

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

DANIELLE ALVES SANTOS

CONTROLE BIOLÓGICO EM MORANGOS *IN NATURA*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2014

DANIELLE ALVES SANTOS

CONTROLE BIOLÓGICO EM MORANGOS *IN NATURA*

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho.

LONDRINA
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

CONTROLE BIOLÓGICO EM MORANGOS *IN NATURA*

DANIELLE ALVES SANTOS

Este(a) Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado(a) em 5 de agosto de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O(a) candidato(a) foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^o. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Prof. Orientador

Prof^a. M^a. Natália Vicente De Rezende Mudenuti
Membro titular

Prof^o. Dr. Claudio Takeo Ueno
Membro titular

Dedico este trabalho ao meu marido, pelo
apoio incondicional e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória.

Ao meu marido, que tão pacientemente suportou minhas variações de humor durante este período.

A meus pais e irmão que tanto me apoiaram.

Aos grandes amigos que fiz, em especial Tatiane e Nicácia que estão comigo desde o começo, a Janaina, Viviane, Isabela, Herrison e Magali, com quem fui me encontrando e, desde então, sempre me acompanharam.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná – câmpus Londrina, que me proporcionou a conclusão deste trabalho.

A Deus, pois sem Ele nada é possível.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Não existe tecnologia maior que a
natureza.

(Autor Desconhecido)

RESUMO

SANTOS, Danielle A. **Controle biológico em morangos *in natura***. 2014. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2014.

A cultura do morango é bastante susceptível à doença do mofo-cinza, causada por *Botrytis cinerea*, acarretando em grandes perdas na pós-colheita. Em razão disto, buscou-se por meio de controle biológico empregando leveduras *killer* antagonistas, inibir o crescimento do fungo, e conseqüentemente a deterioração dos frutos, além de contribuir com a diminuição do uso de fungicidas sintéticos. Neste estudo isolou-se 18 leveduras de amostras de milho e trigo, sendo 12 culturas (66,67%) caracterizadas como *killer* positivas contra pelo menos umas das cepas sensíveis padrão utilizadas. Destas, quatro leveduras apresentaram maior espectro de ação *killer*, sendo então submetidas ao antifungigrama em meio sólido, em três diferentes concentrações de inóculo (10^5 , 10^6 e 10^7 células/mL), contra 10^5 esporos de *B. cinerea*. Todas apresentaram antibiose e/ou competição por nutrientes quando utilizadas na concentração de 10^7 células/mL, entretanto duas leveduras, identificadas como *Candida kefir* Am34 e *Saccharomyces cerevisiae* T19B mostraram resultados satisfatórios contra o fungo filamentoso, com indícios de antibiose. Estas duas leveduras apresentaram pico de atuação da toxina em 96 horas, porém, com baixa porcentagem de inibição da germinação de esporos no antifungigrama em meio líquido. O fungicida utilizado para os testes de sensibilidade e compatibilidade, de fungo e leveduras, respectivamente, foi o Manzate WG, onde apenas a levedura *C. kefir* apresentou compatibilidade com o mesmo, sendo então selecionada para o teste *in vivo*. O teste *in vivo* apresentou resultados promissores quanto a utilização da levedura *C. kefir*, no controle biológico de *B. cinerea* em morangos, com uma porcentagem de eficiência de 37,5%, em 5 dias, sugerindo-se assim, mais estudos com relação a esta levedura, de forma a diminuir a utilização de fungicidas sintéticos.

Palavras-chave: Controle biológico. Pós-colheita. Fator *killer*. *Botrytis cinerea*. Doença.

ABSTRACT

SANTOS, Danielle A. **Biological control in strawberries *in natura***. 2014. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2014.

The culture of the strawberry is quite susceptible to the gray mold disease caused by *Botrytis cinerea*, resulting in large losses in post-harvest. Because of this, it is sought by means of biological control using yeast killer antagonists inhibit the growth of fungus, and consequently the deterioration of fruits, besides contributing to the decrease in the use of synthetic fungicides. In this study 18 was isolated yeast samples of corn and wheat crops and 12 (66.67%) characterized as positive killer against at least one of pattern sensitive strains used. Four of these yeasts showed broad spectrum of killer action, when submitted to antifungal assay on solid medium at three different inoculum concentrations (10^5 , 10^6 and 10^7 cells / mL) against 10^5 spores of *B. cinerea*. All yeasts showed antibiosis and / or nutrient competition when used at a concentration of 10^7 cells / ml, however two yeasts, identified as *Candida kefir* T19B and *Saccharomyces cerevisiae* Am34 showed satisfactory results against the filamentous fungus with evidence of antibiosis. These two yeasts showed maximum killer activity when cultivated for 96 hours, but a small percentage of inhibition of spore germination in antifungal assay on liquid medium. The fungicide used for susceptibility testing and compatibility, fungus and yeast, respectively, was Manzate WG, where only *C. kefir* showed compatibility with it. The *in vivo* test showed promising results regarding the use of the yeast *C. kefir*, the biological control of *B. cinerea* in strawberries, with a percentage of efficiency of 37.5%, in 5 days, suggesting thus, further study on this yeast in order to reduce the use of fungicides.

Keywords: Biological control. Postharvest. Killer Factor. *Botrytis cinerea*. Disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Infecção no morango verde por <i>B. cinerea</i>	17
Figura 2: Expansão do mofo-cinzento em morangos maduros.	17
Figura 3: Ciclo das doenças causadas por <i>B. cinerea</i>	18
Figura 4: Ciclo de vida de <i>B. cinerea</i> durante a infecção de morango.	18
Figura 5: Parede celular da levedura <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 6: Morte de célula mediada pela toxina <i>killer</i> K1 de <i>S. cerevisiae</i>	24
Figura 7: Caracterização de fator <i>killer</i> em leveduras isoladas.	33
Figura 8: Levedura Am34 apresentando antagonismo por antibiose e competição por nutrientes.	34
Figura 9: Porcentagem de inibição de germinação dos esporos de <i>S. cerevisiae</i> (A) e <i>C. kefir</i> (B)	37
Figura 10: Teste de sensibilidade, fungo <i>B. cinerea</i>	38
Figura 11: Teste de compatibilidade, levedura <i>C. kefir</i> na concentração de 0,035% do fungicida Manzate WG.	38
Figura 12: Experimento <i>in vivo</i> para 5 dias.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de morango cru por 100 gramas de parte comestível.	13
Tabela 2: Fungicidas utilizados para o teste de sensibilidade do fungo <i>B. cinerea</i>	29
Tabela 3: Determinação da atividade <i>killer</i> de leveduras isoladas de amostras de milho e trigo, frente às em leveduras sensíveis padrão de referência.	33
Tabela 4: Antifungigrama em meio sólido.	34
Tabela 5: Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante obtido do cultivo de <i>C. kefir</i> e <i>S. cerevisiae</i>	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Cultivares de Morango x Doenças.	15
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 CONTROLE BIOLÓGICO	13
3.1 MORANGO	13
3.2 <i>Botrytis cinerea</i>	16
3.3 CONTROLE BIOLÓGICO EM FRUTOS	19
3.4 LEVEDURAS E FATOR <i>KILLER</i>	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAIS	25
4.2 MÉTODOS	25
4.2.1 Isolamento de leveduras	25
4.2.2 Caracterização de fator <i>killer</i> nas leveduras isoladas	26
4.2.3 Antifungigrama em meio sólido por leveduras antagonistas	26
4.2.4 Identificação das leveduras	27
4.2.5 Antifungigrama em meio líquido por leveduras antagonistas	27
4.2.6 Teste de sensibilidade de <i>B. cinerea</i> frente aos fungicidas sintéticos.....	28
4.2.7 Teste de compatibilidade com as leveduras.....	29
4.2.8 Atividade antifúngica <i>in vivo</i>	30
4.3 TRATAMENTO DOS DADOS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Os frutos, por estarem dispostos no ambiente, ficam expostos a vários micro-organismos causadores de doenças, como fungos e bactérias, que os atingem mesmo após a colheita.

Portanto, reduzir as perdas na pós-colheita tem se tornado um desafio, visto que as frutas contêm elevado conteúdo de água e de nutrientes. O morango, por exemplo, está em constante atividade biológica até atingir a senescência, o que facilita o aparecimento de doenças e lesões mecânicas (KADER, 2002 *apud* SILVEIRA, 2005)¹, gerando muitas perdas e prejuízos aos produtores.

Dentre os frutos, o morango pode ser considerado altamente susceptível ao aparecimento de doenças, principalmente após a colheita, como é o caso da doença do mofo cinzento, causada pelo fungo *B. cinerea*, que deteriora o tecido. Porém alguns micro-organismos e mesmo o *B. cinerea* podem acometer o fruto ainda na planta, o que dificulta sua cultura e o torna de elevada perecibilidade (HENZ et al., 2008; PASINI, 2009).

As abordagens atuais para o controle de doenças pós-colheita, concentram-se em aplicações de fungicidas sintéticos (CALVO-GARRIDO, 2013), porém os consumidores tem se mostrado preocupados com a saúde, o que leva os produtores a uma busca por processos naturais, como alternativa aos produtos químicos.

Para que haja a conservação dos sistemas biológicos, antagonistas realizam o controle de toda população. Na natureza isso ocorre abertamente e é independente da ação do homem (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003). Daí surge o controle biológico, onde há utilização de micro-organismos naturais testados em laboratório, com atividade antagonista comprovada, como uma opção ao controle de doenças. Como é o caso das leveduras, que apresentam o fator *killer*, pois produzem uma toxina capaz de inibir o crescimento de outros micro-organismos como fungos, ou mesmo leveduras de espécies diferentes.

A partir dessa premissa este trabalho objetivou estudar a atividade de leveduras como antagonistas do fungo *B. cinerea*, causador da doença conhecida

¹ KADER, A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. Riverside: UC Regents, 3 ed., 535 p., 2002.

por mofo-cinzento, utilizando morangos *in natura* para o procedimento e, assim, contribuir para seu controle e para o descobrimento de fungicidas naturais.

2 OBJETIVOS

Realizar o controle biológico do fungo *B. cinerea* em morangos *in natura*, com a utilização de leveduras caracterizadas por fator *killer*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras de milho e trigo;
- Caracterizar leveduras isoladas quanto ao fator *killer*;
- Avaliar o potencial antagônico das leveduras *killer*, selecionadas, por meio de antifungograma em meio sólido e em meio líquido;
- Estudar o efeito antagônico *in vivo* de leveduras selecionadas no controle de *B. cinerea* em morangos.

3 CONTROLE BIOLÓGICO

3.1 MORANGO

O morango, de fato, é um pseudofruto, pois o que chamamos de fruta é “o receptáculo floral que engrossa e se torna carnoso e doce, de formato e sabor variável de acordo com a cultivar utilizada”. Os frutos verdadeiros, os aquênios, são aqueles conhecidos popularmente por sementes (SILVA et al., 2007 *apud* MARTINS et al. 2009)². É consumido tanto pelo seu sabor e aroma, quanto pelos seus nutrientes. A Tabela 1 apresenta a composição do morango.

Tabela 1: Composição de morango cru por 100 gramas de parte comestível.

Composição	Quantidade	Composição	Quantidade
Umidade	91,5 %	Manganês	0,33 mg
Proteína	0,9 g	Fósforo	22 mg
Lipídeos	0,3 g	Ferro	0,3 mg
Colesterol	NA	Potássio	186 mg
Carboidrato	6,8 g	Cobre	0,06 mg
Fibra Alimentar	1,7 g	Zinco	0,2 mg
Cinzas	0,5 g	Riboflavina	0,03 mg
Cálcio	11 mg	Piridoxina	0,03 mg
Magnésio	10 mg	Vitamina C	63,6 mg

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2011.

No ano de 2012, a produção mundial de morango alcançou 4.516.810,00 toneladas, em uma área total de 241.109, 00 hectares, tendo Estados Unidos como destaque na produção, com 1.366.850,00 toneladas (FAO, 2012). No mesmo ano o Brasil apresentou uma área plantada de 3.718 hectares e uma produção de 133 mil toneladas (RADIN et al., 2011 *apud* CRIZEL, 2012)³, ficando na 11ª colocação dentre os países do continente americano (FAO, 2012), onde, os maiores produtores do país são Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Paraná e Distrito Federal (IBGE, 2006). Especificamente no Paraná, o morango foi cultivado em 535 hectares, que produziram 14,4 mil toneladas (ANDRADE, 2012).

A taxa respiratória do morango é muito alta, e, em temperatura ambiente,

² SILVA, A.F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. Botânica e Fisiologia do Morangueiro. **Informe Publicitário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 7 – 13, 2007.

³ RADIN, B. et al. Desempenho de quatro cultivares de morangueiro em duas regiões ecoclimáticas do Rio Grande do Sul. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 287 - 291, 2011.

sua deterioração é acelerada na pós-colheita. Essa taxa pode ser alterada de quatro a cinco vezes mais, quando se tem um aumento de 10°C na temperatura, podendo dobrar com uma temperatura de 20°C e chegar a 50% com o amadurecimento (SANTOS et al., 2007 *apud* ALVES, 2009)⁴. Com o armazenamento pode se chegar a um valor de 40% em perdas (CANER; ADAY; DEMIR, 2008 *apud* BRAGA, 2012)⁵.

É considerado um fruto não climatérico com uma pós-colheita estimada em menos de cinco dias, que tende a uma desidratação acelerada, “*desordens fisiológicas, hematomas, lesões mecânicas, e infecções causadas por vários agentes patogênicos*” (SALLATO et al., 2007 *apud* MENEL, 2012)⁶, como fungos, bactérias, nematoides e vírus (HENZ, et al., 2008), as quais podem acometer a cultura durante seu desenvolvimento (BRAGA, 2012). Isso acarreta investimentos e ou medidas de controle de doenças e manejo da cultura, que dificultam sua produção e a tornam mais custosa. Segundo Henz et al., 2008, estão documentadas em torno de dez doenças ligadas a pós-colheita de morango, podendo destacar as duas de maior importância, a do mofo cinzento, causada pelo fungo *B. cinerea* e a podridão-de-Rhizopus (*Rhizopus nigricans*).

Algumas cultivares de morango são mais susceptíveis a doenças causadas por micro-organismos, enquanto que outras apresentam maior tolerância e, dentre as principais cultivares plantadas no Brasil tem-se Santa Clara, Burlkey, Tangi, Campinas, Osogrande, Tudla, Selva, Camarosa, Seascape e Dover (SANTOS, 2005). O Quadro 1 apresenta algumas dessas cultivares e suas doenças relacionadas.

⁴ SANTOS, L. O. et al. Técnicas de Conservação Pós-colheita do Morango. In: Morango: conquistando novas fronteiras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 84-87, 2007.

⁵ CANER, C.; ADAY, M. S.; DEMIR, M. Extending the quality of fresh strawberries by equilibrium modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 1575 – 1583, 2008.

⁶ SALLATO, B.V.; Torres R. ; ZOFFOLI, J. P.; LATORRE, B. A. Effect of boscalid on postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. **Span. J. Agric. Res.**, 5: 67-68, 2007.

CULTIVAR	SUSCEPTIBILIDADE	TOLERÂNCIA	RESISTÊNCIA
Santa Clara	-	antracnose (<i>Colletotrichum fragariae</i>) e mofo cinzento (<i>B. cinerea</i>)	mancha de micosfarela (<i>Mycosphaerella fragariae</i>), mancha de diplocarpon (<i>Diplocarpon earliana</i>) e mancha de dendrofoma (<i>Dendrophoma obscurans</i>)
Burlkey	mofo cinzento (<i>B. cinerea</i>)	mancha de diplocarpon (<i>D. earliana</i>) e antracnose (<i>C. fragariae</i>)	mancha de micosfarela (<i>M. fragariae</i>), murcha de verticillium (<i>Verticillium albo-atrum</i>) e mancha de dendrofoma (<i>D. obscurans</i>)
Tangi	mofo cinzento (<i>B. cinerea</i>)	antracnose (<i>C. fragariae</i>)	mancha de micosfarela (<i>M. fragariae</i>)
Campinas	rizoctoniose (<i>Rhizoctonia</i>), antracnose (<i>Colletotrichum sp</i>) e murcha de verticillium (<i>V. albo-atrum</i>)	mancha angular (<i>Xanthomonas fragariae</i>)	-
Osogrande	mancha de micosfarela (<i>M. fragariae</i>) e antracnose (<i>C. fragariae</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i>)	mofo cinzento (<i>B. cinerea</i>)	-
Tudla	mancha de micosfarela (<i>M. fragariae</i>) e à antracnose (<i>C. fragariae</i> e <i>C. acutatum</i>)	mofo cinzento (<i>B. cinerea</i>)	-
Vila Nova	mofo cinzento (<i>B. cinerea</i>) e podridão do colo e rizoma (<i>Phytophthora cactorum</i>)	antracnose (<i>C. fragariae</i>)	mancha de micosfarela (<i>M. fragariae</i>) e à mancha de dendrofoma (<i>D. obscurans</i>)
Camarosa	mancha de micosfarela (<i>M. fragariae</i>), antracnose (<i>C. fragariae</i> e <i>C. acutatum</i>) e mofo cinzento (<i>B. cinerea</i>).	-	-
Selva	Susceptível as principais doenças	-	-

Quadro 1: Cultivares de Morango x Doenças.

Fonte: adaptado de Santos, 2005.

3.2 *Botrytis cinerea*

A doença do mofo-cinzento é causada pelo patógeno *B. cinerea*, um fungo filamentososo da família *Sclerotiniaceae* capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros (HOLZ et al., 2004 *apud* CALVO-GARRIDO, 2013)⁷, em torno de 230 (ELAD, 1997 *apud* MCFEETERS; MCFEETERS, 2012)⁸. Afeta, sobretudo “flores e frutos, porém também pode causar manchas foliares, apodrecimento de brotos, tombamento em plântulas, cancrios em caules, pecíolos e hastes, bem como, podridões em bulbos, colmos, rizomas, tubérculos e raízes” (TÖFOLI et al., 2011), que podem acontecer por infecção direta ou lesões oriundas de práticas culturais (PASINI, 2009).

Santos et al. (2008), em seu estudo sobre a “Ocorrência do mofo cinzento causado por *B. cinerea* em *grevílea*”, descreveu o fungo a partir de observações microscópicas:

o fungo apresentou micélio com hifas ramificadas, septadas, cor marrom acinzentado ou marrom oliváceo. Conidióforos longos, com 1,33-2,80 mm de comprimento e 10-13 µm de diâmetro, eretos, de cor marrom oliváceo, ramificados no ápice, com células conidiogênicas terminais, dilatadas, formando agregados de conídios em esterigmas curtos. Conídios elipsóides a obovóides, asseptados, com hilo protuberante, ligeiramente acinzentados, medindo 12,45 x 5,55µm.

Os sintomas da doença, nos frutos verdes do morango, são inicialmente, o aparecimento de manchas marrons, como demonstra a Figura 1, que vão se expandindo até tomar todo o fruto, que apresenta uma coloração acinzentada e uma cobertura característica do mofo-cinzento. Sobre os frutos maduros, ocorre primeiramente o surgimento de manchas descoloridas que se expandem por todo o órgão tornando-os impróprios para o consumo, pois altera sabor e odor tornando-os desagradáveis. Como os frutos verdes, os maduros também ficam recobertos pelo mofo cinzento (Figura 2), apodrecendo rapidamente (DIAS et al., 2005).

⁷ HOLZ, G.; COERTZE, S.; WILLIAMSON, B. The Ecology of Botrytison Plant Surfaces. **Springer**, Dordrecht, Netherlands, 2004.

⁸ ELAD, Y. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. **Biological Reviews**, v. 72, p. 381 - 422, 1997.



Figura 1: Infecção no morango verde por *B. cinerea*

Fonte: Disponível em <<http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/english/strawberries/diseases-and-disorders/botrytis.html>>. Acesso em: 08 jul. 2013.



Figura 2: Expansão do mofo cinzento em morangos maduros.

Fonte: Töfoli et al., 2011.

Este fungo é capaz de sobreviver no solo junto à matéria orgânica ou como uma massa compacta de hifas. Após a produção de conidióforos pelas hifas, em plantas doentes, estes produzem os conídios, que viajam pelo ar infectando vários outros hospedeiros. Sua germinação é favorecida por temperaturas que ficam em torno de 22 a 25°C e umidade relativa de 90 a 100 %. A colonização dos tecidos é muito rápida após sua infiltração, apresentando ampla esporulação e originando outros ciclos da doença como na Figura 3 (TÖFOLI et al., 2011). Apresenta inicialmente a coloração cinza, para depois, se tornar cinza-marrom (BRAGA, 2012).

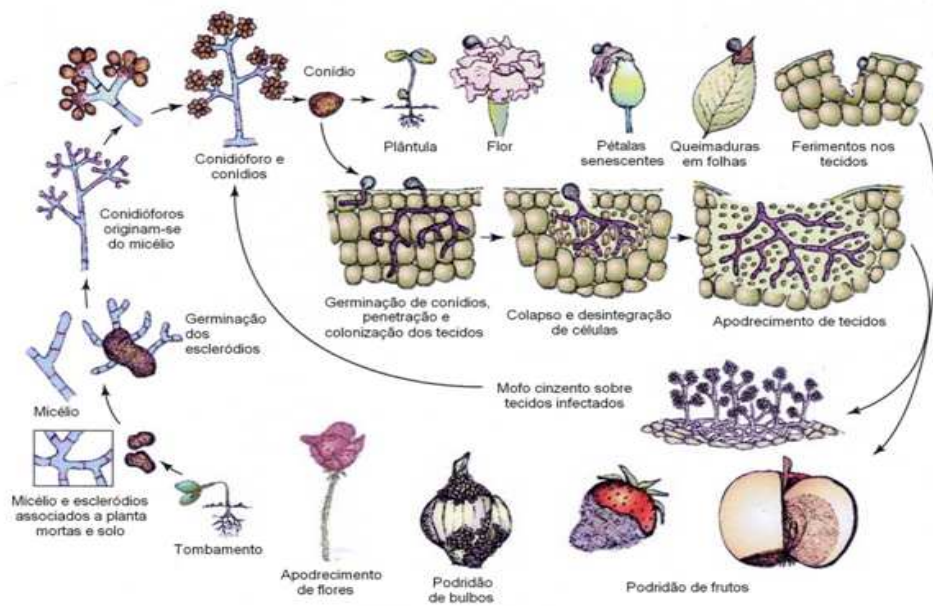


Figura 3: Ciclo das doenças causadas por *B. cinerea*.

Fonte: Tófoli et al., 2011.

A Figura 4 mostra o ciclo de vida do fungo *B. cinerea*, especificamente, durante a infecção do morango. Como já mencionado, os conidióforos (A) são fontes de conídios (B) que viajam através do ar e podem infectar flores e folhas de uma planta jovem de morango (C). A infecção direta pode acontecer durante a maturação ou mesmo com o fruto já maduro (D). Depois de completo todo seu desenvolvimento, *B. cinerea* hiberna em materiais em decomposição (E) para voltar a crescer quando as condições lhe forem favoráveis. São as hifas (F) que dão origem aos conidióforos (MCFEETERS; MCFEETERS, 2012).

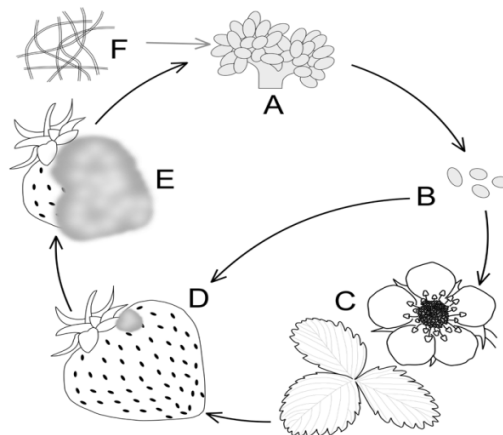


Figura 4: Ciclo de vida de *B. cinerea* durante a infecção de morango.

Fonte: Mcfeeters; Mcfeeters, 2012.

Para evitar a podridão pós-colheita, habitualmente, se pulveriza os fungicidas repetidas vezes sobre as plantas de morango, desde o surgimento das flores até a colheita. Porém, alguns isolados de *B. cinerea* expostos a constantes aplicações de fungicidas no campo tem demonstrado certa resistência (WEBER et al., 2011 *apud* FELIZIANI, 2013)⁹. Com relação a esses fungicidas devem-se limitar suas aplicações, para impedir o surgimento de espécies resistentes e utilizar produtos com diferentes modos de ação (TÖFOLI et al., 2011). Há de se considerar ainda, que o uso intensivo de fungicidas elimina a concorrência desse patógeno, que seriam as leveduras, aumentando assim, a disponibilidade de nutrientes (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000 *apud* MACHADO 2010)¹⁰.

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO EM FRUTOS

Como uma alternativa ao controle de doenças em frutos, o controle biológico pode ser realizado no período de desenvolvimento da cultura ou após a colheita. No campo, este controle, tem o intuito de evitar a infiltração de patógenos nos tecidos, que posteriormente, em condições adequadas, poderão se desenvolver durante o armazenamento (SENHOR, 2009), como no estudo de Gouveia (2007) que reduziu a incidência da doença do mofo cinzento em morangos na pós-colheita, com quatro diferentes tratamentos, realizados em campo, a partir de preparações com *Saccharomyces cerevisiae*, Antonioli et al. (2011), também encontrou resultados positivos para o controle de podridões pós-colheita em framboesas com tratamentos pré-colheita utilizando *Bacillus amyloliquefaciens*, *Curtobacterium pusillum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Já o controle após a colheita objetiva impedir que os patógenos em estado latente prejudiquem a cultura causando podridões e novas infecções (SENHOR, 2009). Platania et al. (2012), reduziu a incidência de *Penicillium digitatum* em laranjas em até 10 dias utilizando *Wickerhamomyces anomalus*, Wang et al (2010), em seu estudo sobre o controle pós-colheita de *B. cinerea* em tomates

⁹ WEBER, R. W. S. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in northern German small-fruit production. **Plant Dis.** 10, 1263-1269, 2011.

¹⁰ VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p.41 - 55, 2000.

cereja mostrou que *Rhodosporidium paludigenum* reduziu a incidência da doença do mofo cinzento significativamente, a medida que as concentrações das suspensões contendo suas células foram aumentando, Oro et al (2014), avaliou *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267, *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 e *S. cerevisiae* Disva 599 quanto à sua atividade de controle biológico em pós-colheita da podridão parda em cerejas, causada principalmente por *Monilinia laxa*, utilizando três concentrações crescentes (10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL), onde *M. pulcherrima* Disva 267 e *W. anomalus* Disva 2 apresentaram resultados promissores no controle da doença.

Algumas características são próprias da pós-colheita, e estas, acabam se tornando favoráveis ao desenvolvimento e aplicação de métodos de controle biológico com a utilização de micro-organismos, já que é possível controlar o ambiente de armazenamento, temperatura e umidade relativa, e assim favorecer o micro-organismo antagonista em detrimento do agente fitopatogênico, mantendo a conservação do fruto (ALVES, 2007).

Pode-se utilizar de um grande número de micro-organismos com características antagônicas, desde bactérias até alguns fungos, porém, devido ao fato das leveduras estarem vinculadas a alimentos e bebidas, seu uso como controlador biológico poderá ser aceito pelos consumidores. O controle a que a levedura esta associada diz respeito à antibiose, mecanismos de competição, que pode ser por espaço ou nutrientes e “a introdução de respostas de resistência no tecido hospedeiro” (PIANO et al., 1997 *apud* RUSSO, 2011)¹¹.

Os fungos têm suas células envolvidas por paredes celulares rígidas que mantem a sua forma, fornecem proteção, estrutura para processos vitais e atuam como filtros e receptores de hormônios e toxinas (FIALHO, 2004). Ela é composta de carboidratos na forma de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, portanto, enzimas capazes de hidrolisar esses componentes e/ou metabólitos tóxicos, podem cumprir um papel de destaque no controle biológico (LIMA; MARCO; FELIX, 2000 *apud* FIALHO, 2004)¹². A antibiose ocorre quando um micro-organismo produz substâncias tóxicas que tem resultado direto sobre outro micro-organismo (PASINI,

¹¹ PIANO, S. et al. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot ao apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 11, n. 3, p. 131 - 140, 1997.

¹² LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L.; FÉLIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S. AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariaúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 2, c. 2, p. 263 - 304, 2000.

2009). Essas substâncias são capazes de inibir o crescimento do micro-organismo patogênico e até mesmo provocar sua morte (ALVES, 2007).

Outro mecanismo de ação do antagonista é a competição, onde dois ou mais micro-organismos disputam um mesmo nutriente necessário a ambos e, um destes, reduz a quantidade disponível deste aos outros micro-organismos presentes no hospedeiro, portanto, é necessário que haja escassez de um nutriente utilizado para que a competição aconteça, já que do contrário, seu excesso acarretaria no desenvolvimento dos micro-organismos em conjunto (ALVES, 2007). Há ainda, a competição por espaço, onde a colonização rápida do fruto pelo antagonista é crucial para o controle da doença (MERCIER; WILSON, 1994 *apud* SHARMA; SINGH; SINGH, 2009)¹³, assim, os antagonistas devem ter a capacidade de crescer mais rapidamente que o agente patogênico (DROBY et al., 1992 *apud* SHARMA; SINGH; SINGH, 2009)¹⁴. A atividade de biocontrole dos antagonistas aumentou de acordo com o aumento de suas concentrações e o decréscimo de concentrações de micro-organismo patogênico nas culturas mais cultivadas (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009).

A resistência é a capacidade de um organismo se sobrepor total ou parcialmente a ação de um determinado patógeno, esta pode ser da própria constituição do organismo e se expressa a todo o momento ou, induzida, que acontece por estímulos determinados. E, é essa resistência induzida que participará no controle biológico de um patógeno, pois será um micro-organismo o responsável pela indução da mesma (RUSSO, 2011). Ela pode ocorrer durante “a colonização do hospedeiro, por moléculas eliciadoras, compostos sinalizadores e, produção de substâncias promotoras de crescimento” (FIALHO, 2004).

Segundo Medeiros et al., 2012 *apud* Spadaro; Gullino (2004)¹⁵, um antagonista para ser considerado ideal deve apresentar as seguintes características:

estabilidade genética, eficácia em baixas concentrações e contra uma ampla gama de patógenos em vários produtos de frutas, exigências

¹³ 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**, 6,p. 9–15, 1995.

¹⁴ DROBY, S. et al. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. **Phytoparasitica**, 20, p. 1495–1503, 1995.

¹⁵ SPADARO, D.; GULLINO, M.L. State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p.185 - 194, mar. 2004.

nutricionais simples, a sobrevivência em condições ambientais adversas, crescimento em substratos baratos, em fermentadores, falta de patogenicidade para o planta hospedeira e nenhuma produção de metabólitos potencialmente tóxicos para os seres humanos e compatibilidade com outros tratamentos químicos e físicos.

3.4 LEVEDURAS E FATOR *KILLER*

Leveduras são fungos unicelulares, que podem ter formas esféricas, cilíndricas, ovoides ou triangulares que necessitam de umidade menor que a maioria das bactérias, porém maior se comparadas aos bolores. Tem uma temperatura ideal de crescimento que varia entre 25 e 30°C e que, é favorecido pelo pH ácido. Sua reprodução ocorre por brotamento ou fissão celular (FRANCO, 2008).

A parede celular da levedura, como demonstra a Figura 5, é organizada em uma camada externa, composta de manoproteínas e, uma camada interna, formada por glucanas e quitina.

A camada externa de manoproteínas suporta as proteínas periplasmáticas e limita a permeabilidade celular a macromoléculas, prevenindo o ataque de proteínas estranhas ou a saída para o meio extracelular de compostos intracelulares. A elevada glicosilação das proteínas e a presença de grupos fosfato com cargas negativas na camada externa pode ainda contribuir para a retenção de água. Em contrapartida, na camada interna, as glucanas entrelaçadas por fibrilhas de quitina adjacente à membrana plasmática mantêm a rigidez e a forma celular. São as ligações covalentes e os complexos macromoleculares formados pelas glucanas e quitina que oferecem força e resistência à levedura. Em particular, as glucanas β -(1→3) organizadas numa rede flexível de extensão variada, fortalecida por múltiplas ligações de hidrogênio, permitem elasticidade, podendo a célula adaptar o seu volume em resposta a condições externas. Já as glucanas β -(1→6) servem de âncora para a estrutura e integridade da camada externa de manoproteínas (KLIS et al., 2002 *apud* BASTOS, 2013)¹⁶.

¹⁶ Klis F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-56, 2002.

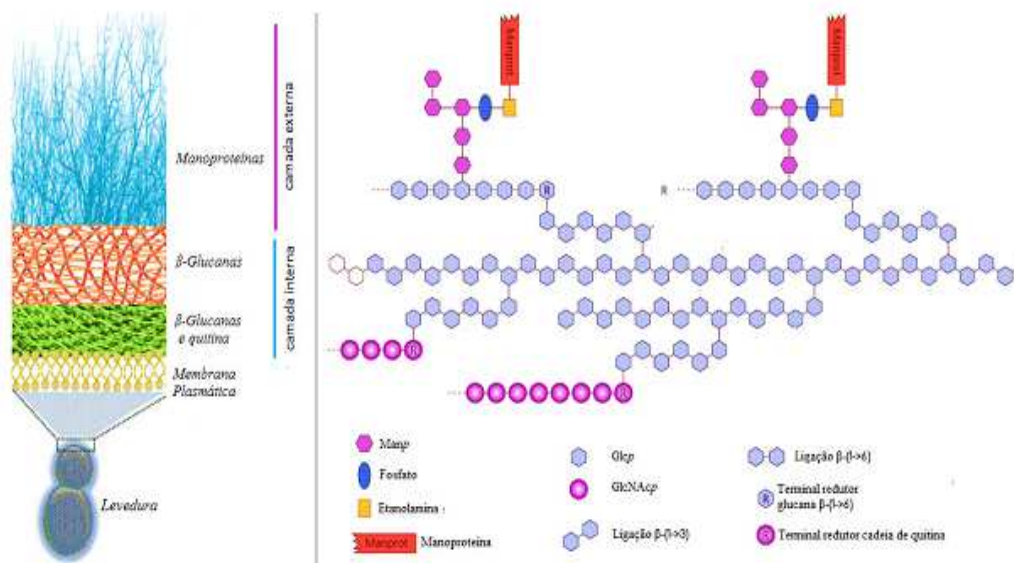


Figura 5: Parede celular da levedura *S. cerevisiae*.

Fonte: BASTOS, 2013 (verificar).

As leveduras são ainda, capazes de secretar uma substância conhecida por toxina *killer*, que é de natureza proteica ou glicoproteica, de baixo peso molecular que têm o potencial de afetar outras leveduras ou micro-organismos que são sensíveis (GOLUBEV, 2006, *apud* FUENTEFRÍA, 2007)¹⁷. Estas podem ou não pertencer à mesma espécie, porém, a levedura é imune à própria toxina. Existem ainda, leveduras que apresentam fator *killer* e são letais a fungos e agentes patogênicos, tais como *B. cinerea*, *Rhizoctonia solanii*, *Fusarium equiseti* e *Phytophthora infestans* (VERO; MONDINO, 2006 *apud* RUSSO, 2011)¹⁸.

Segundo Brites (2003), Bevan e Makower, 1963, descreveram pela primeira vez o fenótipo *killer* e sugeriram que determinadas cepas de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em *killer*, sensível e neutra. Células sensíveis quando dispostas em um meio de cultura juntamente com células *killer*, morriam, em sua grande parte. Já as células neutras, não tinham nenhuma ação.

Em geral, o mecanismo de atuação das leveduras *killer* sobre outros organismos, acontece da mesma forma que a toxina K1 produzida pela *S. cerevisiae*. Ele se dá em duas etapas: o primeiro passo, é a adsorção da toxina *killer* ao receptor da parede celular (1-6)- β -D-glucano, que é fortemente dependente do pH. Embora o receptor de parede de célula seja necessário para a ação da toxina,

¹⁷ GOLUBEV, W.I. Antagonistic interactions among yeasts. The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer, Berlin, Germany, p. 197 – 219, 2006.

¹⁸ VERO, S.; MONDINO, P. **Control biológico de patógenos de plantas**. Ed. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay, 2006.

ele não parece ser o único componente implicado no processo. No passo seguinte, que é dependente de energia, a toxina *killer* interage com um receptor na membrana plasmática, inibindo a síntese de manoproteínas e quitina, o que resulta na permeabilidade da membrana a prótons e íons de potássio, onde a toxina age como ionóforo ou um protonóforo. Posteriormente, a membrana torna-se permeável a moléculas de massa molecular superior, tais como o ATP (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002) como demonstra a Figura 6.

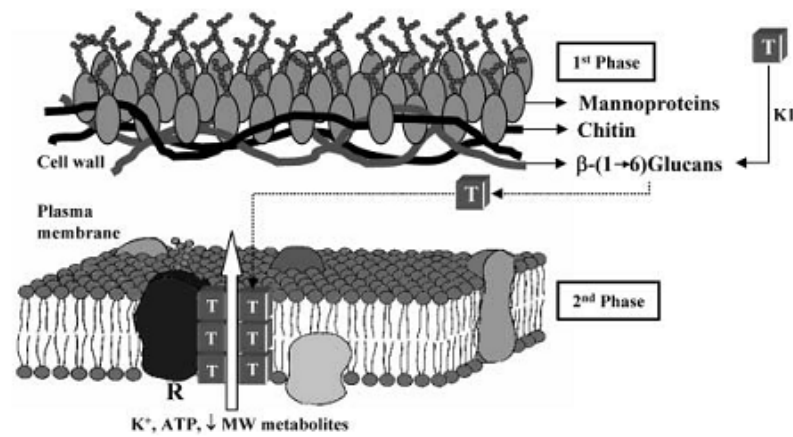


Figura 6: Morte de célula mediada pela toxina *killer* K1 de *S. cerevisiae*.

Fonte: Marquina; Santos; Peinado, 2002.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

As amostras de milho e trigo foram adquiridas em forma de doação por parte de agropecuárias e cooperativas da região de Londrina - PR. Os morangos foram comprados em mercados da mesma cidade.

B. cinerea, foi isolado a partir de morangos que apresentaram desenvolvimento da doença do mofo cinzento. Para tanto, foram retiradas alçadas do fungo, com alça de platina, de forma estéril e, inoculadas em meio ágar batata dextrose (BDA) para seu crescimento, conservação e posterior utilização.

As leveduras sensíveis foram fornecidas pelo Orientador Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho.

As análises foram realizadas no laboratório de microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – câmpus Londrina.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Isolamento de leveduras

Para o isolamento das leveduras, foram utilizadas amostras de trigo e milho, previamente trituradas, onde 10 g foram diluídos em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1%, seguido de diluições decimais seriadas, em tubos, até 10^{-5} . Um volume de 0,1 mL das diluições foi assepticamente pipetado e distribuído, com o auxílio de alça de Drigalsky, em placas de Petri estéreis, que continham de 20 a 25 mL de BDA acidificado com ácido tartárico 10%. Após o plaqueamento incubou-se a 25°C por 120 horas para crescimento das mesmas (SILVA et al., 2007). As

leveduras foram isoladas inicialmente em BDA e depois transferidas para Meio para Leveduras – MPL (glucose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1,0%, NaHPO₄ 0,3% e ágar 1,8%) (COELHO, 2005).

4.2.2 Caracterização de fator *killer* nas leveduras isoladas

Para a caracterização do fator *killer* nas leveduras isoladas, uma alçada da cepa sensível cultivada em MPL foi suspensa em 3 mL de solução peptonada a 0,1 % e padronizada na Escala nº 1 de McFarland (3×10^7 células/mL). As culturas sensíveis ($3,0 \times 10^6$ células) foram plaqueadas por profundidade em placas de Petri contendo de 20 a 25 mL de ágar *Sabouraud* adicionado de 0,03% de azul de metileno. Após solidificação do ágar, foi inoculado uma alçada de 3 diferentes leveduras testes previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo MPL sob forma de pequenos pontos (aproximadamente 2,0 mm de diâmetro) na superfície do meio. Após incubação a 25°C foram feitas leituras em 72 e 120 horas, para determinação da presença de fator *killer* comprovada pela formação de zona de inibição ao redor das leveduras testes (POLONELLI et al, 1983). A levedura utilizada como controle positivo para a produção da toxina *killer* foi a *S. cerevisiae* NCYC-738 (K+) e como linhagens padrão sensíveis foram empregadas *Candida glabrata* NCYC 366 (K1), *C. glabrata* NCYC 388 (K8), *Candida albicans* IZA, (K3), *Pichia kluyveri* CAY15 e *S. cerevisiae* NCYC 1006.

4.2.3 Antifungigrama em meio sólido por leveduras antagonistas

Para esse procedimento foi utilizado o método por *pour plate* onde placas de Petri contendo aproximadamente de 20 a 25 mL de ágar MPL foram inoculadas com *B. cinerea* a um volume correspondente ao inóculo de 10^5 esporos. Após a solidificação do ágar, procedeu-se a uma perfuração no centro da placa (diâmetro de

8 mm), com um furador de rolha de cobre, para depositar 100µL do cultivo de levedura teste (caldo MPL a 25°C/24 horas). Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas a 25°C e as zonas de inibição medidas nos intervalos de 48 horas (COELHO, 2005; WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995). As leveduras testes foram padronizadas em escala de McFarland n°5 ($1,5 \times 10^7$ células/mL), seguida de duas diluições seriadas ($1,5 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^5$ células/mL). Os inóculos de cada diluição foram feitos em triplicata.

4.2.4 Identificação das leveduras

As leveduras que apresentaram melhores indícios de antibiose foram identificadas por meio do Kit comercial Rapid™ Yeast Plus System (Remel, Lenexa, EUA), onde as leveduras foram suspensas em meio líquido basal (KCl 0,6%, CaCl₂ 0,05%), seguido de preenchimento das cúpulas e incubação a 25°C/4 horas. Foi analisada a alteração de cor de acordo com substrato correspondente, sendo então codificadas e submetidas ao sistema de identificação computadorizado (Eletronic Rapid Compendium – ERIC, Remel).

4.2.5 Antifungigrama em meio líquido por leveduras antagonistas

Primeiramente, o extrato bruto foi preparado através de um pré-cultivo, onde uma alçada da levedura foi transferida para um erlenmeyer contendo 25 mL de caldo MPL e incubado a 25°C por 24 horas. Após esse período, a levedura foi padronizada em escala n°1 de McFarland, para então inocular-se um volume de 100 µL (aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células) em 3 erlenmeyers contendo 50 mL de caldo MPL. Após 72, 96 e 120 horas a 25°C, os cultivos foram filtrados (membrana Millipore 0,20 µm), onde 1,0 mL deste filtrado foi transferido para um tubo de ensaio onde também se adicionou um volume igual (1,0 mL) de caldo MPL. Em seguida foi

inoculado 10^5 esporos do fungo teste e, para cada erlenmeyer foram feitos tubos em triplicata. Os tubos de ensaio foram então incubados a 25°C por 12 horas, posteriormente centrifugados (150 rpm/10 min) e analisados em microscópio, determinando-se a porcentagem de esporos germinados. Paralelamente preparou-se o controle, onde inoculou-se 10^5 esporos de fungo teste em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de caldo MPL e 1,0 mL de água destilada estéril (JANISIEWICZ; TWORKOSKI; SHARER, 2000; CHEN et al., 2000).

4.2.6 Teste de sensibilidade de *B. cinerea* frente aos fungicidas sintéticos

Este experimento foi realizado utilizando-se 4 fungicidas sintéticos comerciais (Tabela 2) empregados no controle de fungos em frutos e legumes, formulados de acordo com as recomendações do fabricante, ou seja, em sua concentração máxima sugerida. Cada fungicida foi misturado isoladamente ao meio BDA acidificado, antes de dispensar o mesmo em placas de Petri. Após a solidificação, foi feito o inóculo, por superfície, da suspensão de esporos de *B. cinerea* (10^5 esporos) e incubação em B.O.D. a 25°C por 5 dias. O fungicida que apresentou melhor eficiência no controle do fungo teste foi submetido ao teste de mínima concentração inibitória (C.I.M.), onde foi verificada a menor concentração de fungicida capaz de inibir o desenvolvimento do fungo *B. cinerea* (LIMA et al., 2003; LIMA et al., 2006). Formularam-se 4 concentrações diferentes do fungicida selecionado (Manzate[®] WG, Barranquilla, Colômbia, importado por UNITED PHOSPHORUS DO BRASIL LTDA, Indianópolis-SP) 0,35% (concentração recomendada pelo fabricante), 0,175%, 0,0875% e 0,035%, correspondentes respectivamente a 50, 25 e 10% da concentração inicial máxima. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 2: Fungicidas utilizados para o teste de sensibilidade do fungo *B. cinerea*.

Fungicida	Composição	Recomendação de uso	Concentração utilizada
Cerconil® WP	Dimethyl 4-4'-(o-phenylene) bis (3-thioallophanate) - 200 g/kg (20% m/m); Tetrachloroisophthalonitrile - 500 g/Kg (50% m/m); Ingredientes Inertes - 300 g/Kg (30% m/m)	200 g/100 litros de água	0,20 g/100 mL de água
Dithane® NT	Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt - 800 g/kg (80 % m/m); Ingredientes Inertes - 200 g/kg (20 % m/m)	250 a 350 g/100 litros de água	0,35 g/100 mL de água
Manzate® WG	Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt - 750g/kg (75% m/m); Ingredientes inertes - 250g/kg (25% m/m)	250 a 350 g/100 litros de água	0,35 g/100 mL de água
Metiltiofan®	Dimethyl 4,4'-(o-phenylene) bis (3-thioallophanate) - 700 g/L (70% m/v); Ingredientes Inertes - 300 g/kg (30% m/v)	70 g/100 litros de água	0,7 g/100 mL de água

Fonte: Adaptado das bulas dos respectivos fungicidas.

4.2.7 Teste de compatibilidade com as leveduras

O fungicida selecionado no teste de sensibilidade de *B. cinerea* foi, então, analisado com relação a compatibilidade com as leveduras. O teste verificou a mínima concentração inibitória (C.I.M.), onde foi verificada a menor concentração de fungicida capaz de inibir o desenvolvimento das leveduras testadas (LIMA et al., 2003; LIMA et al., 2006). Para este teste, utilizou-se 4 concentrações diferentes do fungicida selecionado, a partir da recomendação do fabricante: 0,35% (máxima concentração), 0,175%, 0,0875% e 0,035% (mínima concentração), na presença de 10^2 células de levedura teste. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.8 Atividade antifúngica *in vivo*

Os morangos foram desinfetados por imersão com álcool etílico a 70% durante 30 segundos, lavados em água destilada estéril e transferidos para toalhas de papel para remover o excesso de água na superfície do fruto. Os morangos selecionados tinham, aproximadamente, 2,5 cm de largura e 4 cm de comprimento. Foram realizados cinco tratamentos que consistiram de: I - água destilada + *B. cinerea* (controle); II - levedura + *B. cinerea*; III - fungicida (0,035%) + levedura + *B. cinerea*; IV - fungicida a 0,035% + *B. cinerea*; e, V- fungicida na concentração recomendada (0,35%) + *B. cinerea*, onde, para cada tratamento, foram utilizados quatro frutos.

No tratamento I o fruto foi imerso em água destilada estéril, seco e colocado sobre um papel toalha úmido em um recipiente de plástico e então, inoculada sobre o fruto, a suspensão de esporos de *B. cinerea* (10^5 esporos), com volume variando de 50 a 90 μ . O tratamento II consistiu da imersão do fruto, por 5 segundos, em uma suspensão de células da levedura selecionada, previamente padronizada na escala de McFarland nº 0,5 (10^6 células/mL), em seguida, colocou-se o mesmo sobre um papel toalha úmido em um recipiente de plástico, para, então, receber o inóculo da suspensão de esporos de *B. cinerea* (10^5 esporos). Para o tratamento III, mergulhou-se o fruto em uma solução previamente preparada do fungicida Manzate WG a 0,035% e esperou-se 60 minutos para sua secagem, posteriormente, fez-se a imersão do fruto na suspensão de células da levedura selecionada e, os procedimentos seguintes realizados da mesma forma que os tratamentos I e II. Os tratamentos IV e V consistiram na imersão do fruto nas concentrações definidas de 0,035% e 0,35%, respectivamente, do fungicida Manzate WG com posterior tempo de secagem de 60 minutos e inóculo da suspensão de esporos de *B. cinerea* (10^5 esporos). Para cada tratamento foram utilizados 4 frutos, cada fruto foi armazenado individualmente em recipientes plásticos, com tampa, previamente desinfetados com álcool etílico a 70% e incubados a 25°C em B.O.D. Após 2, 5 e 7 dias, foram analisados os frutos com incidência da doença. O experimento foi realizado em duplicata (HUANG et al., 2011; HUANG et al., 2012).

Segundo Lima et al., 2011, para haver um controle dos frutos deteriorados,

os mesmos foram transformados em porcentagem de eficácia (PE), como se segue: $PE = [(C-T) / C] \times 100$, em que C é o número de frutos deteriorados no controle (água + *B. cinerea*) e T é o número de frutos deteriorados em cada um dos tratamentos (II, III, IV e V). Foi desconsiderado crescimento fúngico nas folhas do fruto.

4.3 TRATAMENTO DOS DADOS

As médias dos resultados encontrados nos procedimentos foram analisadas estatisticamente por meio de análise de variância utilizando o Teste de Tukey, pelo programa Statistic 10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudo realizado por Nicolau (2014), observou-se uma variação na contagem total de bolores e leveduras para milho e trigo de, respectivamente, $4,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^6$ UFC/g e $2,0 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^5$ UFC/g. A partir desta contagem, foram isolados um total de 18 leveduras, sendo 8 culturas de amostras de milho e 10 de amostras de trigo. Neste estudo, todas as leveduras foram submetidas à caracterização de atividade *killer* frente às culturas sensíveis de referência.

A maior incidência de bolores e leveduras observada nas amostras de milho pode estar relacionada com condições inadequadas de armazenamento, tendo em vista que as amostras foram obtidas de agropecuárias e cooperativas da região de Londrina. Tal fato é explicado por Dias (2012), onde relata que fungos de armazenamento podem surgir nos grãos de milho mesmo antes do armazenamento, tendo seu desenvolvimento acelerado em condições ideais de umidade e temperatura. Segundo Botelho et al. (2008), o milho é um cereal que apresenta maior umidade quando comparado ao trigo, sendo de 12,28 g/100g e 11,34 g/100g respectivamente. E, ainda, de acordo com Gasperini (2011), o milho tem grande susceptibilidade a contaminação por fungos devido a sua composição rica em nutrientes.

A Tabela 3 apresenta as leveduras caracterizadas quanto à atividade *killer*. Neste teste, as leveduras isoladas são classificadas como *killer*, quando o inóculo é cercado por uma área onde não se nota nenhum crescimento das culturas sensíveis e que pode ser percebido na presença de azul de metileno (GASPERINI, 2011). Em estudo realizado por Coelho et al. (2011), 44 leveduras foram isoladas de diferentes fontes e, deste total, 13 apresentaram resultado positivo para fator *killer*.

Do total de 18 leveduras isoladas, 12 (66,67%) se mostraram positivas contra pelo menos uma das cepas sensíveis padrão utilizadas. A zona de inibição apresentada pelo fator *killer* variou de 6,0 a 28 mm (Tabela 3). As leveduras Am34, T17, T19B e T24 destacaram-se das demais por terem apresentado maior espectro de ação *killer*, sendo selecionadas para o teste anti-*B. cinerea* em meio sólido.

Tabela 3: Determinação da atividade *killer* de leveduras isoladas de amostras de milho e trigo, frente às em leveduras sensíveis padrão de referência.

Levedura Sensível / Levedura Teste	<i>C. glabrata</i> NCYC 366	<i>C. albicans</i> 12A	<i>C. glabrata</i> NCYC 388	<i>S.cerevisiae</i> NCYC 1006	<i>P. kluyveri</i> CAY 15
Am17	-	-	-	-	7,5
Am21	-	-	-	-	9,0
Am29B	14,0*	-	-	11,0	-
Am31	16,0	-	-	-	9,0
Am34	15,0	7,0	-	-	10,0
T14	-	-	-	-	7,5
T17	-	20,0	14,0	28,0	-
T18	6,0	-	9,0	-	7,0
T19A	-	-	-	8,0	11,0
T19B	-	7,0	-	11,0	10,0
T19C	-	-	-	26,0	-
T24	-	20,0	6,0	24,3	-
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738**	12,5	11,0	-	17,0	-

* Diâmetro de inibição medido em milímetros.

** Linhagem padrão como controle positivo contra *S. cerevisiae* NCYC 1006.

Como demonstra a Figura 7, houve inibição de crescimento por antibiose (produção de toxina *killer*) e/ou competição por espaço e nutrientes, que pode ser explicado pelo crescimento da massa inoculada e por descoloração do ágar azul de metileno. A levedura T19B além da zona de inibição contra *S.cerevisiae* NCYC-1006 apresentou descoloração contra *C. albicans* 12A, já as leveduras T17 e T24 mostraram zona de inibição e crescimento da massa inoculada contra *S.cerevisiae* NCYC-1006 e a levedura Am34, apresentou descoloração contra *C. albicans* 12A.

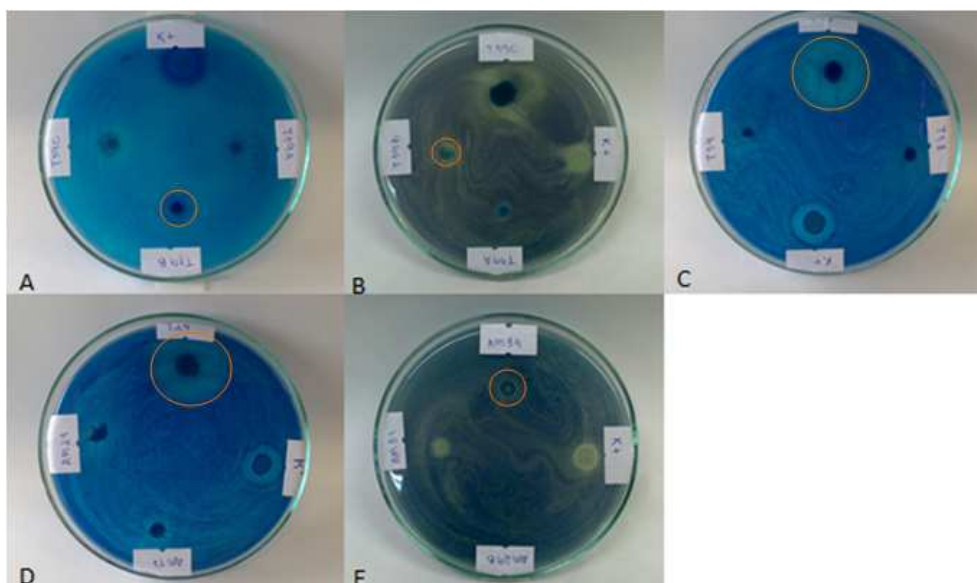


Figura 7: Caracterização de fator *killer* em leveduras isoladas. A - T19B em *S.cerevisiae* NCYC-1006; B - T19B *C. albicans* 12A; C - T17 em *S.cerevisiae* NCYC-1006; D - T24 em *S.cerevisiae* NCYC-1006; E - Am34 em *C. albicans* 12A.

As quatro leveduras que apresentaram melhores resultados com relação a produção de toxina *killer*, foram testadas contra *B. cinerea*. Conforme mostrado na Tabela 4, constatou-se que todas as leveduras apresentaram antagonismo por antibiose e/ou competição por nutrientes na concentração de 10^7 células/mL, sugerindo a utilização de um maior número de células para um melhor controle fúngico.

As leveduras que mostraram melhor efeito por antibiose foram a Am34 (com inibição em todas as diluições testadas), que também apresentou competição por nutrientes devido ao crescimento de massa inoculada, como demonstra a Figura 8, e T19B. É possível observar ainda, na Figura 8, que a levedura Am34 reduziu notadamente o crescimento micelial e desenvolvimento do fungo no entorno de seu inóculo em comparação com a margem da placa, onde já havia produção de escleródios escuros. Oliveira et al. (2011) realizaram o teste *in vitro* com 24 leveduras isoladas de morango e identificadas com fator *killer* contra *B. cinerea*, dessas, 22 atuaram positivamente, das quais, 15 apresentaram competição por nutrientes e 2 competição de nutrientes e antibiose.

Tabela 4: Antifungigrama em meio sólido.

Diluição / Levedura Teste	10^5	10^6	10^7	Controle
T17	9*	-	8,5	-
T19B	-	-	9,5	-
T24	-	-	11	-
AM34	9	14	12,5	-

* Diâmetro de inibição medido em milímetros, após incubação a 25°C por 48 horas.



Figura 8: Levedura Am34 apresentando antagonismo por antibiose e competição por nutrientes.

Os isolados Am34, T19B, T17 e T24 foram identificados como *Candida kefir*, *S. cerevisiae*, *Candida rugosa* e *C. rugosa*, respectivamente. Esses gêneros de leveduras têm sido amplamente utilizados no controle biológico de doenças em frutos. Tristão et al. (2012) em seu estudo para controle biológico pós colheita em abacaxis, reduziu o aparecimento de doenças empregando *S. cerevisiae* e *Pseudozyma flocculosa*; Gholamnejad et al. (2008), reduziram a incidência de *Penicillium expansum* em maçãs com *S. cerevisiae*; Antonioli et al. (2011) verificou o potencial de *S. cerevisiae* para o controle de podridões pós-colheita em framboesas; Kupper et al. (2013), comprovaram a viabilidade do uso de *S. cerevisiae* para o controle de *Penicillium digitatum*, onde a eficiência do antagonismo dependia da variedade cítrica tratada; Usall et al. (2000), controlaram significativamente a incidência de *P. expansum* em maçãs, utilizando a levedura *Candida sake* (CPA-1) em conjunto com atmosfera controlada; Zhang et al. (2014), identificaram uma nova espécie de levedura, *Candida pruni*, que apresentou potencial de controle biológico contra *Monilinia fructicola*, causadora da podridão parda em pêssegos; Gholamnejad; Etebarian; Sahebani (2010), determinaram, em seu estudo, que *Candida membranifaciens* foi eficaz contra *P. expansum* em maçãs nas temperaturas de 20°C e 5°C.

Para o antifungigrama em meio líquido foram selecionadas as leveduras *C. kefir* e *S. cerevisiae* devido a melhor atuação contra *B. cinerea* no teste anterior e, pelo fato das cepas identificadas como *C. rugosa* terem apresentado menor inibição do fungo e dificuldade de adaptação ao caldo MPL. Conforme a Tabela 5, foram realizadas 3 repetições com o sobrenadante obtido do cultivo de *C. kefir* e *S. cerevisiae*. Cada ensaio foi realizado inoculando-se o fungo no sobrenadante da levedura e tomando como controle apenas o inóculo do fungo em água destilada estéril. O controle apresentou um grande desenvolvimento fúngico, que dificultou a contagem para determinação da germinação de esporos.

Pode-se observar no ensaio com a levedura *C. kefir*, que os tratamentos realizados em 72 e 96 horas, não diferiram significativamente entre si, porém, apresentaram diferença quando comparados ao ensaio de 120 horas, o que indica que a levedura *C. kefir* não produziu a toxina *killer* nesse período, de forma a inibir a germinação de esporos do fungo *B. cinerea*. Este resultado é confirmado pelo fato de que o tratamento de 120 horas não diferiu significativamente de seu controle.

Para o ensaio com o sobrenadante da levedura *S. cerevisiae*, foram encontrados os mesmos resultados com relação aos tratamentos, onde, 72 e 96 horas não diferiram significativamente entre si, mas diferiram do tratamento de 120 horas. Este último tratamento apresentou ainda, diferença significativamente quando comparado com seu controle, então, para a levedura *S. cerevisiae*, é presumível que a mesma produziu uma quantidade de toxina *killer*, mesmo que pequena, em todos os tratamentos realizados.

Neste ensaio, as duas leveduras se mostraram atuantes nos tratamentos de 72 e 96 horas, onde se pode perceber que o menor valor encontrado para as mesmas foi a 96 horas, indicando que o menor valor corresponde a maior atuação. A Figura 9 exibe a % de inibição da germinação de esporos do fungo *B. cinerea* apresentando uma relação inversa entre inibição e germinação de esporos, pois, a maior inibição indica menor germinação, onde *S. cerevisiae* apresentou inibição correspondente a 12,23% (72 horas), 11,85% (96 horas) e 4,92% (120 horas) e *C. kefir* 11,48% (72 horas), 11,67% (96 horas) e 2,97% (120 horas), respectivamente. Sugere-se aqui, devido à diferença entre os tratamentos não ter sido significativa, a utilização dos sobrenadantes do tratamento de 72 horas para o controle do fungo *B. cinerea* por motivos de ordem econômica.

Portes (2011) em seu estudo, realizou o controle da germinação de esporos e o desenvolvimento de hifas de *P. expansum* e *Aspergillus ochraceus* utilizando a levedura *killer* positiva *Kluyveromyces* sp. (cepa PF413), isolada a partir de polpas de frutas congeladas. Para cada fungo foi sugerido a utilização dos sobrenadantes da levedura, de acordo com sua atuação, para *P. expansum* sobrenadante de 96 horas e para *A. ochraceus* 72 horas, ambos a 25° e com inibição da germinação de esporos acima de 80% para ambos. Este estudo se assemelha aos resultados encontrados aqui, pelo fato do pico de atuação da toxina *killer*, das duas leveduras, ter se encontrado no sobrenadante de 96 horas, porém com relação a inibição da germinação dos esporos de *B. cinerea*, os valores obtidos foram muito inferiores.

Tabela 5: Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante obtido do cultivo de *C. kefyri* e *S. cerevisiae*.

Incubação (horas)	Germinação de esporos (%)			
	Controle	Sobrenadante <i>C. kefyri</i>	Controle	Sobrenadante <i>S. cerevisiae</i>
72	90,00 ± 2,16 ^{ab}	79,67 ± 7,42 ^{aA}	83,67 ± 4,52 ^{ab}	73,44 ± 4,69 ^{aA}
96	89,44 ± 3,56 ^{ab}	79,00 ± 2,98 ^{aA}	82,56 ± 5,16 ^{ab}	72,78 ± 4,15 ^{aA}
120	90,00 ± 3,65 ^{aA}	87,33 ± 3,26 ^{bA}	90,22 ± 2,09 ^{bb}	85,78 ± 2,48 ^{bA}

*Ensaio realizado em caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média ± desvio padrão dos valores de 9 dados para porcentagem de germinação de esporos (triplicata). Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

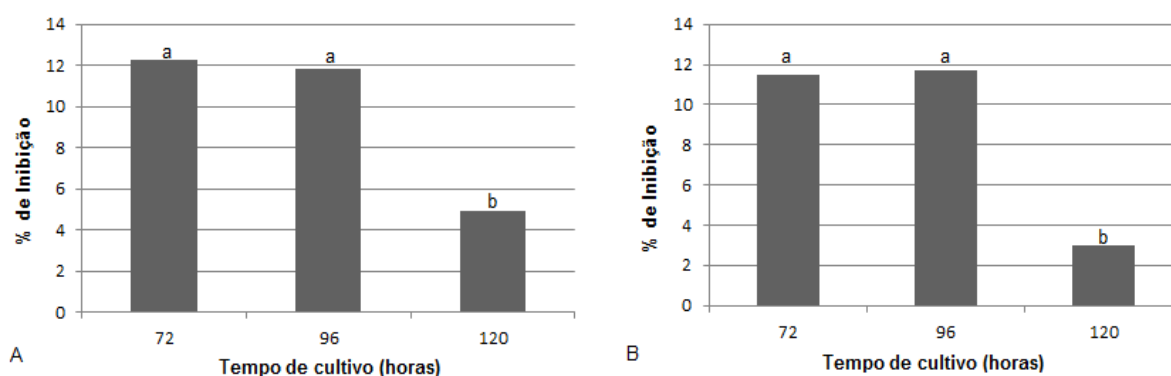


Figura 9: Porcentagem de inibição de germinação dos esporos de *S. cerevisiae* (A) e *C. kefyri* (B). Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para determinar a sensibilidade e/ou resistência do fungo *B. cinerea* frente a fungicidas aplicados durante o desenvolvimento de frutos para o controle de doenças, foram testados 4 diferentes fungicidas, preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Dentre estes, o que apresentou melhor resultado foi o fungicida Manzate WG, pois, as placas analisadas em 48 horas, não apresentaram desenvolvimento algum do fungo, diferentemente do que aconteceu com os outros fungicidas. Em estudo de Angelini et al. (2013), com uvas de mesa e morangos, foi identificado que o fungo *B. cinerea* é capaz de resistir a diferentes níveis de fungicidas individuais e/ou ainda, apresenta resistência múltipla a diferentes combinações de fungicidas (até seis), apresentando fácil adaptação a condições adversas, mostrando que é um dos fungos de maior risco de resistência a fungicidas.

Realizado este teste preliminar de sensibilidade do fungo, o fungicida selecionado foi então, avaliado com relação a 4 diferentes concentrações contra *B.*

cinerea (0,35%, 0,175%, 0,0875% e 0,035%). O fungo apresentou sensibilidade apenas na concentração de 0,35%, porém, na concentração de 0,175% houve pouca esporulação, como apresenta a Figura 10. Pode-se notar ainda, nesta mesma Figura, que à medida que as concentrações do fungicida foram diminuindo, o inverso com relação ao desenvolvimento fúngico foi ocorrendo.

Em relação ao teste de compatibilidade do fungicida com as leveduras, observou-se que somente *C. kefyi* apresentou crescimento de colônias, na menor concentração (0,035%) do fungicida, como mostrado na Figura 11. Neste teste, esperava-se o crescimento da levedura, para que, no teste *in vivo*, não ocorresse interferência do fungicida.



Figura 10: Teste de sensibilidade, fungo *B. cinerea*. Da esquerda para a direita, concentrações de 0,35%, 0,175%, 0,0875% e 0,035% do fungicida Manzate WG.

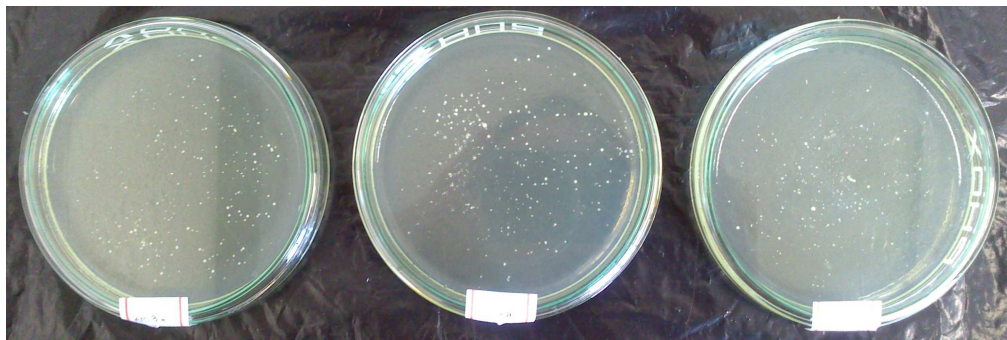


Figura 11: Teste de compatibilidade, levedura *C. kefyi* na concentração de 0,035% do fungicida Manzate WG.

Para o experimento *in vivo*, foi selecionada a levedura *C. kefyi*, que apresentou compatibilidade com o fungicida testado. As leituras foram realizadas nos tempos 2, 5 e 7 dias, onde, foram considerados frutos deteriorados aqueles que apresentaram crescimento fúngico na superfície total do fruto. Como se deve tomar

como base o controle para o cálculo da Porcentagem de Eficácia (P.E.) e não houve crescimento fúngico em nenhum fruto no tempo "2 dias" (inclusive no controle), não houve resultado para as repetições nesse período.

A leitura de 5 dias mostrou uma P.E. de 0% para o controle, como mostra a Figura 12, o que já era esperado, pois o mesmo foi constituído apenas de água e fungo. O tratamento II, que foi composto da levedura + *B. cinerea*, apresentou P.E. de 37,5%, uma atuação que pode ser considerada interessante (Figura 12), quando se leva em consideração que não houve qualquer associação com outro mecanismo de inibição do fungo. Já o tratamento III, acredita-se que não houve sinergismo entre levedura e fungicida na concentração de 0,035%, pois a P.E. encontrada foi de 0%, com isso, pode ter havido uma interferência do fungicida na produção da toxina ou mesmo em sua atuação, favorecendo assim, o crescimento fúngico. O tratamento IV apresentou uma P.E. de 25%, que possivelmente é explicada pela perda de eficiência do fungicida, o qual foi aplicado na menor concentração testada inicialmente, porém, se comparado ao teste de sensibilidade e na mesma concentração, o fungicida teve uma pequena atuação quando aplicado diretamente sobre o fruto. E, finalmente, o tratamento V, onde o fungicida foi utilizado na concentração recomendada, a P.E. obtida foi de 50% (Figura 12), este valor comparado a P.E. do tratamento II, sugere que a levedura, aplicada sozinha no fruto, tem uma atuação relativamente parecida com o fungicida em sua concentração máxima, indicando que existe a possibilidade de sua utilização como controlador biológico do fungo *B. cinerea*. Com relação à leitura de 7 dias, os morangos já haviam atingido um grau muito grande de deterioração, sendo portanto, a P.E. dos tratamentos II, III, IV e V, de 0%.



Figura 12: Experimento *in vivo* para 5 dias. Da esquerda para direita: A – Controle (Água + *B. cinerea*); B – Tratamento II (Levedura + *B. cinerea*) e C – Tratamento V (Fungicida na concentração recomendada + *B. cinerea*).

Os resultados encontrados neste trabalho com a levedura *C. kefyri*, aplicada em morangos incubados a 25°C por 5 dias e que apresentou uma atuação de 37,5%, se mostraram superiores ao trabalho de Zhang et al. (2007) que avaliaram a eficácia da levedura antagonista *Rhodotorula glutinis* na redução do desenvolvimento de podridões em morangos com armazenamento a 20°C durante 3 dias ou 4°C durante 5 dias seguido por 20°C durante 3 dias. Para o armazenamento a 20°C durante 3 dias o resultado indicou uma baixa incidência de deterioração dos frutos de 25% quando comparados com o controle, que atingiu 100% de fruta. Já o armazenamento a 4°C durante 5 dias, seguido de 20°C durante 3 dias, a deterioração dos morangos tratados com *R. glutinis* atingiu 15%, enquanto os frutos controle apresentaram 95% a incidência de podridões. Neste estudo ainda, concluíram que a levedura *R. glutinis* reduziu a incidência de *B. cinerea* em morangos. Huang et al. (2011), em seu estudo, mostraram que a incidência e severidade da podridão de morango por *Botrytis* foi reduzida por exposição do fruto aos compostos orgânicos voláteis da levedura *Candida intermedia*.

A levedura *C. kefyri*, tem como habitat natural o leite, produtos lácteos e grãos, o que está de acordo com os resultados aqui obtidos, pois, foi isolada de milho. É uma levedura que fermenta a glicose, sacarose, lactose, galactose, porém não fermenta maltose, trealose e celobiose, o que a diferencia de outras espécies de *Candida*. Além disso, é capaz de crescer em temperatura de até 45°C (WADSWORTH CENTER, 2002). Estes fatos, aliados aos resultados encontrados neste estudo, reforçam a possibilidade da utilização desta levedura em frutos, como forma de biocontrole em temperatura ambiente.

6 CONCLUSÃO

De um total de 18 leveduras, 12 (66,67%) foram caracterizadas como *killer* positivas contra pelo menos umas das cepas sensíveis padrão utilizadas.

Das quatro leveduras selecionadas para o antifungigrama em meio sólido, duas (identificadas como *C. kefyr* Am34 e *S. cerevisiae* T19B) mostraram resultados satisfatórios contra o fungo filamentoso, com indícios de antibiose.

As duas leveduras testadas no antifungigrama em meio líquido apresentaram pico de atuação da toxina em 96 horas, porém com baixa porcentagem de inibição da germinação de esporos.

O fungo *B. cinerea* se mostrou resistente a ação dos fungicidas testados, resultando na utilização de apenas um fungicida (Manzate WG) e, em sua concentração máxima. E, das duas leveduras avaliadas até então, apenas a *C. kefyr* foi compatível ao fungicida.

O teste *in vivo* apresentou resultados promissores quanto a utilização da levedura *C. kefyr*, no controle biológico de *B. cinerea* em morangos, com uma porcentagem de eficiência de 37,5% em 5 dias de armazenamento a 25°C.

Sugere-se, com estes resultados, estudos adicionais, a fim de aumentar o conhecimento sobre a levedura *C. kefyr* e sua utilização como controlador biológico, tanto do fungo *B. cinerea*, quanto de outros micro-organismos e colaborar com a diminuição do uso de fungicidas sintéticos. Não foram encontradas pesquisas de controle biológico utilizando *C. kefyr*, portanto, acredita-se que este pode ser o primeiro relato desta levedura como agente de controle biológico de *B. cinerea*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Fábila G. **Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro mantidos sob temperatura refrigerada após a aplicação pré-colheita de produtos**. 2009. 42 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido) Universidade Estadual de Montes Claros, Unimontes, 2009.
- ALVES, Maria L. N. **Avaliação do potencial de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Rhodospordium* no controlo biológico pós-colheita de bolores**. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) – Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2007.
- ANDRADE, Paulo F. S. **Análise da conjuntura agropecuária Safra 2011/2012**. Estado do Paraná, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural, 2012.
- ANGELINI, Rita M. M. et al. **Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy**. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.3711/pdf>>. Acesso em: 21 mai. 2014.
- ANTONIOLLI, Lucimara R. et al. Controle alternativo de podridões pós-colheita de framboesas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.9, p. 979 - 984, 2011.
- BASTOS, Ana R. M. **Caraterização dos polissacarídeos da parede celular de leveduras**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ramo Alimentar) – Universidade do Aveiro, Aveiro, Portugal, 2013.
- BOTELHO, Raquel B. A. et al. **Transformação dos alimentos: cereais e leguminosas**. In: ARAUJO, Wilma M. C. et al. *Alquimia Dos Alimentos*. Brasília: Senac, 2009.
- BRAGA, Daniela O. **Qualidade pós-colheita de morangos orgânicos tratados com óleos essenciais na pré-colheita**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BRITES, Anny S. M. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator *killer*, H₂S⁻ e o caráter floculante**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2003.
- CALVO-GARRIDO, C. et al. Biological control of *Botrytis* bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. **Plant Pathology**, 62, p. 510–519, 2013.

COELHO, A.R. **Controle de *Penicillium expansum*/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita**. 2005. 122 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2005.

COELHO, A.R et al. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1879 - 1892, 2011.

CRIZEL, Gisele R. **Efeito da radiação uv-c durante o cultivo de morangos: aspectos bioquímico-fisiológicos e tecnológicos**. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DIAS, Iara E. **Crescimento micelial e produção de toxinas por fungos de armazenamento associados a grãos de milho sob diferentes níveis de restrição hídrica**. 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado em Patologia das Sementes) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

DIAS, Mario S. C. et al. Doenças do morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 40-43, 2005.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Faostat**. 2012. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>>. Acesso em: 18 jun. 2013.

FELIZIANI, Erica. **Alternatives to synthetic fungicides to control postharvest diseases of strawberry, sweet cherry, and table grapes**. 2013. 181 f. Tese (Agricultural Sciences - Crop Production and Environment) - Department of Agricultural, Food, and Environmental Sciences, Università Politecnica Delle Marche. 2013.

FIALHO, Maurício B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomices cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004.

FRANCO, Bernadette D. G. M. **Importância dos micro-organismos nos alimentos**. In: FRANCO, Bernadette D. G. M.; LANDGRAF, Mariza. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008.

FUENTEFRIA, Alexandre M. **Bioprospecção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de micro-organismos patogênicos humanos**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Rio Grande do Sul, 2007.

GASPERINI, Alessandra M. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho**. 2011. 53 f. TCC (Tecnólogo em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011.

GHOLAMNEJAD, Jalal et al. Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Plant Protection**, v. 49, n. 3, p. 270 – 275, 2009.

GHOLAMNEJAD, Jalal; ETEBARIAN, Hasan R.; SAHEBANI, Navazallah. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 1, p. 001 - 007, jan. 2010.

GOUVEIA, Alfredo de. **Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

HENZ, Gilmar P. et al. Incidência de doenças de pós-colheita em frutos de morango produzidos no Distrito Federal. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, 2008.

HUANG, R et al. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 859 – 869, 2011.

HUANG, R et al. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on postharvest strawberry fruits. **Biological Control**, 62, p. 53 – 63, 2012.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006 - Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.

JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, v. 90, n. 11, p. 1196 – 1200, 2000.

KUPPER, Katia C. et al. Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 425 - 436, jun. 2013.

LIMA, Giuseppe et al. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 4, p. 341 – 349, 2003.

LIMA, Giuseppe et al. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, 40, p. 301 – 307, 2006.

LIMA, Giuseppe et al. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. **Postharvest Biology and Technology**, 60, p. 164–172, 2011.

MACHADO, Maria A. C. F.; BETIOL, Wagner. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 539-545, jun. 2010.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J.M. Biology of killer yeasts. **Int. Microbiol.**, 5, p. 65–71, 2002.

MARTINS, Denise S. et al. **Fisiologia da Produção do Morangueiro**. In: TIMM, Luís C. et al. Morangueiro irrigado: aspectos técnicos e ambientais do cultivo. Pelotas : Ed. Da Universidade Federal de Pelotas, p. 16 – 28, 2009.

MCFEETERS, Hana; MCFEETERS, Robert L. Emerging Approaches to Inhibit *Botrytis cinerea*. **International Journal of Modern Botany**, v. 2, n.5, p. 127-144. 2012.

MEDEIROS, Flávio H. V. et al. Controle biológico de fungos de armazenamento produtores de micotoxinas. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 36, n. 5, p. 483 - 497, set./out., 2012.

MENEL, Kraiem; FATEN, Kachouri; MOKTAR, Hamdi. Combining biocontrol agent and high oxygen atmosphere, to reduce postharvest decay of strawberries. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 24, p. 5179-5187, jun. 2012.

MOTA, Marcelo A.; CAMPOS, Artur K.; ARAÚJO, Jackson V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 23, n. 3, p. 93 - 100, jul./set. 2003.

NICOLAU, Mariana Carla. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho e trigo**. 2014. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2014.

OLIVEIRA, Andriélen V. et al. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por leveduras *killer* visando aplicação em morangos pós-colheita. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 3, p. 353 – 364, 2011.

ORO, Lucia et al. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. **Postharvest Biology and Technology**, v. 96, p. 64 – 68, oct. 2014.

PASINI, Josiani. **Tratamentos alternativos no controle d podridão pós-colheita de morangos**. 2009. 63 f. Monografia (Tecnóloga em Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2009.

PLATANIA, Claudia et al. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**, v. 30, n.1, p. 219 – 225, may 2012.

POLONELLI, L. et al. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J. of Clin. Microb.** v. 17, n. 5, p. 774-780, 1983.

PORTES, Ciro S. **Controle de fungos deteriorantes / micotoxigênicos por leveduras *killer* antagonistas em frutas pós-colheita**. 32 f. 2011. TCC (Tecnólogo em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011.

RUSSO, Valentina M. **Selección de levaduras nativas de uva con capacidad antagónica frente a *Botrytis cinerea***. 2011. 49 f. Tese (Licenciatura em Biologia) – Facultad de Ciencias, Universidade de la República Uruguay. Uruguay. 2011.

SANTOS, Paulo E. T. Sistema de produção do morango: Características básicas das principais cultivares de morango plantadas no Brasil. **Embrapa Clima Temperado** (versão eletrônica), nov. 2005.

SANTOS, Álvaro F. Ocorrência do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em grevilea. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 386 – 387, 2008.

SENHOR, Rosemberg F. et al. Manejo de doenças pós-colheita. **Revista Verde**, Mossoró, v.4, n.1, p. 00 – 13, jan./mar. 2009.

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

SILVA, Neusely et al. **Manual de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 3 ed., 552 p., 2007.

SILVEIRA, Norma S. S. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. **Caatinga**, Mossoró, v.18, n.4, p. 283-299, out./dez. 2005.

TÖFOLI, J.G. et al. **Mofo cinzento em plantas oleráceas, frutíferas e ornamentais**. 2011. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_2/MofoCinzento/index.htm>. Acesso em: 08 jul. 2013.

TRISTÃO, Gabriel B. et al. Leveduras associadas a frutos de abacaxi (*Ananas comosus*) e sua utilização como agentes de controle biológico. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 9, n. 2, p. 085 - 093, maio/jun. 2012.

USALL, Josep et al. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, 58, p. 83 – 92, 2000.

WADSWORTH CENTER. **Mycology Proficiency Testing Program**. New York State Department of Health, New York, 2002. Disponível em: <<http://www.wadsworth.org/ptp/mycology/111502compile>>.pdf. Acesso em: 07 ago. 2014.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 127, p. 213 – 212, 1995.

WANG, Yifei et al. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodospiridium paludigenum*. **Biological Control**, v. 53, n. 2, p. 178 – 182, may 2010.

ZHANG, Dian-peng et al. *Candida pruni* sp. nov. is a new yeast species with antagonistic potential against brown rot of peaches. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p. 525 - 530, jul. 2014.

ZHANG, Hongyin et al. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. **Biological Control**, 40, p. 287 – 292, 2007.