

7

CAPÍTULO

CONTROLE BIOLÓGICO EM MORANGOS *IN NATURA*

Danielle Alves Santos

Débora Francielly de Oliveira

Ivane Benedetti Tonial

Margarida Masami Yamaguchi

Alexandre Rodrigo Coelho

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, gerando muitas perdas e prejuízos aos produtores (SILVEIRA, 2005).

Dentre os frutos, o morango pode ser considerado altamente suscetível 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. Entretanto, 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 sua 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 têm se mostrado preocupados com sua 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 a população. Na natureza, isso ocorre abertamente e é independente da ação do homem (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003).

Nesse contexto, destaca-se o controle biológico, em que 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, o presente trabalho objetivou estudar a atividade de leveduras como antagonistas do fungo *B. cinerea*, causador da doença conhecida por mofo-cinzento, utilizando morangos *in natura* para o procedimento; espera-se, assim, contribuir para seu controle e para o descobrimento de fungicidas naturais.

2 CONTROLE BIOLÓGICO

2.1 Morango

O morango é, de fato, 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” (MARTINS et al., 2009, p. 18). Os frutos verdadeiros, os aquênios, são aqueles conhecidos popularmente por sementes, e são consumidos tanto pelo seu sabor e aroma, quanto pelos seus nutrientes. A Tabela 7.1 apresenta a composição do morango.

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 os 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 (CRIZEL, 2012), ficando na 11ª colocação dentre os países do continente americano (FAO, 2012); os maiores estados produtores no país são Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Paraná e Distrito Fe-

deral (IBGE, 2006). Especificamente no Paraná, o morango foi cultivado em 535 hectares, que produziram 14,4 mil toneladas de morango (ANDRADE, 2012).

Tabela 7.1 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 (TACO, 2011).

A taxa respiratória do morango é muito alta, e, em temperatura ambiente, sua deterioração é acelerada na pós-colheita. Essa taxa pode ser aumentada de quatro a cinco vezes 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 (ALVES, 2009). Com o armazenamento, pode-se chegar a um valor de 40% em perdas (BRAGA, 2012).

O morango é considerado um fruto não climatérico com uma pós-colheita estimada em menos de cinco dias, tendendo à uma desidratação acelerada, “desordens fisiológicas, hematomas, lesões mecânicas e infecções causadas por vários agentes patogênicos” (MENEL, 2012, p. 5179), como fungos, bactérias, nematoides e vírus (HENZ et al., 2008), os 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 à pós-colheita de morango, podendo-se destacar como as duas de maior importância a do mofo cinzento, causada pelo fungo *B. cinerea*, e a podridão-de-Rhizopus (*Rhizopus nigricans*).

Alguns cultivares de morango são mais suscetíveis a doenças causadas por micro-organismos, enquanto outros apresentam maior tolerância e, dentre os principais cultivares plantados no Brasil, tem-se Santa Clara, Burlkey, Tangi, Campinas, Osogrande, Tudla, Selva, Camarosa, Seascape e Dover (SANTOS, 2005). O Quadro 7.1 apresenta alguns desses cultivares e as doenças relacionadas a eles.

Quadro 7.1 Cultivares de morango versus doenças a eles relacionadas

Cultivar	Suscetibilidade	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 verticilium (<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 verticilium (<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>)	-

Cultivar	Suscetibilidade	Tolerância	Resistência
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	–	–

Fonte: adaptado de Santos (2005).

2.2 *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 (CALVO-GARRIDO, 2013), estimada em 230, segundo Mcfeeters e Mcfeeters (2012). 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 “Ocorrência do mofo cinzento causado por *B. cinerea* em grevílea”, descreveram 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 5,55 µm (SANTOS et al., 2008, p. 386).

Os sintomas da doença, nos frutos verdes do morango, são, inicialmente, o aparecimento de manchas marrons, como demonstra a Figura 7.1, que vão se expandindo até tomar todo o fruto, que passa a apresentar 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 alteram sabor e odor, tornando-os desagradáveis. Como os frutos verdes, os maduros também ficam recobertos pelo mofo cinzento (Figura 7.2), apodrecendo rapidamente (DIAS et al., 2005).



Fonte: Ontario Ministry Of Agriculture Food And Rural Affaris.¹

Figura 7.1 Infecção no morango verde por *B. cinerea*

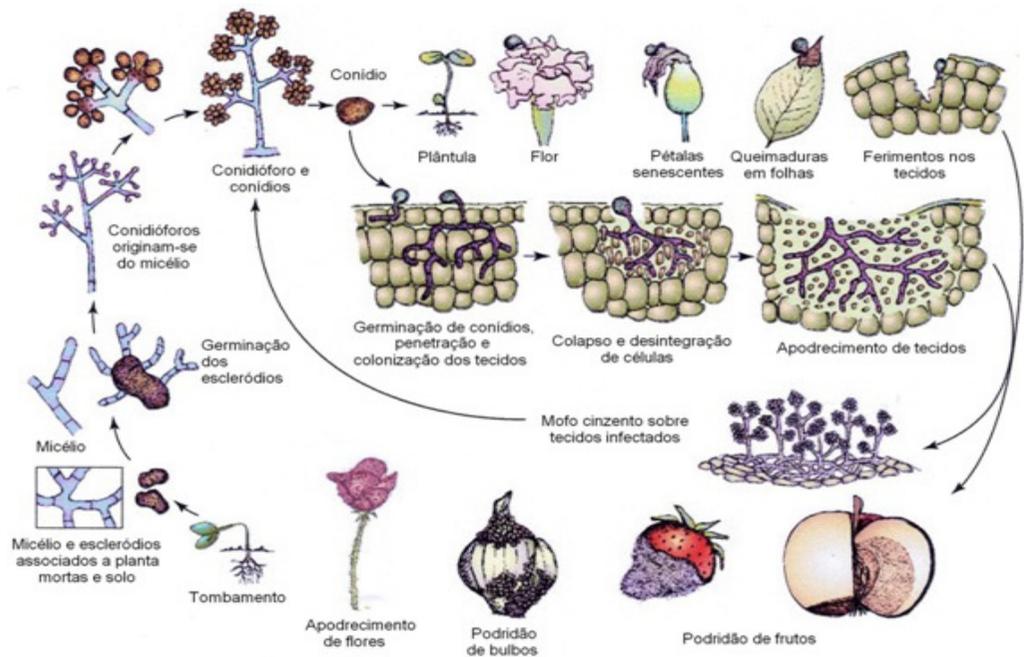


Fonte: Tôfoli et al. (2011).

Figura 7.2 Expansão do mofo cinzento em morangos maduros

¹ Disponível em <<http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/english/strawberries/diseases-and-disorders/botrytis.html>>. Acesso em: 08 jul. 2013.

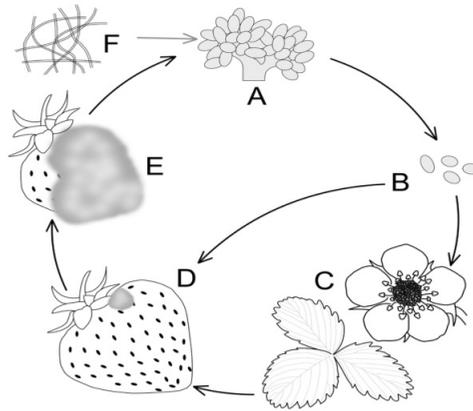
Esse fungo é capaz de sobreviver no solo junto à matéria orgânica ou como uma massa compacta de hifas. Após a produção de conidióforos pelas hifas, em plantas doentes, estes produzem os conídios, que viajam pelo ar infectando vários outros hospedeiros. Sua germinação é favorecida por temperaturas que ficam em torno de 22 °C e 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 7.3 (TÖFOLI et al., 2011). Apresenta, inicialmente, a coloração cinza, para depois se tornar cinza-marrom (BRAGA, 2012).



Fonte: Töfoli et al. (2011).

Figura 7.3 Ciclo das doenças causadas por *B. cinerea*

A Figura 7.4 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, o fungo *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).



Fonte: Mcfeeters e Mcfeeter (2012).

Figura 7.4 Ciclo de vida de *B. cinerea* durante a infecção de morango

Para evitar a podridão pós-colheita, utiliza-se habitualmente a pulverização com fungicidas por 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 têm demonstrado certa resistência (FELIZIANI, 2013). Em relação a esses fungicidas, devem-se limitar suas aplicações justamente 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 (MACHADO; BETIOL, 2010).

2.3 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, esse 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 encontraram 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) reduziram a incidência de *Penicillium digitatum* em laranjas em até dez dias utilizando *Wickerhamomyces anomalus*, Wang et al. (2010), em seu estudo sobre o controle pós-colheita de *B. cinerea* em tomates cereja, mostraram que *Rhodosporidium paludigenum* reduziu a incidência da doença do mofo cinzento significativamente, à medida que as concentrações das suspensões contendo suas células foram aumentando. Oro et al. (2014), avaliaram *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 um grande número de micro-organismos com características antagonicas, desde bactérias até alguns fungos, pois, 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 está associada diz respeito à antibiose, mecanismo de competição por espaço ou nutrientes, e à “introdução de respostas de resistência no tecido hospedeiro” (RUSSO, 2011, p. 15).

Os fungos têm suas células envolvidas por paredes celulares rígidas que mantêm a sua forma, fornecem proteção e estrutura para processos vitais, e atuam como filtros e receptores de hormônios e toxinas (FIALHO, 2004). Elas são compostas 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 (FIALHO, 2004). A antibiose ocorre quando um micro-organismo produz substâncias tóxicas que têm resultado direto sobre outro micro-organismo (PASINI, 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 desses reduz a quantidade de nutriente disponível ao(s) outro(s) micro-organismo(s) presente(s) 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, assim os antagonistas devem ter a capacidade de crescer mais rapidamente que o agente patogênico (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009). A atividade de biocontrole dos antagonistas aumenta 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 à ação de um determinado patógeno, podendo ser da própria constituição do organismo, e expressa a todo o momento, ou podendo ser induzida, o 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, p. 19).

Segundo Medeiros et al. (2012), para ser considerado ideal, um antagonista deve apresentar as seguintes características:

estabilidade genética, eficácia em baixas concentrações e contra uma ampla gama de patógenos em vários produtos de frutas, exigências nutricionais simples, sobrevivência em condições ambientais adversas, crescimento em substratos baratos, em fermentadores, falta de patogenicidade para a planta hospedeira e nenhuma produção de metabólitos potencialmente tóxicos para os seres humanos, e compatibilidade com outros tratamentos químicos e físicos (MEDEIROS et al., 2012, p. 489).

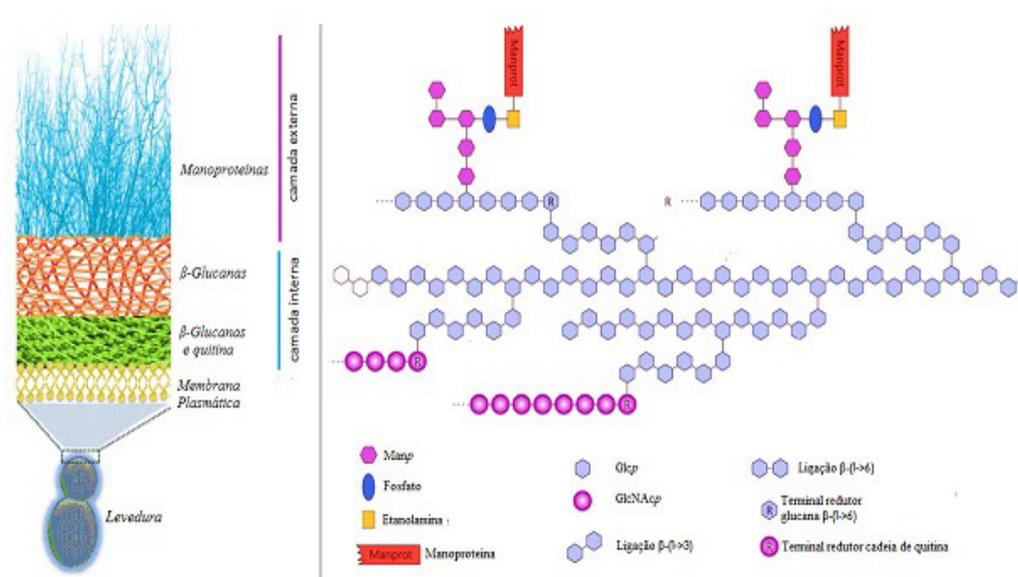
2.4 Leveduras e fator *killer*

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

A parede celular da levedura, como demonstra a Figura 7.5, 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 mem-

brana 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 às condições externas. Já as glucanas β -(1→6) servem de âncora para a estrutura e integridade da camada externa de manoproteínas. (BASTOS, 2013, p. 9)



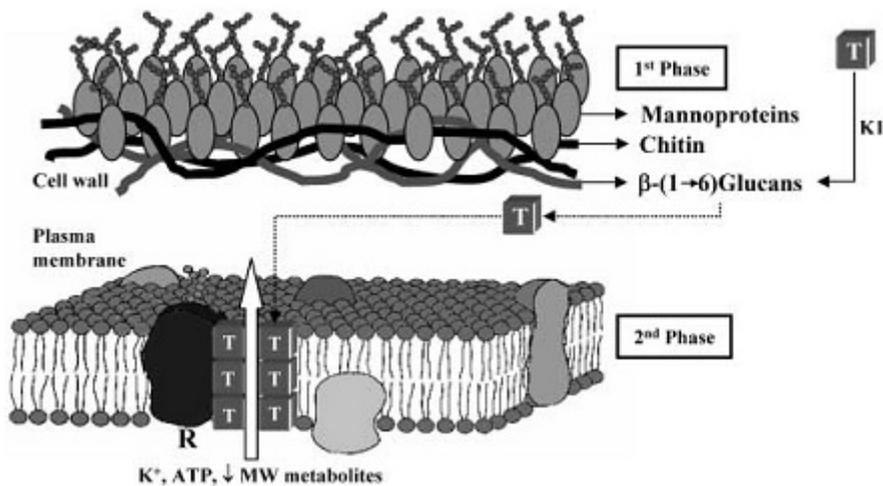
Fonte: Bastos (2013).

Figura 7.5 Parede celular da levedura *S. cerevisiae*

As leveduras são, ainda, capazes de secretar uma substância conhecida por toxina *killer*, que é de natureza proteica ou glicoproteica e de baixo peso molecular, que têm o potencial de afetar outras leveduras ou micro-organismos sensíveis a ela (FUENTEFRÍA, 2007). Esses 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* (RUSSO, 2011).

Segundo Brites (2003), Bevan e Makower descreveram pela primeira vez o fenótipo *killer* em 1963, 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*, em sua grande parte, morriam. Já as células neutras não tinham nenhuma reação.

Em geral, o mecanismo de atuação das leveduras *killer* sobre outros organismos acontece da mesma forma que em relação à 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, 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 um 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 7.6.



Fonte: Marquina, Santos e Peinado (2002).

Figura 7.6 Morte de célula mediada pela toxina killer K1 de *S. cerevisiae*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

O fungo *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 análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *campus* Londrina.

3.1 Métodos

3.1.1 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 ml a 25 ml de BDA acidificado com ácido tartárico 10%. Após o plaqueamento, incubaram-se a 25 °C por 120 horas para crescimento (SILVA et al., 2007). As leveduras foram isoladas inicialmente em BDA e depois transferidas para meio para leveduras (MPL, composto por glicose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1,0%, NaHPO_4 0,3% e ágar 1,8%) (COELHO, 2005).

3.1.2 Caracterização de fator killer nas leveduras isoladas

Para 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 ml a 25 ml de ágar *Sabouraud* adicionado de 0,03% de azul de metileno. Após solidificação do ágar, foi inoculada uma alçada de três diferentes leveduras teste 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 teste (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.

3.1.3 Antifungigrama em meio sólido por leveduras antagonistas

Para esse procedimento, foi utilizado o método conhecido por *pour plate*, onde placas de Petri contendo aproximadamente de 20 ml 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 100

μL 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 (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995; COELHO, 2005). As leveduras teste foram padronizadas em escala de McFarland nº 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.

3.1.4 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% e CaCl_2 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).

3.1.5 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 nº 1 de McFarland, para então inocular-se um volume de 100 μL (aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células) em três 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) e 1,0 ml desse filtrado foi transferido para um tubo de ensaio, onde também se adicionou um volume igual (1,0 ml) de caldo MPL. Em seguida, foram inoculados 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).

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

Este experimento foi realizado utilizando-se quatro fungicidas sintéticos comerciais (Tabela 7.2) 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 se 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 cinco 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). Formulou-se quatro 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 7.2 Fungicidas utilizados para o teste de sensibilidade do fungo *B. cinerea*

Fungicida	Composição	Recomendação de uso	Concentração utilizada
Cerconil® WP	Dimetyl 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.

3.1.7 Teste de compatibilidade com as leveduras

O fungicida selecionado no teste de sensibilidade de *B. cinerea* foi, então, analisado com relação à compatibilidade com as leveduras. O teste verificou a mínima concentração inibitória (C.I.M.), ou seja, verificou-se a menor concentração de fungicida capaz de inibir o desenvolvimento das leveduras testadas (LIMA et al., 2003; LIMA et al., 2006). Para esse teste, utilizou-se quatro 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.

3.1.8 Atividade antifúngica in vivo

Os morangos foram desinfetados por imersão em álcool etílico a 70% durante trinta 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*. 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, foi inoculada sobre o fruto, a suspensão de esporos de *B. cinerea* (10^5 esporos), com volume variando de 50 μ a 90 μ . O tratamento II consistiu da imersão do fruto, por cinco segundos, em uma suspensão de células da levedura selecionada, previamente padronizada na escala de McFarland n° 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%, esperou-se sessenta minutos para sua secagem e, posteriormente, fez-se a imersão do fruto na suspensão de células da levedura selecionada, realizando-se os procedimentos seguintes da mesma forma que nos 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 sessenta minutos e inóculo da suspensão de esporos de *B. cinerea* (10^5 esporos). Para cada tratamento foram utilizados quatro 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 dois, cinco e sete 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 o crescimento fúngico nas folhas do fruto.

3.2 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 Statistica 10.0.

4 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 dessa contagem, foram isolados um total de dezoito leveduras, sendo oito culturas de amostras de milho e dez 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), que 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. (2013), o milho é um cereal que apresenta maior umidade quando comparado ao trigo, sendo de 12,28 g/100 g e 11,34 g/100 g respectivamente. E, ainda, de acordo com Gasperini (2011), o milho tem grande suscetibilidade à contaminação por fungos devido à sua composição rica em nutrientes.

A Tabela 7.3 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, desse total, treze apresentaram resultado positivo para fator *killer*.

Do total de dezoito leveduras isoladas, doze (66,67%) se mostraram positivas contra ao menos uma das cepas sensíveis padrão utilizadas. A zona de inibição apresentada pelo fator *killer* variou de 6,0 a 28 mm (Tabela 7.3). 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 7.3 Determinação da atividade killer de leveduras isoladas de amostras de milho e trigo, frente às amostras 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 7.7, houve inibição de crescimento por antibiose (produção de toxina *killer*) e/ou competição por espaço e nutrientes, o que pode ser explicitado 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.

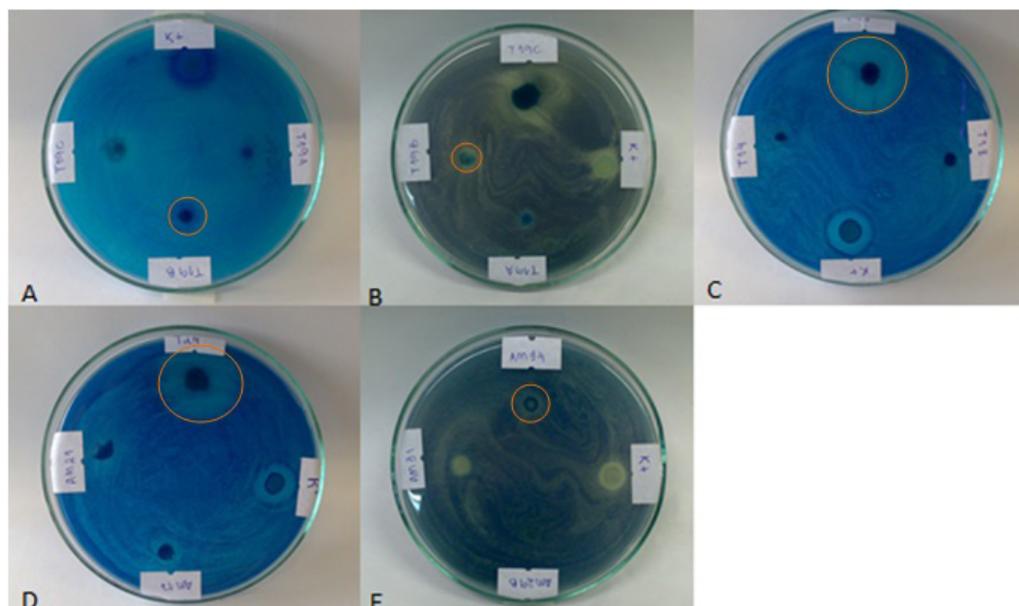


Figura 7.7 Caracterização de fator killer em leveduras isoladas: (A) T19B em *S.cerevisiae* NCYC-1006; (B) T19B *C. albicans* 12A; (C) T17 em *S.cerevisiae* NCYC-1006; (D) T24 em *S.cerevisiae* NCYC-1006; (E) Am34 em *C. albicans* 12A

As quatro leveduras que apresentaram melhores resultados com relação à produção de toxina *killer* foram testadas contra *B. cinerea*. Conforme mostrado na Tabela 7.4, 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 7.8, e T19B. É possível observar na Figura 7.8, ainda, 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, dentre as quais quinze apresentaram competição por nutrientes e duas mostraram competição de nutrientes e antibiose simultaneamente.

Os isolados Am34, T19B, T17 e T24 foram identificados como *Candida kefyr*, *S. cerevisiae*, *Candida rugosa* e *C. rugosa*, respectivamente. Esses gêneros de leveduras têm sido amplamente utilizados no controle biológico de doenças em frutos.

Tabela 7.4 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 7.8** Levedura Am34 apresentando antagonismo por antibiose e competição por nutrientes

Tristão et al. (2012), em seu estudo para controle biológico pós-colheita em abacaxis, reduziram o aparecimento de doenças empregando *S. cerevisiae* e *Pseudozyma flocculosa*; Gholamnejad et al. (2009) reduziram a incidência de *Penicillium expansum* em maçãs com *S. cerevisiae*; Antoniulli et al. (2011) constataram o potencial de *S. cerevisiae* no 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 membrani-faciens* 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. kefyi* e *S. cerevisiae*, devido à 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 7.5, foram realizadas três repetições com o sobrenadante obtido do cultivo de *C. kefy* 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.

Pôde-se observar que, no ensaio com a levedura *C. kefy*, 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. kefy* 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 os tratamentos de 72 e de 96 horas não diferiram significativamente entre si, mas diferiram do tratamento de 120 horas. Este último tratamento apresentou, ainda, diferença significativa quando comparado com seu controle, então, para a levedura *S. cerevisiae*, é presumível que a mesma produziu toxina *killer*, mesmo que em pequenas quantidades, em todos os tratamentos realizados.

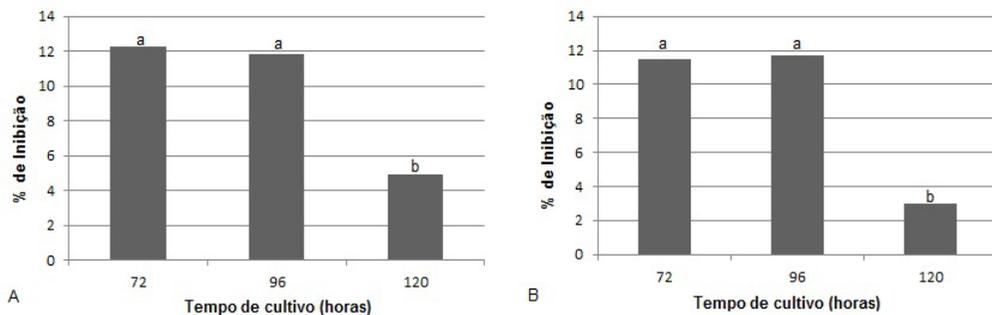
Neste ensaio, as duas leveduras se mostraram atuantes nos tratamentos de 72 e de 96 horas, onde se pôde perceber que o menor valor encontrado para as mesmas foi no de 96 horas, indicando que o menor valor corresponde à maior atuação. A Figura 7.9 exhibe a porcentagem de inibição da germinação de esporos do fungo *B. cinerea* apresentando uma relação inversa entre inibição e germinação de esporos, pois 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. kefy* 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.

Em seu estudo, Portes (2011) 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 sugerida 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 °C e com inibição da germinação de esporos acima de 80%. Este estudo se assemelha aos resultados encontrados aqui pelo fato de o pico de atuação da toxina *killer*, das duas leveduras, ter se encontrado no sobrenadante de 96 horas; porém, com relação à inibição da germinação dos esporos de *B. cinerea*, os valores obtidos foram muito inferiores.

Tabela 7.5 Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante obtido do cultivo de *C. kefir* e *S. cerevisiae*

Incubação (horas)	Germinação de esporos (%)			
	Controle	Sobrenadante <i>C. kefir</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 nove 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 7.9** Porcentagem de inibição de germinação dos esporos de *S. cerevisiae* (A) e *C. kefir* (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 quatro 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 quatro 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 7.10. Pode-se notar, ainda na Figura 7.10, 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. kefyfyr* apresentou crescimento de colônias, na menor concentração (0,035%) do fungicida, como mostrado na Figura 7.11. Neste teste, esperava-se o crescimento da levedura, para que, no teste *in vivo*, não ocorresse interferência do fungicida.



Figura 7.10 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

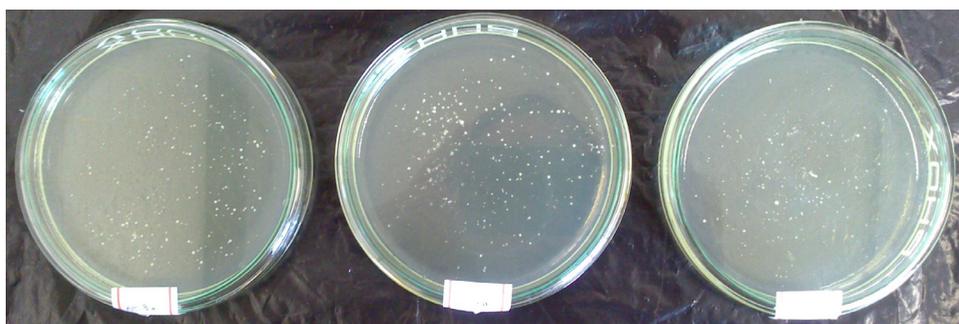


Figura 11 Teste de compatibilidade, levedura *C. kefyfyr* na concentração de 0,035% do fungicida Manzate WG

Para o experimento *in vivo*, foi selecionada a levedura *C. kefyfyr*, que apresentou compatibilidade com o fungicida testado. As leituras foram realizadas nos intervalos de dois, cinco e sete 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 em dois dias (inclusive no controle), não houve resultado para as repetições nesse período.

A leitura de cinco dias mostrou uma P.E. de 0% para o controle, como mostra a Figura 7.12, 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 7.12) quando se leva em consideração que não houve qualquer associação com outro mecanismo de inibição do fungo. Já para 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%, de forma que 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, no tratamento V, onde o fungicida foi utilizado na concentração recomendada, a P.E. obtida foi de 50% (Figura 7.12), valor que, comparado à 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 sete dias, os morangos já haviam atingido um grau muito grande de deterioração, sendo, portanto, de 0% a P.E. dos tratamentos II, III, IV e V.



Figura 7.12 Experimento in vivo para cinco 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. kefir*, aplicada em morangos incubados a 25 °C por cinco 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 três dias ou 4 °C durante cinco dias, seguido por 20°C durante três dias. Para o armazenamento a 20 °C durante três dias, o resultado indicou uma baixa incidência de deterioração dos frutos (25%) quando comparados com o controle, que atingiu 100% de fruta. Já para o armazenamento a 4 °C durante cinco dias, seguido de 20 °C durante três dias, a deterioração dos morangos tratados com *R. glutinis* atingiu 15%, enquanto os frutos controle apresentaram 95% de incidência de podridões. Nesse estudo concluíram, ainda, 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. kefir* 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 temperaturas de até 45 °C (WADSWORTH CENTER, 2002). Esses fatos, aliados aos resultados encontrados neste estudo, reforçam a possibilidade da utilização desta levedura em frutos, como forma de biocontrole em temperatura ambiente.

5 CONCLUSÃO

De um total de dezoito leveduras, doze (66,67%) foram caracterizadas como *killer* positivas contra ao menos uma das cepas sensíveis padrão utilizadas. Das quatro leveduras selecionadas para o antifungigrama em meio sólido, duas (identificadas como *C. kefir* Am34 e *S. cerevisiae* T19B) mostraram resultados satisfatórios contra o fungo filamentosos, 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* mostrou-se resistente à ação dos fungicidas testados, obtendo resultado a utilização de apenas um fungicida (Manzate WG) e em sua concentração máxima. Além disso, das duas leveduras avaliadas até então, apenas a *C. kefir* foi compatível ao fungicida. O teste *in vivo* apresentou resultados promissores quanto à utilização da levedura *C. kefir* no controle biológico de *B. cinerea* em morangos, com uma porcentagem de eficiência de 37,5% em cinco dias de armazenamento a 25 °C.

Sugerem-se estudos adicionais a fim de aumentar o conhecimento sobre a levedura *C. kefir* e sua utilização como controlador biológico, tanto do fungo *B. cinerea* quanto de outros micro-organismos, a fim de colaborar com a diminuição

do uso de fungicidas sintéticos. Não foram encontradas pesquisas de controle biológico utilizando *C. kefyri*, portanto, acredita-se que esse pode ser o primeiro relato do uso dessa levedura como agente de controle biológico de *B. cinerea*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, F. 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, Montes Claros, 2009.
- ALVES, M. L. N. Avaliação do potencial de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Rhodsporidium* no controle biológico pós-colheita de bolores. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.
- ANDRADE, P. F. S. Análise da conjuntura agropecuária Safra 2011/2012. Estado do Paraná, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural, 2012.
- ANGELINI, R. 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, L. R. et al. Controle alternativo de podridões pós-colheita de framboesas. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 46, n. 9, p. 979-984, 2011.
- BASTOS, A. R. M. Caracterização dos polissacarídeos da parede celular de leveduras. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ramo Alimentar) – Universidade do Aveiro, Aveiro, Portugal, 2013.
- BOTELHO, R. B. A. et al. Transformação dos alimentos: cereais e leguminosas. In: ARAUJO, W. M. C. et al. *Alquimia dos Alimentos*. Brasília: Senac, 2013, p. 285-336.
- BRAGA, D. 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, A. S. M. Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator *killer*, H₂S⁻ e o caráter floculante. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em 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 antagonico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1879-1892, 2011.

- CRIZEL, G. 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, I. 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, M. 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, E. 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, Ancona, 2013.
- FIALHO, M. B. Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FRANCO, B. D. G. M. Importância dos micro-organismos nos alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 1-12.
- FUENTEFRIA, A. 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) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, Rio Grande do Sul, 2007.
- GASPERINI, A. M. Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho. 2011. 53 f. TCC (Tecnólogo em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011.
- GHOLAMNEJAD, J. 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, J.; ETEBARIAN, H. R.; SAHEBANI, N. 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, A. 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, G. 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, K. C. et al. Avaliação de microrganismos antagonísticos *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, G. 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, G. 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, G. 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, M. A. C. F.; BETIOL, W. 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, D. 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, 2009, p. 16-28.

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

MEDEIROS, F. 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, K.; FATEN, K.; MOKTAR, H. 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, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. 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, M. C. **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, A. 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, L. 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, J. **Tratamentos alternativos no controle de podridão pós-colheita de morangos**. 2009. 63 f. Monografia (Tecnóloga em Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2009.
- PLATANIA, C. 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, mai 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, C. S. **Controle de fungos deteriorantes/micotoxigênicos por leveduras *killer* antagonistas em frutas pós-colheita**. 32 f. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011.
- RUSSO, V. M. **Selección de levaduras nativas de uva con capacidad antagonica frente a *Botrytis cinerea***. 2011. 49 f. Tese (Licenciatura em Biologia) – Facultad de Ciencias, Universidade de la República Uruguay, Uruguay, 2011.
- SANTOS, P. 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, A. F. Ocorrência do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em grevílea. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 386-387, 2008.
- SENHOR, R. 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, 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, N. et al. **Manual de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.
- SILVEIRA, N. 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, G. 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, J. 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, Y. et al. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. **Biological Control**, v. 53, n. 2, p. 178-182, mai 2010.

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