with orange fruits from organic production, the inhibition was significant (67,02%), proving that the isolate LGMF1256 is the most promising for future control assays of the green mold disease. With usage in packed fruits or storage fruits, during transportation for example, this isolate might, in the future, be an alternative to fungicides used nowadays.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. OBJETIVOS.....	09
2.1. Objetivo geral.....	09
2.2. Objetivos específicos.....	09
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1. <i>Citrus</i> sp.	10
3.2. <i>Penicillium digitatum</i>	10
3.3. Controle Biológico.....	11
3.4. Compostos Orgânicos Voláteis.....	11
3.5. Biofumigação.....	12
3.6. <i>Muscodor</i> sp.	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Material biológico.....	14
4.2. Ensaio de antagonismo em BDA.....	14
4.3. Antagonismo utilizando grão como fonte de nutriente.....	14
4.4. Antagonismo em frutos destacados	15
4.5. Análise estatística.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1. Ensaio de antagonismo em BDA.....	17
5.2. Antagonismo utilizando grão como fonte de nutriente.....	18
5.3. Antagonismo em frutos destacados.....	19
6. CONCLUSÕES.....	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores de citros e também é o maior produtor de laranja do mundo (USDA, 2017). Entretanto a ocorrência de doenças causadas por fungos fitopatogênicos prejudica as taxas de produtividade e o controle dessas doenças encarece a sua produção (PENA, et al. 2016). Entre os fitopatógenos mais importantes está o fungo *Penicillium digitatum*, causador da principal e mais agressiva doença de pós-colheita em citros, o bolor verde (BV) (FORNER et al. 2013), que apodrece o fruto, inviabilizando a sua comercialização e consumo. Essa doença é controlada atualmente por meio de fungicidas; entretanto, pela preocupação com o meio ambiente, a saúde do consumidor e a seleção de cepas resistentes a agroquímicos, é necessário o desenvolvimento de alternativas a eles (DROBY et al. 2016).

Uma possível alternativa aos fungicidas é a biofumigação. Inicialmente descrita como aproveitamento da decomposição de *Brassica* spp., no controle de infestação de nematoides de solo (ANGUS et al. 1994). A descoberta da produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) por fungos com atividade biológica, inspirou uma nova abordagem da biofumigação (MERCIER, JIMENEZ, 2004). O gênero *Muscodor*, descrito pela primeira vez em 2001 (WORAPONG et al. 2001), atualmente possui 21 espécies validadas no MycoBank (<http://www.mycobank.org>). Este gênero destaca-se pela produção de COVs com atividade biológica, entre elas, atividade antifúngica sobre patógenos agrícolas (MERCIER, SMILANICK, 2005). Os COVs produzidos por isolados de *Muscodor* spp. não inibem fungos pertencentes ao mesmo gênero, característica que facilita a bioprospecção de novas espécies (EZRA et al. 2004, KUDALKAR et al., 2012, PENA et al. 2016). O isolado obtido por Pena et al. 2016, *Muscodor* sp. LGMF1254, mostrou atividade antagonista contra os patógenos *Penicillium digitatum* e *Phyllosticta citricarpa*, causadores das doenças bolor verde (BV) e mancha preta dos citros (MPC) respectivamente. Os isolados obtidos por Pena et al. 2018, *Muscodor* sp. LGMF1255 e LGMF1256, têm demonstrado resultados ainda mais promissores contra *P. digitatum*, podendo ser uma possível alternativa ao uso de agroquímicos no transporte de citros.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos do gênero *Muscodor* isolados no Brasil contra o fitopatógeno de citros *Penicillium digitatum*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antagonista dos Compostos Orgânicos Voláteis produzidos pelos isolados de *Muscodor* LGMF1254, LGMF1255 e LGMF1256 contra *Penicillium digitatum* em meio Batata Dextrose Agar como substrato.
- Estimar a persistência da atividade antagonista dos COVs produzidos pelo isolado *Muscodor* LGMF1256 contra *Penicillium digitatum*, utilizando aveia e trigo como substrato para o crescimento de *Muscodor*.
- Determinar a capacidade inibitória do desenvolvimento dos sintomas do Bolor Verde em laranjas infectadas artificialmente com *P. digitatum* na presença de *Muscodor* LGMF1256.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Citrus* sp.

Os citros abrangem as plantas pertencentes aos gêneros *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, e alguns híbridos, todos pertencentes à família Rutaceae (MATTOS JUNIOR et al., 2005). É uma das culturas de maior importância econômica no mundo, sendo os maiores exemplos a laranja (*C. sinensis*), o limão (*C. limonum*), e a tangerina (*C. reticulata*) (LIU, et al. 2012). O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de citros, e o maior produtor de laranjas do mundo (FAO, 2016; USDA, 2017). Os citros podem ser consumidos *in natura* ou processados, sendo este último o destino de aproximadamente um terço da produção mundial de laranja (USDA, 2006). A origem dos citros é controversa, entretanto, o mais aceito é que são originários da Ásia (LIU, et al. 2012). Historicamente, o consumo de laranja se popularizou pela sua propriedade anti-escorbuto, consumida pelos marinheiros durante as grandes navegações (LAWS, 2013).

O Limão foi introduzido no mediterrâneo por volta do século VIII, enquanto a laranja só é encontrada em registros posteriores o século XV (DUARTE et al. 2016). Que por sua vez, foi introduzida nas Américas pelos portugueses e espanhóis por volta do século XVII (LIU et al., 2016).

3.2. *Penicillium digitatum*

Penicillium digitatum é um Ascomycota, pertencente à família Trichocomaceae, sendo essa família de grande importância tanto positiva quanto negativa para a humanidade (HOUBRAKEN, SAMSON, 2011). O gênero é historicamente conhecido pela descoberta do antibiótico penicilina, por Alexander Fleming, pelo seu uso na produção de queijo e por ser um importante patógeno de pré e pós-colheita (VISAGIE et al. 2014).

P. digitatum é o patógeno de pós-colheita de maior importância para citros, pois causa o bolor verde, podendo representar até 90% das causas de perda da safra (MARCET-HOUBEN et al. 2012). Para que ocorra o desenvolvimento da doença, é necessário que já haja algum tipo de injúria na casca, seja causada por algum agente no campo, ou apenas pela manipulação ou transporte (BROWN, CHAMBERS, 1996). Nos 3 primeiros dias os sintomas ainda não são visíveis na

fruta, podendo espalhar a doença para outras frutas durante armazenagem (PALOU, 2014) por ser julgada como saudável. A partir do terceiro dia é possível ver uma área branca com textura algodoadosa, que posteriormente terá coloração verde-oliva (PALOU, 2014). Atualmente a doença é prevenida através de fungicidas, entretanto, a seleção de cepas resistentes aos agroquímicos, como também os riscos ambientais e de saúde causado por resíduos desses produtos são uma crescente preocupação (SHARMA et al. 2009).

3.3. Controle Biológico

O controle biológico de pragas e doenças passou a ser foco dentro das pesquisas agrícolas por conta da demanda de alimentos sem resíduos de agroquímicos. No Brasil especificamente, os primeiros bioinseticidas surgiram na década de 50, e o controle por ação antagonista, no início da década de 90 (BETTIOL et al. 2009). Os organismos que se destacam no controle biológico são os fungos entomopatogênicos e os fungos endofíticos (ESPOSITO, AZEVEDO, 2010). O biocontrole por fungos possui diferentes tipos de mecanismos, podendo ser por competição, onde um dos fungos cresce mais eficientemente que o outro (MELO; AZEVEDO 1998); por parasitismo, no qual ele terá o hospedeiro como fonte de nutrientes, e na antibiose, o organismo produz metabólitos que acabam por inibir o desenvolvimento de outro (AMORIM et al. 2010). Os fungos do gênero *Muscodor*, apresentam ação de inibição a diversos patógenos, tanto humanos quanto vegetais (DAISY et al. 2002, STROBEL, 2011).

3.4. Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)

Alguns microrganismos, principalmente fungos, são produtores de COVs (ROBINSON; PARK, 1966). Desde essa descoberta, na década de 60, um dos maiores focos de pesquisa na área vem sendo a procura por outros fungos produtores de COVs, assim como a composição desses compostos. Os COVs são resultado de processos metabólicos de plantas, bactérias ou fungos, como fermentações anaeróbicas e degradação de substâncias orgânicas complexas (INSAM; SEEWALD, 2010). Fungos do gênero *Fusarium*, (ROBINSON; PARK, 1966) e do gênero *Muscodor* (STROBEL et al. 2001; WORAPONG et al. 2002), são produtores desses compostos voláteis. Desde então, pesquisas vem sendo feitas

sobre o efeito destes COVs em outros fungos, como a inibição de esporos. O termo esporostático passou a ser usado para descrever fungos que paravam de produzir esporos por conta de alguma inibição, seja ela da própria colônia ou proveniente de outras colônias (ROBINSON; PARK 1966).

3.5. Biofumigação

A Biofumigação é uma alternativa à utilização de químicos tóxicos no controle de doenças de pós-colheita, que por sua vez já possui pouca variedade, sendo o mais utilizado dióxido de enxofre (MERCIER, JIMENEZ, 2004). Os tecidos de *Brassica* spp. são ricos em glucosinolatos, que ao serem hidrolizados tornam-se Isotiocianatos biodegradáveis e de baixa persistência no solo (GIMSING, KIRKEGAARD, 2009), e como apresentam atividade biológica, são usados no controle de infestação de nematoides em culturas (ANGUS et al. 1994). Na micologia, essa técnica ganhou uma nova abordagem com a descrição de *Muscodor albus* (GOMES, et al., 2015), consistindo no uso dos COVs produzidos para o controle de doenças de pós-colheita. A vantagem dessa técnica além da não utilização de componentes potencialmente tóxicos, por ser volátil, consegue preencher a totalidade do espaço de armazenagem, evitando novos contatos com o estoque para posterior fumigação (MERCIER, JIMENEZ, 2004; GOMES, et al. 2015).

3.6. *Muscodor* sp.

Muscodor é um gênero de fungos endofíticos pertencente à família Xylariaceae, que tem até o momento 21 espécies validadas, sendo que o primeiro fungo do gênero *Muscodor*, *M. albus*, foi descrito em 2001 (WORAPONG et al., 2001). Os primeiros isolados deste gênero obtidos no Brasil foram utilizados no presente trabalho. Estes foram isolados de folhas de Laranja doce (*Citrus sinensis* – LGMF1254) e de Aroeira, (*Schinus terebinthifolius* Raddi – LGMF1255 e LGMF1256) (PENA, 2014; PENA, et al. 2018). As características marcantes desse fungo são seu micélio branco, e o fato de não produzir esporos, mas a característica de maior interesse é sua produção de voláteis que inibem o crescimento de outros fungos que não sejam do seu gênero, ajudando na bioprospecção para identificação de novas espécies e no controle biológico (EZRA et al. 2004, KUDALKAR et al.

2012). O isolado LGMF1254, quando cultivado em meio BDA por 10 dias, têm o Thujopseno, Cedrino e Azulino como os COVs com maior representatividade em análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PENA, et al. 2016). O Thujopseno já é descrito com poder antimicrobiano (KUDALKAR et al. 2012), sendo, provavelmente, um dos responsáveis pela ação antifúngica já demonstrada por LGMF1254 (PENA, et al. 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material biológico

O patógeno *Penicillium digitatum* LGMF1507 (Genbank: KY978834) foi isolado de uma laranja de mercado com sintomas do bolor verde, e foi identificado por sequenciamento de DNA da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS). O isolado *Muscodor* sp. LGMF1254 (Genbank: KT956909) foi isolado de folhas saudáveis de *Citrus sinensis* (PENA et al., 2016). Este isolado foi inoculado em placas de Petri com meio BDA nos isolamentos subsequente, tendo ação seletiva para obtenção dos isolados *Muscodor* sp. LGMF1255 (Genbank: KY924493) e *Muscodor* sp. LGMF1256 (Genbank: KY924494), ambos obtidos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Todos estes isolados estão depositados na coleção microbiológica do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da UFPR.

4.2. Ensaio de antagonismo em BDA

Foi vertido meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) pH 5,8 em placas de Petri de plástico com divisória, onde de um lado foi repicado um *plug* de 5 mm de diâmetro de micélio do fungo antagonista do gênero *Muscodor* (LGMF1254, LGMF1255 ou LGMF1256). As placas foram incubadas em B.O.D. ajustada para a temperatura de 25 °C por cinco dias. Então, do outro lado da placa foi transferido um pequeno repique a partir da camada superficial esporulada da colônia do patógeno *Penicillium digitatum*. O controle consistiu em placas contendo apenas o patógeno, sem nenhum agente inibitório. As placas foram vedadas com uma fita de 100 mm x 25 mm de Parafilm® e uma tira de 25 mm x 282 mm de fita adesiva. Foram feitas 10 placas de cada condição. Foi feito registro fotográfico todos os dias por 5 dias, a área de crescimento das colônias foi medida com o auxílio do programa ImageJ (SCHNEIDER et al. 2012).

4.3. Antagonismo utilizando grão como fonte de nutriente

Foram postos 75 g do grão (grão de trigo ou floco de aveia) junto com 150 mL de água destilada em frascos Béqueres de 1 L e autoclavados uma vez por dia, em dois dias consecutivos, e deixados em repouso por dois dias. Metodologia adaptada de Mercier, Jimenez, 2004. Depois, com o auxílio de uma espátula de metal

autoclavada, o grão autoclavado foi transferido para um dos lados das placas de Petri de plástico com divisória, e do outro lado foi vertido meio BDA pH 5,8. Em seguida foi depositado um *plug* de 5mm de *Muscodor* sp. LGMF1256 em um dos lados da Placa. Foram utilizados três grupos: o controle positivo consistiu no uso de meio BDA com inóculo do patógeno, e do outro lado, o meio de cultivo (BDA, grão de trigo ou flocos de aveia) sem agente inibidor. O grupo controle negativo consistiu no uso de BDA dos dois lados, havendo o patógeno de um lado, e o antagonista previamente inoculado no outro. O grupo tratamento consistiu no antagonista inoculado previamente sobre o grão (trigo ou aveia) e o patógeno inoculado sobre BDA. As placas foram incubadas em B.O.D. 25 °C por cinco dias. Sendo então, transferido um pequeno repique a partir da camada superficial esporulada da colônia do patógeno *P. digitatum* no outro lado da placa. As placas foram vedadas com uma fita de 100 mm x 25 mm de Parafilm®, e uma tira de 25 mm x 282 mm de fita adesiva. Foram feitas 10 placas de cada condição. O registro fotográfico ocorreu todos os dias por 5 dias, sendo a área de crescimento das colônias medidas com o auxílio do programa ImageJ (SCHNEIDER et al. 2012).

4.4. Antagonismo em frutos destacados

Metodologia adaptada de López-Pérez et al. 2014. O fungo antagonista *Muscodor* sp. LGMF1256 foi inoculado em três pontos equidistantes com inóculos de 5mm de diâmetro em placas de Petri de plástico com meio BDA pH 5,8 e incubado a 25°C. O experimento foi realizado após o isolado ter ocupado pelo menos 80% da superfície da placa de Petri, ocorrendo aproximadamente no 15º dia após a inoculação. Foram utilizadas 20 laranjas var. *Pera* de produção orgânica. A desinfestação superficial dos frutos foi realizada imergindo-as em álcool 70% por um minuto, seguido por solução de hipoclorito 2,5 % por três minutos, novamente álcool 70% por 30 segundos, seguido de água destilada por seis minutos, e novamente água destilada por seis minutos. Em seguida foram feitas injúrias nas laranjas com uso de objeto perfurante e inoculados sobre as injúrias 10 µL de solução de esporos de *Penicillium digitatum* com concentração 10⁶/µL em câmara de Neubauer. Foram utilizados potes de plástico de 11 cm de diâmetro e 8 cm de altura, esterilizados por exposição a raio ultravioleta germicida durante 30min, para então os frutos serem alocados. O grupo controle possuiu apenas as laranjas artificialmente infectadas em

potes de plástico vedados com fita adesiva, e o grupo tratamento possuiu as laranjas artificialmente infectadas junto da placa, sem a tampa, com o antagonista LGMF1256 no pote de plástico vedado com fita adesiva. A documentação fotográfica foi realizada diariamente por 5 dias, e o acompanhamento por inspeção visual continuou até o 10^o dia. As taxas de crescimento foram avaliadas com o auxílio do programa ImageJ (SCHNEIDER et al. 2012).

4.5. Análise estatística

A partir dos dados obtidos pelas medições no ImageJ (SCHNEIDER et al. 2012), foi aplicado análise de variância e o teste de Tukey pelo programa Assistat 7.7 (SILVA, AZEVEDO, 2016) e com os resultados, foi confeccionado o gráfico de crescimento do controle e dos tratamentos no Microsoft Office® Excel 2016.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de antagonismo em BDA

Após os cinco dias de experimento, pode-se observar que houve influência dos isolados de *Muscodor* sp. sobre o desenvolvimento de *Penicillium digitatum* (Tabela 1). Nos tratamentos houve um retardo no crescimento da colônia, comparando com o controle (Gráfico 1). O isolado LGMF1254 apresentou inibição significativa apenas no segundo dia, já o isolado LGMF1255 apresentaram inibição do patógeno a partir do 3º dia. Ao longo do 4º dia, diferentemente do controle, as colônias não desenvolveram a coloração verde-oliva característica da sua esporulação. Dentre os três isolados, o LGMF1256 se mostrou o mais eficiente, inibindo por completo o desenvolvimento do patógeno. Posterior observação, envolvendo a realocação de inóculos de *P. digitatum* do experimento, para placas de Petri sem o antagonista, observou-se que o isolado teve uma atividade fungistática. O gênero *Muscodor* é o mais estudado no uso de COVs para controle de doenças de pós colheita, tendo suas espécies descritas com capacidade de inibir e matar fungos de diversos gêneros, inclusive *Penicillium* (MARI et al. 2007). Sua eficiência como controlador biológico depende de diversos fatores, como meio de cultivo, método de aplicação, e condições ambientais (TALIBI et al. 2014), apresentando bons resultados à 25°C, e menor eficiência à baixas temperaturas, sendo ineficiente aos 3°C (MARI et al. 2007). Devido a esses resultados promissores, o isolado LGMF1256 foi selecionado para os próximos ensaios.

Tratamentos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Controle	0,04320 ab	1,00140 a	3,15480 a	7,82540 a	10,2610 a
LGMF1254	0,03060 ab	0,66300 b	2,83160 a	6,21980 ab	8,26180 a
LGMF1255	0,04520 a	0,66268 b	2,55800 a	4,67640 b	4,63480 b
LGMF1256	0,00540 b	0,00540 c	0,00920 b	0,00920 c	0,00920 c

Tabela 1: Dados do teste de Tukey ($p < 0,05$) ao decorrer de cinco dias de análise a partir das áreas do grupo Controle e dos grupos tratamentos (LGMF 1254, LGMF1255 e LGMF1256) do antagonismo dos isolados de *Muscodor* com o fungo fitopatogênico *Penicillium digitatum*.

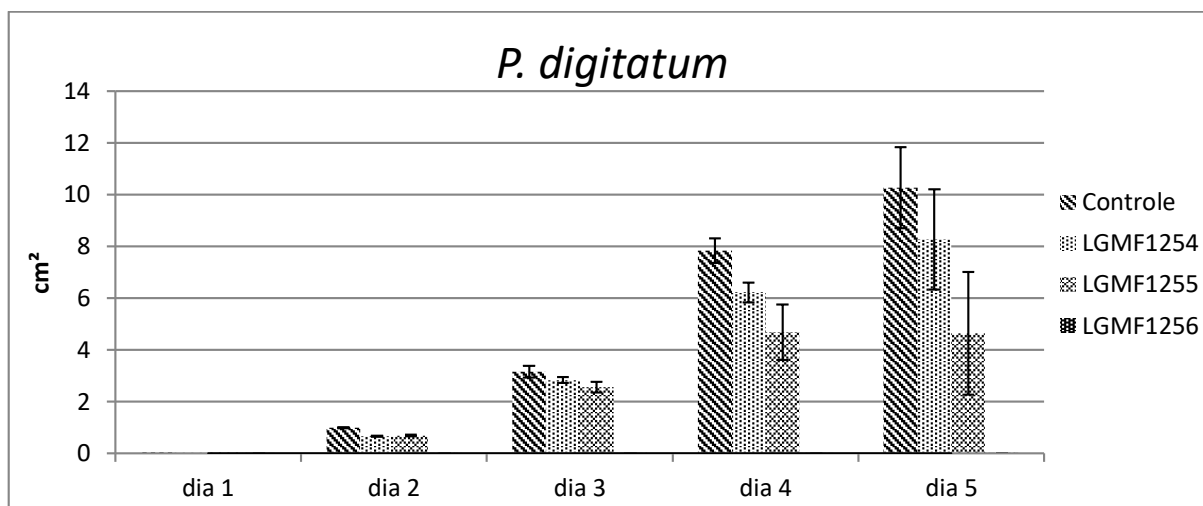


Gráfico 1: Crescimentos das áreas (cm²) do grupo controle e dos grupos tratamentos (LGMF1254, LGMF1255 e LGMF1256) do *Penicillium digitatum* em culturas de crescimento pareado com isolados do gênero *Muscodor*.

5.2. Antagonismo utilizando grão como fonte de nutriente

Como demonstrado anteriormente, o isolado LGMF1256 inibiu o patógeno em BDA no controle negativo do experimento (Tabela 2). Consecutivamente, o antagonista crescendo em grão (trigo ou aveia) também apresentou inibição total do patógeno ao longo dos cinco dias de observação (Tabela 2, Figura 1). A composição do meio de cultivo tem grande importância nos voláteis produzidos (EZRA, STROBEL, 2003), no ensaio consistindo na realocação de inóculos de *P. digitatum* do experimento, para placas de Petri sem o antagonista, demonstrou atividade fungicida sobre o patógeno, quando em BDA, LGMF1256 teve atividade fungicida. Em grão de centeio (*Poaceae*) *Muscodor albus* é descrito produzindo um total de 28 COVs (MARI et al. 2007), entre eles, a maior quantidade de ácido isobutírico, um dos responsáveis pela sua atividade antimicrobiana, já registrada anteriormente (MERCIER, et al. 2007).

P. digitatum (cm²)

Meio	
Controle	18.96 a
PDA	00.01 b
aveia	00.03 b
trigo	00.04 b

Tabela 2: Dados do teste de Tukey ($p < 0,05$) apenas no 5^o dia sob as condições Controle (apenas *P. digitatum*) e tratamentos em teste de antagonismo com o isolado LGMF1256.

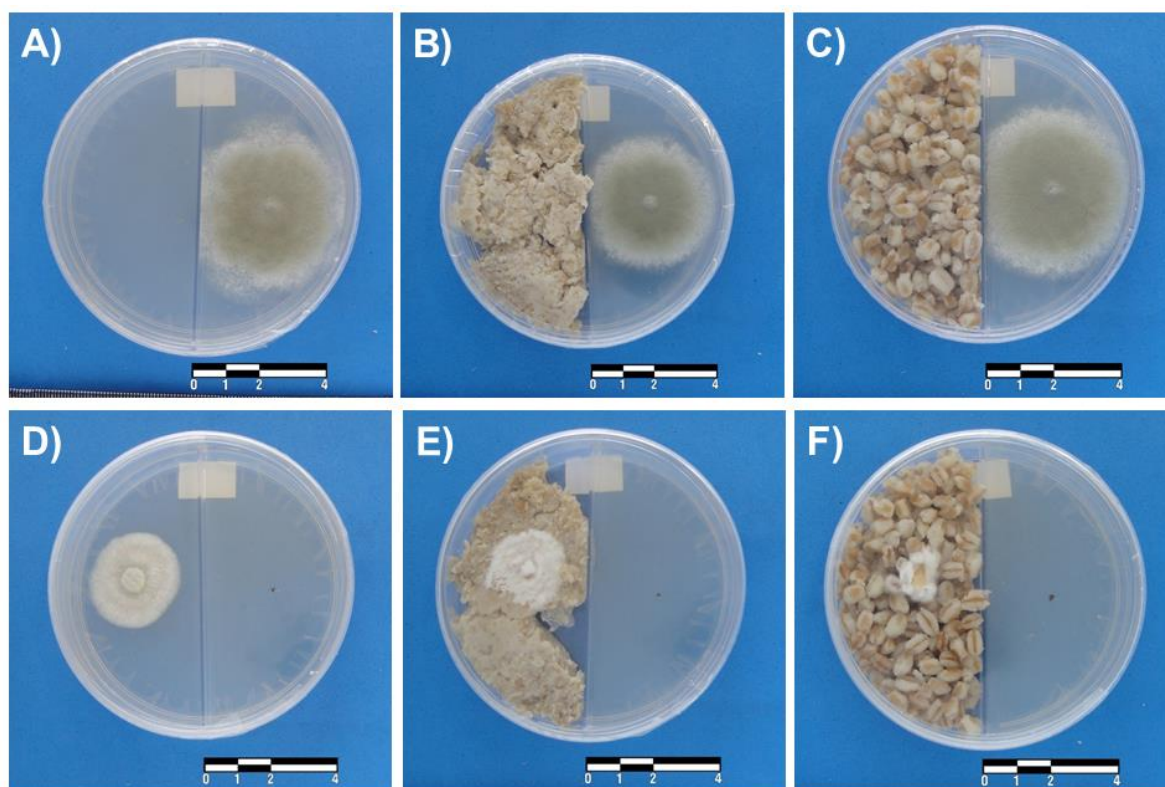


Figura 1: Experimento de antagonismo utilizando grãos como meio de cultivo de *Muscodor* LGMF1256 no quinto dia de avaliação, Controles positivos (A, B, C), controle negativo (D) e tratamentos (E e F). Sendo utilizado como meio de cultivo do patógeno sempre BDA, e para o antagonista BDA (A e D), flocos de aveia (B e E) e grão de trigo (C e F).

5.3. Antagonismo em frutos destacados

Buscando alcançar condições próximas à realidade numa situação de armazenagem, se fez necessário a experimentação utilizando frutos. A perfuração da casca, dando ao patógeno acesso ao albedo da laranja, garantiu o sucesso no estabelecimento da doença (Figura 2) (LÓPEZ-PÉREZ, et al. 2014). As taxas de crescimento no controle e no tratamento foram equiparadas até o segundo dia de experimento, sendo possível verificar o descompasso de crescimento no terceiro dia de avaliação, porém, ainda sendo estatisticamente iguais. A partir do quarto dia que a diferença estatística entra o tratamento e o controle é visível (Tabela 3, Gráfico 2, Figura 2). Sendo, no quinto dia, a lesão causada por *P. digitatum* 67,02% menor na presença de *Muscodor* LGMF1256. A dispersão aérea dos COVs de *Muscodor* sp. sem necessidade de contato com o fruto é o principal fator que torna o seu uso no

controle de patógenos de pós colheita vantajoso (MERCIER, JIMÉNEZ, 2003). A diferença nos resultados *in vitro* para o resultado *in vivo* pode derivar da diferença de espaço entre o pote e a placa de Petri, havendo uma menor concentração dos COVs. Entretanto, estes resultados demonstram que o isolado LGMF1256 possui eficiência em minimizar o desenvolvimento da doença.

Tratamento	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5
controle	0,8774	3,6744	9,1682	18,2994	25,2052
1256	0,6816	2,37473	3,9476	6,9894	8,3174

Tabela 3: Crescimentos (em cm²) do grupo controle e do grupo tratamento LGMF1256 do *P. digitatum* *in vivo* em laranjas variedade *Pera*, no qual a diferença no desvio padrão do tratamento e do controle é verificado a partir do 4^o dia.

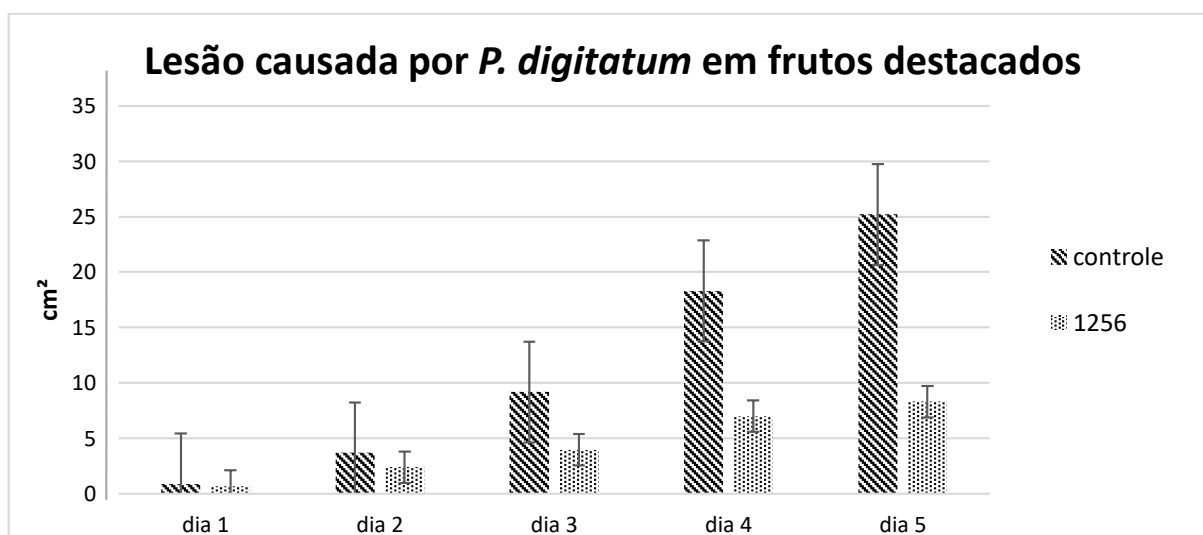


Gráfico 2: Tamanho em área (cm²) da lesão de bolor verde, causada pelo *P. digitatum*, em laranjas destacadas, do grupo controle contendo apenas o patógeno inoculado, e do grupo tratamento contendo o patógeno infestando o fruto na presença de *Muscodor* LGMF1256, ao longo de cinco dias.

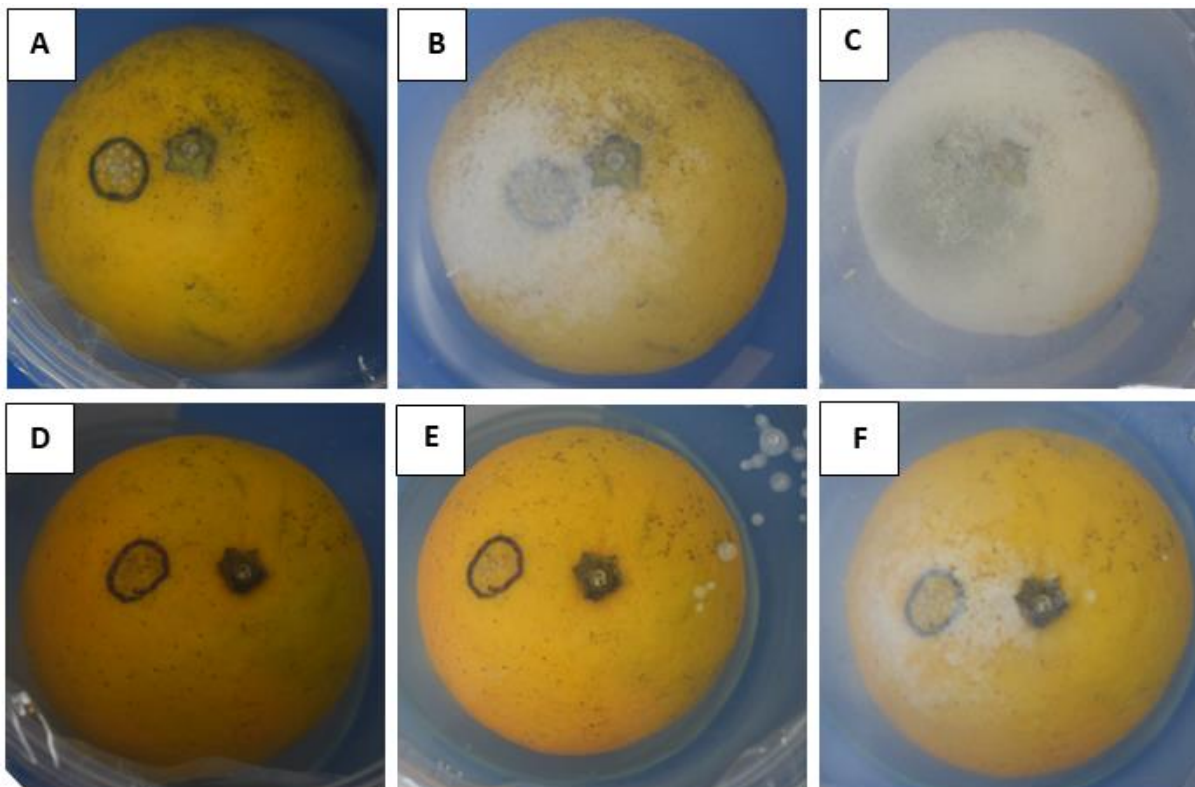


Figura 2: Fotos das laranjas var. *Pera*, infectas no controle (A, B e C) e do tratamento com o isolado LGMF1256 (D, E e F), no 4º dia (A e D), no 5º dia (B e E) e no 6º dia (C e F).

6. CONCLUSÕES

A crescente preocupação com o uso de agroquímicos e seus resíduos refletem em uma necessidade à outras formas de manejar doenças que acometem plantas de interesse econômico. Os fungicidas, além de terem efeito seletivo em cepas resistentes aos seus princípios ativos, deixam resíduos que têm impactos negativos no ecossistema e na saúde humana. Por outro lado, compostos de origem natural tem menos chance de serem prejudiciais e residuais no ecossistema. O controle biológico por meio dos COVs produzidos pelos fungos do gênero *Muscodor* vêm sendo descrito como uma possível alternativa aos fungicidas utilizados atualmente. Pela análise dos experimentos conduzidos neste projeto, observou-se que os isolados do gênero *Muscodor* utilizados apresentam grande potencial na inibição de *P. digitatum*, causador da doença que é uma das principais causas de perdas na citricultura. Em especial, o isolado LGMF1256 demonstrou ação inibitória promissora sobre o crescimento do patógeno. E os resultados demonstrados nos cultivos em grãos e nos testes em frutos demonstra que esse isolado seria um bom candidato para uso no controle biológico desse patógeno durante seu transporte, minimizando perdas e possivelmente, diminuindo custos de manejo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUS, J.F.; GARDNER, P.A.; KIRKEGAARD, J.A.; DESMARCHÉLIER, J.M. Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162, p. 107-112, 1994.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. v. 1. p. 704, 2010.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORRÉA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L.; Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. *Revisão anual de patologia de plantas* 17, p.111- 147, 2009.

BROWN, G. E.; CHAMBERS, M. Evaluation of biological products for the control of postharvest diseases of florida citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 109, p. 278-282, 1996.

DAISY, B.H.; STROBEL, G.A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D.K. and RUNYON, J.B. Naphthalene, and insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 148, p. 3737-3741, 2002.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; TEIXODÓ, N.; SPADARO, D.; JIJAKLI, M. H. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 2016.

DUARTE, A.; FERNANDES, J.; BERNARDES, J.; MIGUEL, G.; Citrus as a componente of the mediterranean diet. *Journal of Spatial and Organizational Dynamics*, IV (4), p. 289-304, 2016

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ed. Revisada e ampliada: Educs, 2010.

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

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

FAO, 2016. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA&subject=4>>. Acesso em: 01/05/2016.

FORNER, C.; BETTIOL, W.; NASCIMENTO, L. M. do; TERAPO, D. Controle em pós-colheita de *Penicillium digitatum* em laranja-pera com microrganismos e tratamento térmico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal – SP, v. 35, n. 1, p. 23-31, 2013.

GIMSING, A. L.; KIRKEGAARD, J.A. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolatos and their hydrolysis products in soil. *Phytochem Rev* 8, p. 299-310, 2009.

GOMES, A. A. M.; QUEIROZ, M. V.; PREREIRA, O. L. Mycofumigation for the Biological Control of Post- Harvest Diseases in Fruits and Vegetables: A Review. *Austin J Biotechnol Bioeng* 2(4):1051, 2015.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology* 70, p. 1-51, 2011.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatile Organic Compounds (VOCs) in soils. *Biol. Fertil. Soils* 46, p. 199-213, 2010.

KUDALKAR, P.; STROBEL, G.; UL-HASSAN, S. R.; GEARY, B. *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. *Mycoscience* 53, p. 319-325, 2012.

LAWS, BILL. 50 Plantas que mudaram o rumo da História. Rio de Janeiro: Sextante, 2013.

LIU, Y. Q.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11, p. 530-545, 2012

LÓPEZ-PÉREZ, M.; BALLESTER, A. R.; GONZÁLES-CANDELA, L. Identification and functional analysis of *Penicillium digitatum* genes putatively involved in virulence towards citrus fruits. *Molecular Plant Pathology*, 2014.

MARCET-HOUBEN, M.; BALLESTER, A.; FUENTE, B. de la; HARRIES, E.; MARCOS, J. F.; GONZÁLES-CANDELAS, L.; GABALDÓN, T. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics* 13:646, 2012.

MARI, M.; NERI, F.; BERTOLINI, P. Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruits. *Stewart Postharvest Review* 6:4, 2007.

MATTOS JUNIOR, D. de; NEGRI, J. D. de; FIGUEIREDO, J. O. de; POMPEU JUNIOR, J.; CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Instituto Agrônomo de Campinas. 2005. Disponível em: < http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/43.pdf > acesso em: 15/06/18.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguaraúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 262, 1998.

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

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

MERCIER, J., JIMÉNEZ-SANTAMARÍA, J. I., TAMEZ-GUERRA, P. Development of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a novel antimicrobial biofumigant. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25, 173–179, 2007.

PALOU, L. Chapter 2 - *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold), em *Postharvest Decay*, Academic Press, 2014, 45 – 102, 2014.

PENA, L. C. *Muscodor* spp isolados no Brasil: identificação, produção de compostos voláteis e potencial uso em controle biológico. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PENA, L. C., JUNG, L. F., SAVI, D. C., SERVIENSKI, A., ALUIZIO, R., GALLI-TERASAWA, L. T., SALES MAIA, B. H. L. N., ANNIES, V., FRANCO, C. R. C., GLIENKE, C.; KAVA, V. A *Muscodor* strain isolated from *Citrus sinensis* and its production of volatile organic compounds inhibiting *Phyllosticta citricarpa* growth. *J Plant Dis Prot.*, 123, p. 1-12, 2016.

PENA, L. C., JUNGKLAUS, G. H.; SAVI, D. C.; FERREIRA-MABA, L.; SERVIENSKI, A.; DE SOUZA MAIA, B. H. L. DE N. S.; ANNIES, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; GLIENKE, C.; KAVA, V. *Muscodor brasiliensis* sp. nov- isolated from *Schinus terebinthifolius* and its inhibitory action against *Penicillium digitatum*, the green mold agent in citrus, em submissão, 2018.

ROBINSON P. M.; PARK, D. Volatile Inhibitors of spore Germination producer by fungi. *Trans. Br. Mycol Soc.* 49 (4) 639- 649, 1966.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature methods* **9(7)**: 671-675, 2012.

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

SILVA F.A.S., AZEVEDO C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 2016.

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

STROBEL, G. A. *Muscodora* species- endophytes with biological promise. *Phytochem Rev.* 10:165–17, 2011.

TALIBI, I.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E. H., AIT BEN AOUMAR, A. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology* 117, p. 1-17, 2014.

USDA, United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service (2006). Citrus — Special Feature Article. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/htp/Hort_Circular/2006/02-06/02-20-06%20Citrus%20Feature.pdf> acesso em: 08/07/2017

USDA, United States Department of Agriculture (2017) Citrus: World Markets and Trade. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>> Acesso em: 08/07/2017.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R.A. Identification and nomenclature of the Genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78, p. 343-371, 2014.

WORAPONG, J.; STROBEL, G; HESS, W. M. *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. Mycotaxon 79: 67-79. 2001.

WORAPONG, J.; STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.F.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. Mycotaxon 81, p. 463-475. 2002.