

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)
Pró-reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-graduação (PPG)
Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)
Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada – Mestrado (PPHI)

CARLIANA ARAÚJO PEREIRA

**MANEJO ALTERNATIVO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM UVA, NO
SUBMÉDIO DO VALE DO SÃO FRANCISCO.**

JUAZEIRO - BA

2014

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)
Pró-reitoria de Pesquisa e Ensino de Pós-graduação (PPG)
Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS)
Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada - Mestrado (PPHI)

CARLIANA ARAÚJO PEREIRA

**MANEJO ALTERNATIVO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM UVA, NO
SUBMÉDIO DO VALE DO SÃO FRANCISCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada da Universidade do Estado da Bahia (PPGHI/UNEB/DTCS), como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Horticultura Irrigada.

Orientador: Prof. Dra. Cristiane Domingos da Paz
Co-orientador: Dr. Carlos Alberto Tuão Gava

JUAZEIRO - BA

2014

Pereira, Carliana Araújo
P428 Manejo alternativo de podridões pós-colheita em uva, no Submédio São Francisco. / Carliana Araújo Pereira. - Juazeiro: Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, 2014.
97 f. il.

Orientadora: Cristiane Domingos da Paz

Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) - Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Campus III, 2014

1. Uva - cultivo 2. Uva - pós-colheita - doenças e pragas 3. Uva - doenças e pragas I. Paz, Cristiane Domingos da II. Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais III. Título

CDD 634.824

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

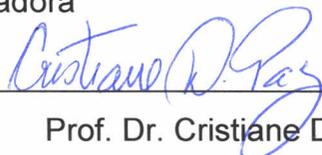
CARLIANA ARAÚJO PEREIRA

**MANEJO ALTERNATIVO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM UVA, NO
SUBMÉDIO DO VALE DO SÃO FRANCISCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada da Universidade do Estado da Bahia (PPHI/UNEB/DTCS), como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Horticultura Irrigada.

Aprovada em: 29/04/2014

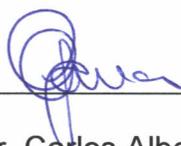
Comissão Examinadora



Prof. Dr. Cristiano Domingos da Paz
Universidade do Estado da Bahia (DTCS / UNEB)



Prof. Dr. Ana Rosa Peixoto
Universidade do Estado da Bahia (DTCS / UNEB)



Dr. Carlos Alberto Tuão Gava
Empresa de Pesquisa (EMBRAPA SEMIÁRIDO)

Dedico esse trabalho à minha família, que foi e sempre será meu maior alicerce, pela compreensão e apoio incondicional em todos os momentos, me ensinando a trilhar os caminhos para vitória diante dos maiores desafios.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por trilhar sempre meus caminhos, me abençoando na luta pela conquista de meus maiores ideais, me fortalecendo cada dia mais.

Aos meus pais Enilda Andrade de Araújo Pereira e Carlos Alberto Pereira da Silva, que sempre me ensinaram o verdadeiro sentido da vida, iluminando os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que pudesse trilhá-los sem medo e cheia de esperanças, cultivando os valores do compromisso e da luta perante os objetivos almejados.

Aos meus irmãos Caio Araújo Pereira e Carla Araújo Pereira, pelo amor incondicional e por estarem ao meu lado sempre me dando confiança e força para vencer qualquer obstáculo. Vocês são minha fortaleza.

Ao meu namorado Nadson Moraes de Freitas por todo carinho, amor, apoio, companheirismo e compreensão. Por se fazer presente em todos os momentos dedicados a esta dissertação, me dando força para seguir em frente e me fortalecendo cada vez mais.

Ao meu cunhado Marcelo Araujo por estar sempre ao meu lado, me apoiando em cada etapa, me ajudando a estar sempre firme e vencer cada obstáculo.

Ao meu Co-orientador Dr. Carlos Alberto Tuão Gava, pela orientação, apoio, paciência, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de uma grande experiência, sendo fundamental no meu sucesso profissional no mundo científico.

À minha orientadora Cristiane Domingos da Paz pela oportunidade, apoio, orientação, paciência, respeito e carinho com que me acolheu, por todo incentivo e compreensão durante essa caminhada.

Aos meu tios: Maria Andrade de Araújo, Enilta Andrade de Araújo, M^a de Fátima Araújo, José Henrique Pereira e Silva e Isabel de Andrade Araújo, por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes de minha vida, me

ajudando nos desafios enfrentados, acreditando em meu potencial e contribuindo para mais uma conquista.

Aos meus queridos: Ítala Layanne, Helanne Barden, Ludmilla Cajuhi, Joselia Gonçalves, Paula Castro, Marisa Zucal, Glaucianne Cavalcanti, Andressa Barbosa e Sirando Seido que são pessoas incríveis com quem tive a oportunidade de conhecer e conviver, obrigada por cada palavra de apoio, por estarem sempre perto me dando confiança quando o desânimo e as dificuldades do cotidiano se fizeram presentes.

As minhas queridas: Carla Mayra, Tamyris Araújo, Fernanda Araújo e Gleyciara Andrade por todo o companheirismo, parceria, presentes em grande parte da minha vida, dividindo comigo muitos momentos de alegrias, tristezas, ganhos, perdas... Obrigada por todo esse apoio.

À Embrapa Semiárido, por toda infraestrutura disponibilizada para obtenção de melhores resultados nos projetos desenvolvidos. Em especial **a equipe do Laboratório de Controle Biológico:** Josélia Gonçalves, Paula Castro, Ludmilla Cajuhi, Ítala Layanne, Helanne Barden, Sirando Seido, Thalita Passos, Jéssica Lima e Cássia Marinho por estarem ao meu lado durante essa jornada me incentivando com palavras amigas, pelo companheirismo, pela ajuda durante a realização dos trabalhos. Vocês foram fundamentais nessa jornada.

Ao laboratorista Herbert Mouse, por todo apoio perante execução de trabalho, disponibilidade e compreensão no longo percurso acadêmico.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada da UNEB, em especial a Cristiane da Paz, Ana Rosa Peixoto e Lindete Vieira por todo carinho e incentivo em todas as etapas do curso, me ensinando muito mais que teoria, me preparando também para a vida profissional.

Aos colegas de Pós-graduação que tive o prazer de conhecer e caminhar juntos nessa importante jornada, por toda ajuda e contribuição na realização dos trabalhos.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Horticultura Irrigada (PPHI) Dona Carmem Oliveira, Selma Mota, Ivana Lúcia, Ricardo e Sr. Júlio, por todo carinho, disponibilidade e apoio prestado durante o mestrado.

A UNEB por contribuir e ser responsável por grande parte da minha formação profissional e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia – **FAPESB** – pela bolsa concedida, pela valiosa contribuição, durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao grupo empresarial **Special Fruit**, em especial ao seu gerente **Sr. Fernando Toshio Sueme**, pela cessão da área para a realização de experimentos em meio real e a equipe da Fazenda Arace, do grupo Special Fruit, em especial ao Eng. Agrônomo **Hemerson Alves Rodrigues** pelo apoio técnico oferecido durante a sua realização.

Ninguém vence sozinho... Meu agradecimento especial a todas as pessoas que contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Obrigada a todos!

Sumário

Agradecimentos	v
Sumário.....	viii
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiii
Resumo.....	1
Abstract.....	2
1. Introdução Geral	3
2. Revisão de literatura	5
2.1 A cultura da videira	5
2.2 Condições ambientais e características da videira	6
2.3 Podridões pós-colheita	7
3. Podridões pós-colheita de uva no Submédio do Vale do São Francisco.....	9
3.1 Alternativas de controle de doenças pós-colheita da videira.....	11
3.2 Controle Biológico	13
3.2.1 As leveduras e seu potencial de controle	15
4. Implantação de controle biológico de podridões pós-colheita no sistema de produção de uva no Submédio do Vale do São Francisco.....	18
5. Referências bibliográficas	20
6. Objetivo.....	29
Capítulo 1 - Utilização de leveduras no manejo de podridões pós-colheita em uva.	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
1. Introdução.....	33
2. Material e métodos.....	34
Cultivo, produção de inóculo e preparação de suspensão das leveduras.....	35
Preparação das suspensões de inóculo dos patógenos	35
Seleção de isolados de leveduras para o controle de podridão pós-colheita causada por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Alternaria alternata</i>	35

Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à temperatura e baixa atividade de água (a_w), em meio de cultivo	36
Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à baixa umidade relativa após aplicação em frutos.	37
Avaliação da eficiência de controle de podridões pós-colheita em uva var. Sugaone	38
3. Resultados	39
Seleção de isolados de leveduras para o controle de podridões pós-colheita causadas por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Alternaria alternata</i>	39
Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à temperatura e baixa atividade de água (a_w), em meio de cultivo	40
Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à baixa umidade relativa após aplicação em frutos.	41
Avaliação da eficiência de controle de podridões pós-colheita em uva var. Sugaone	42
4. Discussão.....	43
5. Conclusões	48
Agradecimentos	49
6. Referências bibliográficas	49
Capítulo 2 - Utilização de controle biológico e resfriamento no manejo de podridões pós-colheita de uva no submédio do vale do são francisco.	53
Resumo.....	54
Abstract.....	55
1. Introdução	56
2. Material e métodos.....	58
Integração de estratégia para o controle de podridões pós-colheita da uva.....	58
Cultivo, produção de inóculo e preparação de suspensão das leveduras	58
Aplicação dos tratamentos em campo	58
Avaliação do número de aplicações pré-colheita de isolados de leveduras para o controle de doenças pós-colheita	60

Avaliação da eficiência de aplicação de isolados de levedura em diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos	62
Resultados	63
Integrando a aplicação pré-colheita de leveduras e resfriamento para o controle de podridões pós-colheita da uva causadas por <i>A. niger</i> e <i>A. alternata</i>	64
Avaliação do número de aplicações pré-colheita de agentes de controle sobre a podridão pós-colheita em uva var. Crimson Seedless.....	66
Avaliação da eficiência de controle de podridões de uva var. Midnight com aplicações de agentes de controle em diferentes estágios de desenvolvimento.....	70
Discussão.....	75
Conclusões	79
Agradecimentos	80
Referências bibliográficas	80

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Utilização de leveduras no manejo de podridões pós-colheita em uva

Figura 1 – Efeito da aplicação de isolados de levedura em uva var. Sagraone, sobre a incidência de podridão causada por *Aspergillus niger* (A) e *Alternaria alternata* (B), 10 dias após a inoculação..... 40

Figura 2 – Culturabilidade de isolados de leveduras (LF, L7K, L9 e L10) em meio com baixa atividade de água (a_w) e diferentes condições de temperatura (A) e diferentes concentrações de PEG 6000 (B), com concentração (0, -2, -5, -10, -15, -20)..... 41

Figura 3 – Tolerância de isolados de leveduras à baixa umidade relativa do ambiente controlado após a pulverização de bagas com suspensões de leveduras contendo 10^8 céls.mL⁻¹ e expostas a diferentes condições de UR..... 42

Capítulo 2 - Utilização de controle biológico e resfriamento no manejo de podridões pós-colheita de uva no Submédio do Vale do São Francisco.

Figura 1 – Flutuação das variáveis climáticas temperaturas (máxima, mínima e média), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (chuva) no período de realização do experimento (jul – dez/2011)..... 50

Figura 2 – Flutuação das variáveis climáticas temperaturas (máxima, mínima e média), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (chuva) no período de realização do experimento (ago – out/2013)..... 61

Figura 3 – Flutuação das variáveis climáticas temperaturas (máxima, mínima e média), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (chuva) no período de realização do experimento (jun – set/2013)..... 63

Figura 4 – Evolução da incidência de podridão causada por *A. niger* (A) e *A. alternata* (B) após inoculação artificial em uva var. Sagraone e manutenção em câmara fria (2 °C até 31d) e ambiente (25 °C até 45d)..... 64

Figura 5 - Eficiência de isolados de leveduras no controle (%) de podridões pós-colheita causado por *Aspergillus niger* (A) e *Alternaria alternata* (B) em uvas var. Sagraone..... 66

Figura 6 - Efeito do tratamento com diferentes agentes de controle e do número de pulverizações sobre o peso inicial (A e B) e peso ao sair do armazenamento (C e D) em câmara fria (28 dias) em uva var. Crimson Seedless..... 67

Figura 7 - Incidência de podridões pós-colheita (%) ao final do período de armazenamento em câmara fria causadas por *Cladosporium* sp. e podridão

total em uva var. Midnight após a aplicação de agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos.....

Figura 8 - Severidade de podridões pós-colheita (%) ao final do período de armazenamento (29 dias) em câmara fria e comercialização (5 dias) em uva var. Midnight (A) após aplicação de agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos (B).....

73

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - Utilização de leveduras no manejo de podridões pós-colheita em uva

Tabela 1 – Estabilidade da UR do ar interna utilizando diferentes soluções concentradas de diversos sais para avaliação da tolerância dos isolados de levedura a baixa umidade relativa 37

Tabela 2 – Influência da aplicação de isolados de leveduras sobre a severidade (%) de podridão pós-colheita causada por *A. alternata* e *A. niger* em cachos de uva var. Sagraone 42

Capítulo 2 - Utilização de controle biológico e resfriamento no manejo de podridões pós-colheita de uva no Submédio do Vale do São Francisco.

Tabela 1 - Efeito da aplicação pré-colheita de diferentes isolados de leveduras sobre a severidade de podridões causadas por *A. niger* (A) e *A. alternata* (B) em frutos de uva var. Sagraone..... 65

Tabela 2 – Incidência (%) de podridões pós-colheita ao final do período de armazenamento em câmara fria em uva var. Crimson Seedless por *Cladosporium sp.*, *Aspergillus niger* e podridão total após a aplicação de agentes de controle com diferentes números de aplicações..... 68

Tabela 3 - Severidade de podridões pós-colheita (%) em período de armazenamento em câmara fria em uva var. Crimson Seedless por *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.* e podridões em geral, após a aplicação de agentes de controle em diferentes números de aplicações..... 69

Tabela 4 - Área abaixo da curva de progresso da doença ao longo do período de comercialização (armazenamento em frio + ambiente) em uva var. Crimson Seedless por *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.* e podridões em geral, após a aplicação de agentes de controle em diferentes números de aplicações..... 69

Tabela 5 - Efeito do tratamento com diferentes agentes de controle e da época de aplicação sobre o peso inicial, peso ao sair do armazenamento em câmara fria por 28 dias e durante o período em exposição à temperatura ambiente por 5 dias em uva var. Midnight..... 70

Tabela 6- Perda de massa (%) de cachos ao longo do processo de armazenamento em câmara fria por 28 dias e período de exposição à temperatura ambiente por 5 dias com diferentes agentes de controle e épocas de aplicação..... 71

Tabela 7 - Incidência de podridões pós-colheita (%) em período de armazenamento e comercialização (36 dias) em uva var. Midnight por *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* e podridões em geral, após a aplicação de

agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos..... 72

Tabela 8 - Severidade de podridões pós-colheita (%) em período de comercialização (armazenamento em frio + ambiente) em uva var. Midnight por *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* e podridão total após a aplicação de agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos..... 74

RESUMO

A região do Submédio do Vale do São Francisco é a maior exportadora de uvas de mesa do Brasil. Entretanto, a ocorrência de problemas fitossanitários na fase pós-colheita torna-se um fator limitante da produtividade. Dessa forma se faz necessário a busca por alternativas sustentáveis que visem erradicar ou minimizar os efeitos danosos, nesse sentido, as leveduras vêm se apresentando como uma alternativa promissora por atuar de maneira biológica sem comprometer a qualidade pós-colheita. O presente trabalho teve como objetivo selecionar leveduras e definir uma estratégia de uso para a aplicação de leveduras antagonistas visando o controle biológico e resfriamento no manejo de podridões pós-colheita em uva causada por *Alternaria alternata* e *Aspergillus niger* no Submédio do Vale São Francisco. Foram avaliados o efeito dos isolados no controle de podridões pós-colheita com inoculação de leveduras padronizadas em 10^8 céls.mL⁻¹ e 24 hrs depois 10^6 esporos.mL do patógenos; A tolerância à baixa atividade de água (a_w) em meio de cultivo utilizando PEG6000 com potenciais osmóticos (0, -2, -5, -10, -15, -20 MPa) e diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35 e 40°C); A sobrevivência das leveduras à diferentes condições de UR(30, 40, 50, 60, 80%) e a eficiência de controle em condições de campo através da aplicação da suspensão de leveduras, com pulverizações em dois períodos: quinze dias antes da colheita e a segunda dois dias antes da colheita; como também o número de aplicações pré-colheita realizadas em 3, 2 semanas e 1 dia antes da colheita, além das diferentes épocas de aplicações dos agentes para o controle de doenças pós-colheita. Os isolados L7K, L9, L60K e LF apresentaram elevada eficiência de controle de podridões pós-colheita causada pelo fungo *Aspergillus niger*, e os isolados L7K e LF para o fungo *Alternaria alternata*. Os isolados L10, L7K e LF apresentaram faixa ótima de crescimento em torno de 25 a 30°C tolerando até 35°C e o L9 com crescimento ótimo em torno de 20°C e tolerância até 30°C. O isolado L7K se destacou sobrevivendo a partir de 40% de Umidade Relativa, apresentando o melhor crescimento quando exposto a umidade relativa mais elevada 60-80%. Houve efeito significativo da aplicação prévia de leveduras destacando-se L7K e LF com redução na incidência e severidade de podridões pós-colheita, apresentando elevada eficiência de controle. Aplicações pré-colheita realizada a partir da 3ª semana antes da colheita apresentaram redução na incidência e severidade de podridões em condições refrigeradas e de comercialização, e se tratando de épocas a floração apresentou melhores resultados quanto a inibição da doença.

Palavras chaves: Podridões pós-colheita, leveduras antagonista, estresses abióticos, pulverizações pré-colheita.

ABSTRACT

The region of the Submedium of the São Francisco Valley is the largest exporter of fresh fruits from Brazil. However, the occurrence of post-harvest decay has been the limiting factor to improve commercialization. Thus the research has been looking for sustainable alternatives to eradicate or minimize the problems, avoiding the harmful effects of fungicides. Biocontrol applying yeasts to fruits and vegetables have already presented promising results to postharvest decay control. The present work aimed to select yeast and set a strategy for using the application of antagonistic yeasts aimed at biological control and cooling in the management of post-harvest rots grape caused by *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger* in the Lower Basin of the San Francisco Valley. The effect of the isolates in the control of postharvest decay inoculated with yeast standardized on 10^8 céls.mL⁻¹ and 24 hrs after 10^6 esporos.mL the pathogens were evaluated; Tolerance to low water activity (aw) in culture medium using PEG6000 with osmotic potentials (0, -2, -5, -10, -15, -20 MPa) and different temperatures (20, 25, 30, 35 and 40 ° C); The survival of yeast at different RH conditions (30, 40, 50, 60, 80%) and control efficiency under field conditions by applying the yeast suspension with sprays into two periods: two weeks before harvest and the second two days before the harvest; as well as the number of pre-harvest applications performed on 3, 2 weeks and 1 day before the harvest, in addition to the different times of applications of agents for the control of postharvest diseases. The L7K, L9, L60K and LF isolates showed high efficiency control postharvest caused by the fungus *Aspergillus niger* rot, and L7K and LF isolates for the fungus *Alternaria alternata*. The L10, L7K and LF isolates showed optimal growth range around 25-30 ° C tolerating up to 35 ° C and the L9 with optimal growth at around 20 ° C and 30 ° C. Tolerance The isolated L7K stood surviving from 40% RH, showing the best growth when exposed to higher relative humidity 60-80%. There was a significant effect of prior application of yeasts and LF L7K highlighting a reduction in the incidence and severity of post-harvest rots, showing high efficiency control. Preharvest applications made on or after the 3rd week before harvest had reduced incidence and severity of decay in refrigerated conditions and marketing, and dealing with flowering times showed better results regarding the inhibition of disease.

Key words: Postharvest decay, antagonistic yeasts, abiotic stresses, preharvest sprays.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de frutas do mundo. Nos últimos anos a área plantada alcançou 82.897 hectares, com uma produção de 1.514.768 toneladas de frutos (IBGE, 2012), tornando o país um relevante produtor, consumidor e exportador. O Brasil atualmente é considerado um dos principais produtores de frutas frescas, chegando a movimentar 910 milhões de dólares em exportações no ano de 2012, superando o valor de exportação em 2011 (Agrostat/Mapa, 2013).

Os estados de Pernambuco e Bahia se destacam no contexto nacional entre os grandes exportadores de uvas finas com uma área cultivada de 11.700 hectares na região do Submédio do Vale do São Francisco (Cepea, 2013). A expansão da fruticultura regional se deu, principalmente, em função das condições climáticas, que contribuem para melhor qualidade dos frutos, e dos grandes investimentos governamentais resultando em oportunidades de negócios no mercado internacional.

Um dos problemas que afeta frequentemente a produção de frutas no Brasil são as podridões causadas por patógenos, que podem ocorrer em várias fases da produção, inclusive durante o processo pós-colheita. Apesar da expansão da viticultura no Submédio do Vale São Francisco, as perdas pós-colheita são expressivas e têm causado grandes prejuízos econômicos. Os fungos se destacam por serem microrganismos responsáveis por aproximadamente 80-90% do percentual de perdas causados por agentes microbianos (Oliveira *et al.*, 2006).

As podridões afetam a qualidade das uvas produzidas no Submédio do Vale do São Francisco causando perdas principalmente nos períodos chuvosos. Os principais agentes causais são os fungos *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* e *Cladosporium herbarum* com relatos frequentes nos últimos anos (Pearson & Goheen, 1988; Lima *et al.*, 2009). O processo infeccioso pode ter início em várias etapas do cultivo, ocorrendo na forma de infecções quiescentes, ou até durante os procedimentos realizados

após a colheita como através de ferimentos e inadequação do transporte e armazenamento, além de alguns fatores, como as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Barkai-Golan, 2001; Cavalcanti, 2005; Oliveira *et al.*, 2006).

Quando as condições meteorológicas são favoráveis à proliferação de patógenos (geralmente com alta umidade, baixa temperatura e presença de chuvas), a estratégia de controle recai sobre o uso integrado de refrigeração e fungicidas sintéticos. No entanto, com a difusão mundial do ideal de sustentabilidade na agricultura, a preocupação com a contaminação de frutas e oleráceas com resíduos de pesticidas torna desconfortável a prática da aplicação pós-colheita de fungicidas.

Portanto, há a necessidade de encontrar alternativas sustentáveis e desenvolver técnicas que permitam eliminar o risco de resíduos, além de erradicar ou minimizar os efeitos danosos da presença desses patógenos nos frutos, sem comprometer a demanda pelos consumidores por produtos de qualidade e inocuidade garantidas. Nesse contexto, o controle biológico se apresenta como uma alternativa promissora, permitindo a redução ou eliminação do uso de agrotóxicos e dos riscos de contaminação com resíduos.

Diversos grupos de microrganismos vêm sendo estudados e apontados como potenciais agentes de controle de doenças, dentre eles as leveduras. Esses agentes microbianos vêm se destacando por serem comumente encontrados na superfície dos frutos e utilizarem diversos mecanismos de ação como a competição por nutrientes, produção de antibióticos e produção de enzimas líticas (Droby, 2006). No entanto, embora muitos estudos tenham demonstrado este potencial, poucos agentes de controle entraram efetivamente em uso. Assim, faz-se necessária a intensificação de trabalhos de pesquisa direcionados as diversas etapas para obtenção de produtos para biocontrole, tais como, avaliações dos mecanismos de ação envolvidos nas interações entre os agentes de biocontrole e os patógenos, as plantas e o meio ambiente (Morandi *et al.*, 2005; Batta, 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da videira

A videira (*Vitis* spp.) foi introduzida no Brasil pelos portugueses na região de São Paulo, se destacando pela excelente adaptação às condições de clima e solo, que se tornam ideais em regiões tropicais e subtropicais (Pommer, 2003; Pommer & Maia, 2003). Segundo Mello (2006), a produção de uvas no Brasil apresentou inicialmente uma tendência crescente, com certa estabilidade nos últimos anos. No Brasil, dois grupos de uva de mesa se destacam: uvas finas de mesa, a maioria de variedade *Vitis vinifera* L. de origem européia, e uvas comuns de mesa, sendo em grande parte uvas de variedades ou híbridas da espécie *V. labrusca* L., de origem americana (Trindade, 2007).

Segundo dados do IBGE, em 2012 a área plantada com videira no Brasil atingiu 82.897 hectares e uma produção de 1.514.768 toneladas de frutos, tanto para processamento quanto para consumo “*in natura*”. A região Sul, que apresenta temperaturas mais baixas, é a maior produtora de uva do país com 989.884 toneladas, acompanhada da região Nordeste de clima semiárido, que produz 289.977 toneladas, e Sudeste, com 227.453 toneladas de uvas produzidas (IBGE, 2012).

Na região Nordeste, a produção de uva predomina nos municípios de Petrolina/PE e Juazeiro/BA, situados, respectivamente, nos sertões pernambucano e baiano do Submédio do Vale do São Francisco, correspondendo juntas a uma área de cultivo com mais de 11.200 hectares, em contínua expansão, com 90% do cultivo em fase produtiva (Lima, 2012), sendo caracterizada como a área de maior concentração de uva no Nordeste, apesar de existirem outras áreas nesta região onde o clima é similar e também se explora o cultivo de uva como: Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte (Pedro Junior & Sentelhas, 2003).

As características edafoclimáticas do polo Petrolina-PE - Juazeiro-BA, a existência de empreendedores e os investimentos e projetos públicos de

irrigação têm sido determinantes na instalação e expansão da produção de uvas finas de mesa (Silva & Correia, 2004; Lima, 2012).

Segundo o Ibravin (2010), as características climáticas colocam a região do Submédio do Vale do São Francisco em destaque por ser uma área em que a produção de uva pode adquirir características específicas, além de garantir produção contínua durante o ano. Assim, a cultura tem contribuído para o desenvolvimento significativo dos setores econômico e social regionais, tendo em vista sua rentabilidade financeira e a geração de empregos.

2.2 Condições ambientais e características da videira

A cultura da videira é considerada de clima temperado, embora apresente adaptabilidade às mais variadas condições climáticas, o que possibilita seu cultivo em diversas regiões. Todavia, apresenta uma série de exigências climáticas para expressar seu máximo potencial em rendimento e qualidade dos frutos (Sentelhas, 1998).

O clima interfere no crescimento, na produtividade e na qualidade da produção. A temperatura, a umidade relativa e a luminosidade são os fatores climáticos mais importantes para a produção de uva. A radiação solar é considerada um fator decisivo para os processos vitais da planta: fotossíntese, fotoperiodismo, crescimento dos tecidos, floração, amadurecimento dos frutos, entre outros (Ferreira *et al.*, 2004). O calor é importante para o crescimento vegetativo das plantas, enquanto o frio é imprescindível para o repouso hibernar e para a diferenciação das gemas florais (Carvalho & Sobrinho, 2002).

A temperatura e a umidade relativa interferem significativamente na qualidade pós-colheita dos frutos, pois participam principalmente na etapa do armazenamento. A incidência de perdas na produção intensifica-se de acordo com as condições ambientais que favorecem a proliferação de microrganismos durante o crescimento da planta; a cultivar; o local de produção; e a sanidade dos materiais utilizados. Dessa forma, o melhor período para o controle fitossanitário é quando as chuvas estão mais escassas, quando a temperatura

evita a maior ocorrência de umidade, impedindo um ambiente favorável para o crescimento do patógeno e contribuindo assim para melhor desenvolvimento do fruto (Silveira *et al.*, 2005).

O clima também influencia na quebra de dormência de gemas da videira. No clima tropical, existem algumas particularidades na viticultura quanto ao manejo que diferenciam do clima Subtropical e Temperado, isso é evidenciado de acordo com a adaptabilidade e o seu comportamento durante o ciclo (Leão & Maia, 1998). As regiões de clima tropical não apresentam a fase de dormência que ocorre ao longo do inverno e é quebrada no início da primavera, dando início a um novo ciclo. Isso possibilita ciclos sucessivos de produção em qualquer época, com até duas colheitas por ano, pois as plantas vegetam continuamente, no entanto há uma grande irregularidade na diferenciação de gemas, na emissão de brotos e floração (Camargo & Oliveira, 2001). No Semiárido brasileiro, a poda, o manejo da irrigação e a aplicação de reguladores vegetais permitem o escalonamento da produção ao longo de todo o ano, bem como a realização de até cinco safras a cada dois anos.

A uva é um fruto não climatérico, caracterizado por apresentar um declínio na atividade respiratória após a colheita, que se mantém relativamente baixa e constante, não produzindo etileno, o hormônio natural do amadurecimento (Chitarra & Chitarra, 2005). Estas características da cultura evidenciam a necessidade de monitoramento específico em todas as etapas produtivas.

2.3 Podridões pós-colheita

As Podridões pós-colheita são responsáveis por grandes perdas nos segmentos de hortaliças e fruteiras em todo o mundo, com estimativas que chegam a 50% em regiões tropicais (Janisiewicz & Korsten, 2002; FAO, 2010). Em geral, isto se deve a problemas relacionados ao controle de patógenos em pré-colheita, a danos mecânicos na colheita, transporte e inadequação no armazenamento (Barkai-Golan, 2001; Snowdon, 2010). Um dos maiores

entraves para as regiões produtoras de uvas são as perdas causadas por patógenos que infectam resíduos florais ou que são capazes de produzir infecções quiescentes (Viret *et al.*, 2004; Snowdon, 2010).

Alguns aspectos relacionados à pós-colheita podem restringir a comercialização das uvas. Nos casos em que a logística de armazenamento e transporte, como no Submédio do Vale do São Francisco, requerem longo período entre a colheita e o consumo, a queda na atividade fisiológica, a sensibilidade à desidratação, o desgrane e as infecções fúngicas podem causar grandes perdas ou desvalorização da produção (Artés-Hernandez & Barberà, 2006). As doenças pós-colheita podem ser a maior causa de alterações, podendo chegar a 80-90% dos casos (Oliveira *et al.*, 2006). Como resultado, as perdas podem chegar até a 25% da produção total em países industrializados e mais de 50% nos países em desenvolvimento (Nunes, 2012).

Durante o processo de pós-colheita, alguns fatores tecnológicos, fisiológicos (respiração, transpiração, amadurecimento) e patológicos (doenças e pragas) interagem de diversas maneiras, interferindo direta ou indiretamente no manejo de doenças pós-colheita. Ou seja, um controle eficiente das doenças requer a consideração dos fatores, interligados nos vários subsistemas que compõem o sistema produtivo (Silveira *et al.*, 2005).

Silva e Correia (2004) relatam, entretanto, que a produção voltada para um mercado de uvas finas de qualidade passa a exigir cada vez mais, a utilização de novas tecnologias, mão-de-obra qualificada e serviços especializados, tanto no processo produtivo, quanto nas atividades de pós-colheita. Essas exigências têm por finalidade, além da busca por maior produção e qualidade dos alimentos, uma preocupação a mais com o meio ambiente que, dentre os diversos fatores, destaca o uso demasiado de produtos químicos nos cultivos para o controle de doenças frequentes, o que ocasiona a permanência de resíduos de agrotóxicos nos alimentos.

As infecções mais frequentes ocorrem através de ferimentos realizados durante o processo de colheita ou até mesmo no período de armazenamento. Essas doenças pós-colheitas em uva geralmente ocorrem na forma de infecções quiescentes que iniciam-se na fase de pré-colheita, quando os frutos

ainda se encontram ligados às plantas, ou podem ser por infecções adquiridas, decorrentes de infecções durante o período pós-colheita. No caso das infecções quiescentes, os sintomas surgem quando o fruto passa pelo processo de colheita e estes sofrem alterações fisiológicas tornando-se, mais susceptíveis ao ataque de patógenos (Barkai-Golan, 2001, Cavalcanti, 2005, Oliveira *et al.*, 2006).

3. Podridões pós-colheita de uva no Submédio do Vale do São Francisco

Dentre as principais doenças da videira, se destacam os fitopatógenos que atacam as bagas através de infecções quiescentes ou adquiridas evoluindo para as seguintes podridões: Podridão por *Penicillium* ou mofo azul (*Penicillium* spp.), podridão por *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Lind), podridão por *Aspergillus* (*Aspergillus niger* Van Tiegh.), podridão por *Cladosporium* (*Cladosporium herbarum* (Pres.: Fr.)), míldio (*Plasmopora viticola* (Brek & Curt.)), oídio (*Uncinula necator* (Schwein.) Burr.), cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye), mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers. Ex Fries), podridão de *Alternaria* (*Alternaria alternata* Fr.), podridão da uva madura (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc.) (TAVARES; SILVA, 2006). Podendo se destacar com maiores ocorrência na região Semiárida: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* e *Cladosporium herbarum* (Pearson & Goheen, 1988; Oliveira *et al.*, 2006; Terao *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Camargo *et al.*, 2011).

Segundo Camargo *et al* (2011), no ano de 2009 análises de amostras de uvas sem sementes de diferentes cultivares com sintomas de podridão pós-colheita na Região do Submédio do Vale do São Francisco detectaram a presença dos fungos *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium expansum*. Os autores não relatam a ocorrência de *Botrytis cinerea* na região, o que é compreensível dada a sua alta demanda por umidade para o início do processo patogênico (Agrios, 2005).

Cladosporium herbarum é um fungo que tem a capacidade de penetrar nas bagas nas fases pré-colheita ou durante o armazenamento, sendo capaz de crescer mesmo quando exposto a condições refrigeradas de 0°C e em alta umidade relativa. O fungo aproveita-se de bagas que apresentem fissuras na epiderme desenvolvendo-se a partir daí (Camili & Benato, 2005; Lima, 2008).

Apesar do fungo *Rhizopus stolonifer*, causador da podridão-mole, ter pouca incidência no Submédio do Vale do São Francisco, pode ocorrer em todas as regiões que mantêm o cultivo da videira, e assim como o *Lasiodiplodia theobromae* se destaca por ser muito comum em bagas maduras (Galloti *et al.*, 2002; Benato, 2003). Já o *Penicillium expansum*, responsável pela podridão denominada de mofo azul, se destaca pela resistência a ambiente refrigerado com baixas temperaturas, onde mantém o seu desenvolvimento mesmo que lento, podendo afetar outros cachos e causar danos econômicos (Camargo *et al.*, 2011)

Os gêneros *Aspergillus* e *Alternaria* são dois dos principais representantes fúngicos responsáveis pela produção de micotoxinas inclusive na uva, que são metabólitos secundários tóxicos de difícil controle, e proliferam numa ampla variedade de produtos agrícolas destinados ao alimento do homem e dos animais (Blunden *et al.*, 1991; Hussein & Brasel, 2001). Isso é preocupante, porque a detecção de micotoxinas em frutas colonizadas por fungos podem acarretar riscos à saúde, apresentando toxidez em animais e sendo causadoras de mutagênese e carcinogênese em células humanas (Sylos & Rodriguez-Amaya, 1999; Yiannilouris & Jouany, 2002; Drusch & Ragab, 2003).

Ao contrário de alguns fungos que necessitam de ferimentos para penetrar no fruto e se desenvolver, o fungo *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) Keissl se destaca por não precisar de ferimentos para servir como via de penetração no fruto, além de ser bastante agressivo e resistente à ambiente refrigerado, onde se mantém em constante desenvolvimento. Segundo Benato (2003), quando em condições favoráveis com alta umidade, é observada a presença

de frutificações do fungo em aglomerações, que vão de acinzentados a verde oliva, e quando em estágio mais evoluído torna-se preto.

Aspergillus niger é uma espécie que tem grande adaptabilidade ao meio, apresentando tolerância inclusive à baixa umidade. Esta característica torna-o mais frequente da região do Submédio do Vale do São Francisco, principalmente quando a colheita ocorre em períodos chuvosos. A infecção inicia-se ainda no campo e os sintomas podem aparecer na maturação ou permanecer como endófito, manifestando-se gradativamente durante o período de armazenagem, e resultando em grandes prejuízos para o produtor (Camargo *et al.*, 2012).

Na podridão causada por *Aspergillus niger*, não existe uma fase determinada para seu desenvolvimento, ele possui uma ótima desenvoltura em qualquer estágio de crescimento da uva, e pode aparecer a partir de infecção adquirida ou não (Barkai-Golan, 2001, Cavalcanti, 2005, Oliveira *et al.*, 2006). Os sintomas característicos são o escurecimento e amadurecimento do local infectado nas bagas, provocando o rompimento da casca, desenvolvendo um bolor escuro que corresponde às estruturas de frutificação do fungo. Com o tempo pode atingir uma coloração acinzentada, podendo ser confundida com o mofo cinzento que não é encontrado na região (Camargo *et al.*, 2012).

3.1 Alternativas de controle de doenças pós-colheita da videira

O controle de fitopatógenos causadores de doenças de frutas, incluindo o controle biológico, pode ser realizado em duas etapas: durante o período de desenvolvimento do fruto em condições de campo, ou depois da colheita, durante o armazenamento. O controle ainda no campo tem por objetivo a prevenção de infecções no fruto, impedindo que o patógeno penetre nos tecidos e se aproveite do armazenamento para se desenvolver causando podridões e impedindo o surgimento de outras infecções (Bettioli & Ghini, 1995; Sharma *et al.*, 2009).

O controle químico é o método mais aplicado para o manejo de patógenos pós-colheita em frutas e hortaliças, comumente associado a métodos físicos como a refrigeração, o tratamento térmico, radiação, atmosfera controlada e modificada (Zambolim *et al.*, 2002). Apesar dos produtos químicos apresentarem eficiência em curto prazo, grandes dosagens desses produtos são lançadas nas plantações propiciando alta produtividade. No entanto, os efeitos negativos sobre o solo e o ecossistema, em geral, precisam ser levados em consideração, mas principalmente em relação à contaminação do produto final por resíduos, que vem se tornando uma exigência do mercado consumidor.

A refrigeração promove o retardamento da atividade da maioria dos microrganismos, além de moderar os processos metabólicos dos frutos, apresentando maior eficiência quanto mais rápida for aplicada (Silveira *et al.*, 2005). O resfriamento imediato após a colheita permite em retirar imediatamente o calor que a fruta traz do campo (Cantillano, 2006). Dessa forma, a ocorrência de atrasos no resfriamento resulta em aumento na perda de água, evidenciado no murchamento dos frutos e desidratação do cálice (Pizarro, 2009). No entanto, à medida que as frutas voltam a serem expostas às condições naturais, os microrganismos, até então já existentes, se beneficiam das condições favoráveis e retomam sua atividade. Além disso, há um aumento significativo do custo de produção causado pela manutenção do sistema de refrigeração da conservação pós-colheita (Barkai-Golan, 2001; Kader, 2002).

O tratamento térmico consiste em conjugar temperatura e tempo de exposição específica para cada patógeno, sendo somente adequado para frutas e hortaliças que tolerem temperatura elevada. Além disso, não é eficaz no controle total de podridões pós-colheita, principalmente as provocadas por *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. (Zambolim *et al.*, 2002; Janisiewicz *et al.*, 2003).

As radiações gama e ultravioleta (UV-C) também são técnicas utilizadas para o controle de podridões pós-colheita de frutas “*in natura*” dentre elas, a uva (Neves *et al.*, 2002; Nigro *et al.*, 2000; Pascholati *et al.*, 2004). Além de

eficaz para o controle de podridões pós-colheita da uva, a aplicação de doses ajustadas de UV-C contribuiu para o aumento do período de conservação dos frutos, prolongando assim o período de armazenamento e, conseqüentemente, o retardamento do amadurecimento (CIA *et al*, 2009). No entanto, a eficiência é limitada já que a radiação UV-C alcança profundidade limitada nos frutos. Além disso, podem ocorrer queimaduras (escaldaduras) resultantes da elevada dosagem necessária para o controle efetivo; o amadurecimento anormal; amolecimento do tecido; perda do sabor, resultando dessa forma em uma baixa aceitação pelo consumidor, além do custo significativo para sua aplicação (Benato, 2002; Capdeville *et al.*, 2002; Zambolim *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que, diante do contexto socioambiental vivenciado no mundo contemporâneo, a busca por alternativas de controle mais rentáveis, saudáveis e sustentavelmente corretas vem se tornando cada vez mais indispensável. O uso sustentável de meios naturais ou ecologicamente seguros deve garantir a produtividade econômica das culturas sem causar danos expressivos ao solo, a água e a qualidade dos alimentos, promovendo assim, a segurança alimentar e a sustentabilidade da agricultura (Andrade *et al.*, 2004).

3.2 Controle Biológico

Camili *et al* (2007), enfatizam que, a proteção de frutos pós-colheita contra podridões tem sido desviada do uso de produtos químicos para várias técnicas alternativas de controle, que garantam a segurança do produto e que não coloque em risco a saúde dos consumidores, minimizando ou substituindo o uso de fungicidas e, ainda assim, prolongando o período de conservação dos frutos a um custo compatível, fazendo emergir a necessidade de desenvolver alternativas de controle de doenças vinculadas ao sistema de manejo, fundamentadas na sustentabilidade, no equilíbrio ecológico e na redução de perdas pós-colheitas.

O conceito básico para controle biológico foi descrito por Cook & Baker em 1983, como a “redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através

de um ou mais organismos que não o homem”. Mais recentemente, um novo conceito foi abordado por Cook (2007), que o descreve como um método de controle fundamentado nas relações ecológicas entre as populações microbianas, e destas populações com o hospedeiro, mais especificamente entre o patógeno, o hospedeiro e seu antagonista ou agente de controle. O conceito evoluiu de tal forma que o controle populacional, o controle biológico de doenças de plantas trata-se da aplicação de processos biológicos, ou de seus produtos, para o controle do processo patogenético, ou a doença (Wisniewski *et al.*, 2007).

Janisiewicz *et al* (2002), relataram que o controle biológico de frutas pós-colheita é o único em que os antagonistas devem ser aplicados diretamente nas possíveis vias de penetração para os patógenos, nichos frequentemente ricos em nutrientes. Segundo Luz (2002), as invasões de feridas nas frutas por patógenos necrotróficos são vulneráveis para o controle biológico e com isso, os antagonistas devem ser aplicados diretamente na área lesionada, podendo reduzir o apodrecimento das frutas significativamente.

A competição por nutrientes e espaço na epiderme pode ser um mecanismo eficaz, já que a maioria dos patógenos invade o fruto em busca de condições favoráveis para sua sobrevivência. Além disso, Janisiewicz *et al* (2000), relatam que vários possíveis mecanismos de biocontrole têm sido sugeridos, incluindo antibiose, parasitismo, indução da resistência e competição por nutrientes e espaço.

Nessa perspectiva, o controle biológico aparece como uma técnica promissora por ser coerente com os princípios ecológicos, através da utilização de agentes biológicos, contribuindo para uma agricultura sustentável com redução da ocorrência de doenças fúngicas de maneira ecologicamente viável. Bettiol & Morandi (2009), relatam que os agentes microbianos constituem uma alternativa viável e eficaz no controle de fitopatógenos na pré e/ou pós-colheita, quando comparados aos diversos fungicidas agrícolas existentes no mercado, buscando atender assim a demanda cada vez mais exigente dos consumidores por produtos naturais saudáveis.

Três fatores indicam ser o controle biológico em pós-colheita viável e passível de exploração: controle das condições ambientais; limitação da superfície de aplicação dos antagonistas aos órgãos comerciáveis; e ser economicamente praticável em condições de armazenamento (Michereff, 1998). No entanto, para que o controle biológico obtenha resultados economicamente viáveis devem-se considerar diversos aspectos que estão interligados, como a intensidade dos mecanismos de defesa natural e a dose de antagonistas / substâncias antimicrobianas naturais aplicadas (Mari & Guizzardi, 1998). Contudo, os agentes de controle biológico possuem limitações, sendo, muitas vezes adequados para patossistemas e condições ambientais específicos.

3.2.1 As leveduras e seu potencial de controle

As leveduras são microrganismos classificados em 90 gêneros e 770 espécies pertencentes às classes *Ascomycetes* e *Basidiomycetes*. (Kurtzman & Fell, 1998; Fleet, 2003), e têm mostrado potencial de controle de podridões de frutos, destacando-se por serem não toxigênicos, possivelmente degradarem micotoxinas produzidas por alguns patógenos e são comumente encontrados na superfície de frutos (Coelho *et al.*, 2003; Coelho, 2005).

As leveduras são caracterizadas como sendo heterotróficos, unicelulares, cujos *habitats* são o solo nu ou com vegetação natural, as superfícies de tecidos de plantas, incluindo flores e frutas. Neste último, se destacam como os principais microrganismos na comunidade microbiana, sendo em sua grande maioria consideradas como aeróbicas obrigatórias, embora algumas sejam anaeróbicas facultativas (Bamforth, 2005). Por serem comumente encontradas em folhas (sendo o filoplano um importante substrato para as leveduras) e frutos, elas possuem um grande potencial para o controle de doenças pós-colheita (Wilson & Wisniewski, 1991).

As condições ambientais favoráveis correspondem a um dos principais fatores que influenciam na sobrevivência dos microrganismos antagônicos após a sua aplicação, limitando seu desempenho no controle de doenças pós-colheita. A tolerância dos agentes de controle a variáveis ambientais é uma

característica importante ao se considerar sua aplicação em campo ou, no caso de patógenos pós-colheita, em ambientes controlados.

Apesar da capacidade de desenvolvimento em condições adversas, quando submetidas às condições de estresses abióticos podem sofrer alterações na estrutura e função, comprometendo a sua viabilidade e eficácia. As condições de estresse ambientais são determinadas por fatores como temperaturas, baixa umidade, o estresse oxidativo, a falta de nutrientes, pH adverso e atividade de água (Teixidó *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2011, 2012, 2013).

De acordo com Torija *et al* (2003), a temperatura afeta diretamente a ecologia microbiana e as reações bioquímicas da levedura. O crescimento das leveduras pode ocorrer sob uma ampla faixa de temperatura variando entre 0-47°C, sendo que a maioria das espécies se enquadra com temperatura ótima na faixa entre 20-30°C (Landell, 2006). Diante das condições de estresse ambiental, quando as leveduras são expostas a um estresse osmótico perdem água dando início a uma série de mecanismos (Sant'ana, 2009). A Umidade relativa também é um fator influenciável, pois quando em condições muito elevada favorece o crescimento dos microrganismos, especialmente daqueles que se encontram na superfície. Além disso, a atividade de água também é um dos principais fatores responsáveis pela prevenção ou limitação do desenvolvimento microbiano.

Segundo Ipollito *et al* (2005), a utilização de antagonistas microbianos com uma maior tolerância ao stress osmótico pode ser crucial para manter o tamanho da população elevada, necessária para exercer a atividade de biocontrole. Para isso, é fundamental compreender os mecanismos de resposta ao estresse microbiano, para buscar maior resistência a condições ambientais desfavoráveis e melhorar as taxas de sobrevivência desses microrganismos (Cañamás *et al.*, 2008). Dessa forma, a tolerância ao estresse abiótico é um atributo essencial para leveduras utilizadas como agentes de biocontrole (Liu *et al.*, 2013).

Para manter frutos e hortaliças de consumo *in natura* em um ótimo padrão de qualidade e sem resíduos químicos, as leveduras vêm sendo os microrganismos preferencialmente mais utilizados, pois se destacam como excelentes antagonistas em alguns estudos e por não serem bons produtores de metabólitos antibióticos, como as micotoxinas que são substâncias altamente tóxicas e conseqüentemente por em risco a saúde do homem (Valdebenito-Sanhueza, 2000).

O controle biológico de doenças pós-colheita por leveduras é uma estratégia promissora para a redução do uso de fungicidas sintéticos (Nunes, 2012). Estes microrganismos ocorrem naturalmente sobre a superfície de frutos e tem sido eficazes como agentes de controle biológico (Nally *et al.*, 2013), atuando de forma promissoras no controle de doenças pós-colheita, principalmente por agir de maneira viável envolvendo vários mecanismos de ação dentre os quais se destacam a competição por nutrientes e espaço, a produção de enzimas hidrolíticas, parasitismo, formação de biofilme e indução de resistência em plantas (Giobbe *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2010, Mari *et al.*, 2012 e Lutz *et al.*, 2013), impedindo a atuação e sobrevivência do patógeno.

Os mecanismos de defesa mais inócuos que o agente de controle pode empregar para o controle de doenças pós-colheitas são competição por espaço e nutrientes e a produção de enzimas extracelulares. Dessa forma, as leveduras podem reduzir a proliferação e desenvolvimento do fungo, mantendo a maior qualidade do fruto para consumo, com menores riscos à saúde (Nunes & Manso, 2011). Entre esses mecanismos, a competição por nutrientes é considerado um importante mecanismo de ação por causa das exigências nutricionais simples de muitas espécies de levedura (Elad & Chet, 1987; Mekbib *et al.*, 2011; Bautista-Rosales *et al.*, 2013).

Algumas leveduras possuem como característica a produção de exotoxinas com atividade antimicrobiana contra outras cepas da mesma espécie, conhecida como caráter '*killer*'. O caráter *Killer* foi relatado pela primeira vez por Makower e Bevan trabalhando com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Buzzini & Martini, 2000). Estes metabólitos podem ter ação contra

fungos filamentosos, bactérias cocóides gram-positivas, entre outros (Polonelli *et al.*, 1993; Golubev, 2006), podendo representar uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo habitat. O potencial de inibir cepas contaminantes indesejáveis apresentados por estas leveduras contribui para o surgimento de expectativas que favoreçam a sua utilização como técnica promissora de biocontrole.

As leveduras com caráter *Killer* podem ser encontradas em várias fontes, com destaque para os locais em que possui alta densidade microbiana, havendo dessa forma uma necessidade de competição ecológica intensiva (Ganter & Starmer, 1992; Golubev *et al.*, 2002; Fredlund *et al.*, 2002; Golubev, 2006). As vantagens que as leveduras com caráter *killer* possuem sobre linhagens sensíveis no ambiente podem explicar sua abundância, uma vez que esse mecanismo pode ser utilizado na competição com outras leveduras e/ou microrganismos.

4. Implantação de controle biológico de podridões pós-colheita no sistema de produção de uva no Submédio do Vale do São Francisco

A substituição de produtos químicos por agentes de controle biológico pode resultar em melhor aceitação dos produtos agrícolas nos mercados interno e externo (Coelho, 2003). No entanto, para a implantação de medidas corretas de controle, é necessário conciliar todas as etapas de produção seguindo até o consumidor final, iniciando com as práticas culturais corretas, seguidas de uma boa nutrição da planta durante todo ciclo; realização de podas no período determinado; cuidados básicos durante o desenvolvimento da planta para não favorecer as doenças; minimização do controle químico atendendo as normas do controle ambiental; e colheita no período correto de maturação do fruto.

Ao contrário de outras frutas e hortaliças, a uva é frágil, não permitindo manuseio pós-colheita que permitam realizar a assepsia das bagas. As etapas comumente aplicadas nos packing-house para manga e outras frutas, como a lavagem, sanitização e tratamento térmico, para a uva não são aplicáveis.

Assim, as estratégias de controle requerem a aplicação de produtos ainda na fase pré-colheita. Isto implica no desenvolvimento de estratégias que considerem o número e épocas de aplicação e, no caso de controle biológico, a seleção de antagonistas capazes de tolerar as condições de campo ou de estratégias e formulações que aumentem sua viabilidade após a aplicação.

Aplicações de agentes de controle durante a fase pré-colheita podem evitar as infecções quiescentes visto que os microrganismos antagonistas interagem com os frutos, estabelecendo-se preferencialmente na epiderme e outros sítios, e competindo com o agente patogênico, reprimindo sua atividade e conseqüentemente protegendo de infecções subseqüentes (Zhao *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2014). Alguns trabalhos já demonstraram o potencial de biocontrole com aplicações pré-colheita utilizando leveduras, como no caso da aplicação de *Cryptococcus laurentii* para o controle de podridões pós-colheita em cereja (Tian *et al.*, 2004), uva (Meng *et al.*, 2010) e morango (Wei *et al.*, 2014).

No atual estágio de disponibilidade de produtos será necessário a integração de práticas de controle químicos e alternativos, incluindo produtos biológicos, e de controle cultural que permita reduzir a pressão de inóculo, como a remoção de resíduos de poda. É provável que a incorporação de agentes de controle biológico às estratégias de controle dos produtores seja a alternativa mais aceitável dentro dos atuais sistemas de produção em vigência.

Durante o período pós-colheita, os cuidados devem persistir no manuseio, na seleção do fruto (tendo cuidado para não ferir o fruto e facilitar a entrada do patógeno), em deixar sob temperaturas determinadas como a principio em condições de baixas temperaturas (redução da respiração, transpiração e produção de etileno) e umidade relativa para não deixar os frutos sob condições favoráveis de doenças, evitando que outras doenças se iniciem, além da preocupação que possa causar tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic. 948p.

AGROSTAT - (Banco de dados sobre comércio exterior). 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br/internacional

ANDRADE LN; MICHEREFF FILHO M; NUNES MUC; ALMEIDA SN; SANTOS MS. 2004. Seleção de produtos para o controle alternativo de doenças vegetais no consórcio repolho x coentro em sistema orgânico de produção. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 22, n.2, 375-376.

ARTÉS-HERNÁNDEZ F; TOMÁS-BARBERÁN FA. 2006. Modified atmosphere packaging preserves quality of SO₂-free 'Superior seedless' table grapes. *Postharvest Biology and technology*, Amsterdam, v. 39, 146-154.

BAMFORTH CW. 2005. The science underpinning food fermentations. *Food, Fermentation and Micro-organisms*. Blackwell Science Ltd, chapter 1. 1-38.

BARKAI-GOLAN R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control. *Elsevier Science*. Amsterdam. 418p.

BATTA YA. 2007. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Postharvest Biology and Technology*, Washington, v.43, n.1, 143-150.

BAUTISTA-ROSALES PU; CALDERON-SANTOYO M; SERVIN-VILLEGAS R; OCHOA-ALVAREZ NA; RAGAZZO-SANCHEZ JA. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological control*, v.65, 293–301.

BENATO EA. 2002. Principais doenças em frutas pós-colheitas e métodos alternativos de controle como potencial de indução de resistência. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2. *Anais...* Lavras-MG: NEFIT/UFLA, p.139-182.

BENATO EA. 2003. Tecnologia, fisiologia e doenças pós-colheitas de uvas de mesa. In: POMMER CV. *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e Mercado*. Porto Alegre: Cinco continentes, p.778.

BETTIOL W. MORANDI MAB. 2009. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva*. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente. 341p.

BETTIOL W; GHINI R. 1995. Controle Biológico In: BERGAMINHO FILHO A; KIMATI H; AMORIM L. (eds). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1 cap.36, p. 717-728.

BLUNDEN G; ROCH OG; ROGERS DJ; COKER RD; BRADBURN N; JOHN AE. 1991. Micotoxins in food. *Medical Laboratory Sciences*, London, v.48, n.4, 271-282.

BUZZINI P; MARTINI A. 2000. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 46, 607-611.

CAMARGO RB; PEIXOTO NA; TERAO D; ONO EL; CAVALCANTI LS. 2011. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no Pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. *Revista Caatinga*, Mossoró, v.24, n.1, 15-19.

CAMARGO RB; TERAO D; PEIXOTO AR; ONO EO; CAVALCANTI LS; COSTA RM. 2012. Atmosfera modificada na conservação da qualidade de uva 'Thompson Seedless' e na redução da podridão de *Aspergillus*. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.3, 216-222.

CAMARGO UA; OLIVEIRA PRD. 2001. Melhoramento genético. In: LEÃO PCS. (ed). *Uva de mesa: produção – aspectos técnicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 14-19.

CAMILI EC; BENATO EA. 2005. *Doenças da uva. Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.26, 228, 50-55p.

CAMILI EC; BENATO EA; PASCHOLATI SF; CIA P. 2007. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, 215-221.

CAÑAMÁS TP; VIÑAS I; USALL J; CASALS C; SOLSONA C; TEIXIDÓ N. 2008. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology*, v.49. 86–95.

CANTILLANO RFF. 2006. Fisiologia e manejo na colheita e pós-colheita de morangos. In: CARVALHO SP (Coord.). *Boletim do Morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico*. Belo Horizonte: FAEMG, p. 160.

CAPDEVILLE G; WILSON CL; BEER SV; AIST JR. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. *Phytopathology*, v.92, n.8, 900-908.

CARVALHO SP; SOBRINHO RR. 2002. A cultura da Videira. Informação Tecnológica. Horticultura Irrigada.

CAVALCANTI LS; DI PEIRO RM; CIA P; PASCHOLATI SF; RESENDE MLV; ROMEIRO RS. 2005. *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 263p.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. 2013. USP/Esalq *Hortifruti Brasil*. Ano 12, n.130. 54p.

CHITARRA MIF; CHITARRA AB. 2005. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: Ed. da UFLA, 783p.

CIA P; BENATO EA; VALENTINI SRT; ANJOS VDA; PONZO, FS; SANCHES J; TERRA MM. 2009. Radiação ultravioleta no controle de pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em uva "Niagara Rosada". *Bragantina*, Campinas, v.68, n.4, 1009-1015.

COELHO AR. 2005. *Controle de Penicillium expansum/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita*. Londrina-PR: Universidade Estadual de Londrina. 122p. (Tese Doutorado).

COELHO AR; HOFFMANN FL; HIROOKA EY. 2003. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectiva de aplicação e segurança alimentar. *Semina: Ciências Agrárias*, v.24, n.2, 337-538.

COOK R; BAKER KF. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. *American Phytopathological Society*, St Paul, Minnesota, 539p.

COOK RJ. 2007. Model system in the science of biological control. In: VINCENT C; GOETTEL MS; LAZAROVITS G. *Biological control: A global perspective*. CAB International, Wallingford, UK. p. 399–414.

DROBY S. 2006. Yeast *Metschnikova fruticola* NRRL Y-30752 for inhibiting deleterious microorganisms on plants. *United State Patente*, nº 6.994.849 B2, 22p.

DRUSCH S; RAGAB W. 2003. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *Journal Food Protection*, Ames, v.66, 1514-1527.

ELAD Y; CHET I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium damping-off* by bacteria. *Phytopathology*, v.77, 190–195.

FERREIRA EA; REGINA MA; CHALFUN NNJ; ANTUNES LEC. 2004. Antecipação de safra para videira 'Niagara Rosada' na região do sul do Estado de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.28. 1221-1227.

FLEET GH. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, v.86, n (1-2), 11–22.

FREDLUND E; DRUVEFORS U; BOYSEN ME; LINGSTEN KJ; SCHNURER J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research*. 2: 395-402.

GALLOTTI GJM; GRIGOLETTI JÚNIOR A; SONEGO OR. 2002. Controle das doenças da videira. In: ZAMBOLIM L; VALE FXR; MONTEIRO AJA; COSTA H. *Controle de doenças de plantas: fruteiras*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, v.2, 939-1021.

GANTER PF; STAMER WT. 1992. Killer fator as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. *Ecology*. v.73. 54-67.

GIOBBE S; MARCEDDU S; SCHERM B; ZARA G; MAZZARELLO VL; BUDRONI M; MIGHELI Q. 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research*, v.7, 1389–1398.

GOLUBEV W; PFEIFFER I; GOLUBEVA EW. 2002. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. *FEMS Microbiology Ecology*. v.40. 151-157.

GOLUBEV WI. 2006. Antagonistic interactions among yeasts. *The Yeasts Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Rosa CA & Peter G, eds), Springer. Berlin, germany, 197-219.

HUSSEIN SH; BRASEL JM. 2001. Toxicology, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v.167, 101-134.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola Municipal*. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=27&i=P>> Acesso em 21 Jan. 2014

IBRAVIN-Instituto Brasileiro do Vinho. Regiões produtoras de vinho. 2010. Bento Gonçalves. Disponível em: <<http://www.ibraevin.org.br/regioesprodutoras.php>> Acesso em 8 Mai 2013.

IPPOLITO A; SCHENA L; PENTIMONE I; NIGRO F. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, v.36. 245–252.

JANISIEWICZ WJ; KORSTEN L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, 411–441.

JANISIEWICZ WJ; LEVERENTZ B; CONWAY WS; SAFTNER RA; REED AN; CAMP MJ. 2003. Control of bitter rot and blue mold of apples by integration heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, Lérida, v.29, 129-143.

JANISIEWICZ WJ; TWORKOSKI TJ; SHARER C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Biological control*, v.90. 1196-1200.

KADER AA. 2002. *Postharvest technology of horticultural crops*. 3.ed. Oakland: Division of Agricultural and Natural Resources, University of California, 535p.

KURTZMAN CP; FELL JW. 1998. *The Yeast: A Taxonomic study*. Amsterdam. Elsevier, 1016p.

LANDELL MF. 2006. *Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de itapuã-Viamão/RS*. Porto Alegre-RS. 136p. (Dissertação mestrado).

LEÃO PCS; MAIA JDG. 1998. Aspectos culturais em viticultura tropical uvas de mesa. *Informe Agropecuário*, v.19. 34-39.

LIMA MF. 2012. *Uva de Mesa: Fitossanidade*. 2. ed. Rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 111p.

LIMA MF; LOPES DB; TAVARES SCC de H; TESSMANN DJ; MELO NF. 2009. Doenças e alternativas de controle. In: SOARES JM; LEAO PC de S. (Ed.). *A vitivinicultura no Semiárido brasileiro*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Semi-Árido. p. 543-596.

LIU J; SUI Y; WISNIEWSKI M; DROBY S; LIU Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, v.167. 153–160.

LIU J; WISNIEWSKI M; DROBY S; NORELLI J; HERSHKOVITZ V; TIAN S; FARRELL R. 2012. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology*. v.80, 578–590.

LIU J; WISNIEWSKI M; DROBY S; TIAN S; HERSHKOVITZ V; TWORKOSKI T. 2011. Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. *FEMS Microbiology Ecology*. v.76, 145–155.

LUTZ MC; LOPES CA; RODRIGUEZ ME; SOSA MC; SANGORRIN MP. 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology*, v.164, 166–172.

LUZ WC. 2002. Avaliação dos tratamentos biológicos e químicos na redução de Patógenos em sementes de trigo. Embrapa, Passo Fundo, RS. *Fitopatologia brasileira*, v.28. 093-095.

MARI M; GUIZZARDI M. 1998. The postharvest phase: emerging Technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*, v.26, 59-66.

- MARI M; MARTINI C; SPADONI A; ROUISSI W; BERTOLINI P. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, v.73, 56–62.
- MEKBIB SB; REGNIER TJC; KORSTEN L. 2011. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. *Tropical Plant Pathology*, v.36, 233–240p.
- MELLO LMR. 2007. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2006. *Artigo técnico* disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br>. Acessado em: 18 setembro 2013.
- MENG XH; QIN GZ; TIAN SP. 2010. Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage. *LWT - Food Science and Technology*, v.43. 596–601.
- MICHEREFF SJ. 1998. Controle biológico de doenças de plantas. *Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco*, 6p.
- MORANDI MAB; BETTIOL W; GHINI R. 2005. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: VENZON M; PAULA JUNIOR TJ; PALLINI A. (Org.). *Controle alternativo de pragas e doenças*. 1 ed. Vicosa: EPAMIG, p. 247-268.
- NALLY MC; PESCE VM; MATURANO YP; TORO ME; COMBINA M; CASTELLANOS DE FIGUEIROA LI; VAZQUEZ F. 2013. Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biology and Technology*, v.86, 456–462.
- NEVES LC; MANZIONE RL; VIEITES RL. 2002. Radiação gama na conservação pós-colheita da nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica*) frigoconservada. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v.24, 676-679.
- NIGRO F; IPPOLITO A; LATTANZIO V; VENERE DDI; SALERNO M. 2000. Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. *Journal of Plant Pathology*, Bologna. v.82, n.1. 29-37.
- NUNES C; MANSO T. 2011. *Metschnikowia andawensis* as a new biocontrol agente of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, v.61. 64-71.
- NUNES CA. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology* 133:181-196.
- OLIVEIRA SMA; TERAIO D; DANTAS SAF; TAVARES SCCH. 2006. Patologia pós-colheita. In: OLIVEIRA SMA; TERAIO D; DANTAS SAF; TAVARES SCCH. *Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 855p.

PASCHOLATI SF; CIA P; BENATO EA; CAMILI EC. 2004. O fenômeno da indução de resistência e o controle de doenças de pós-colheita. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2. *Anais...* Brasil, p. 2-6.

PEARSON RC; GOHEEN AC. (Ed.). 1988. Compendium of grape diseases. St. Paul: American Phytopathological Society, 92p.

PEDRO JÚNIOR MJP; SENTELHAS PC. 2003. Clima e produção. In: POMMER CV (ed.). *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, cap.3, p. 63-108.

PIZARRO CAC. 2009. *Avaliação de morangos submetidos a resfriamento rápido e armazenamento em diferentes embalagens e temperaturas*. Campinas: Faculdade de Engenharia Agrícola – UNICAMP. 74p. (Tese Doutorado).

POLONELLI L; CONTI S; GERLONI M; MAGLIANI W; CASTAGNOLA M; LUCAS AP. 1993. Acerola: suco da saúde conquista o mundo inteiro. *Manchete Rural*, Rio de Janeiro, v.5, n.69, 10-13.

POMMER CV (ed.). 2003. *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 109-294p.

POMMER CV; MAIA ML. 2003. Introdução, história, importância, custos. In: POMMER CV (ed.). *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 11-35.

SANT'ANA GS. 2009. *Resposta ao estresse ácido em Saccharomyces cerevisiae e efeito protetor do íon sódio na morte celular induzida por ácido*. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto. 130p. (Tese Doutorado).

SENTELHAS PC. 1998. Aspectos climáticos para a viticultura tropical. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.19, n.194. 9-14.

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

SILVA PCG; CORREIA RC. 2004. Embrapa Semi-Árido: Cultivo da videira- Caracterização social e econômica da videira. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/socioeconomia.htm>. Acesso em: 7 dezembro. 2012.

SILVEIRA NSS; MICHEREFF SJ; SILVA ILSS; OLIVEIRA SMA. 2005. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. *Caatinga*, Mossoró, v.18, n.4, 283-299. '

SNOWDON A. 2010. A color atlas of post-harvest disease and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1: General introduction and fruits. London: *Manson Publishing*, 302p.

SYLOS CM; RODRIGUEZ-AMAYA DB. 1999. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, Basingstoke, v.16, 71-74.

TAVARES SCCH; SILVA ILSS. 2006. Doenças das uvas. In: OLIVEIRA SMA; TERAO D; DANTAS SAF; TAVARES SCCH (Eds.) *Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 821-855.

TEIXIDÓ N; VIÑAS I; USALL J; MAGAN N. 1998. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. *Mycological Research*, v.102, 1409–1417.

TERAO D; TAVARES SCCH; SILVA ILSS; SARAIVA ACM; CHOUDHURY MM. 2007. Patologia pós-colheita de uva. In: LIMA MAC (ed.). *Uva de mesa: pós colheita*. 2 ed. Brasília-DF. Embrapa Informação Tecnológica. p. 49-62.

TIAN SP; QUIN GZ; XU Y; WANG YS. 2004. Application of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Acta Botanica Sinica*, v.46, n11. 1324-1330.

TORIJA MJ; ROZES N; POBLET M; GUILLON JM; MAS A. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, v.80, 47-53.

TRINDADE LC. 2007. *Diagnose Molecular do Cancro Bacteriano da Videira Causado por Xanthomonas campestris pv. viticola*. Brasília: Universidade de Brasília. 184p. (Tese Doutorado).

VALDEBENITO-SANHUEZA RMV. 2000. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO IS; AZEVEDO JL (ed.). *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3, cap.2, p. 41-56.

VIRET O; KELLER M; JAUDZEMS VG; COLE FM. 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers : light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology*, v.94, 850-857.

WEI Y; MAO S; TU K. 2014. Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry, *Biological Control*, v.73. 68-74.

WILSON CL; WISNIEWSKI ME; BILES CL; McLAUGHLIN R; CHALUTZ E; DROBY E. 1991. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection*, v.10, 172-177.

WISNIEWSKI M; WILSON C; DROBY S; CHALUTZ E; EL GAHOUT A; STEVENS C. 2007. Postharvest biocontrol: New concepts and applications, In: VINCENT C; GOETTEL MS; LAZAROVITS G. *Biological Control: A global perspective*. CAB International, Wallingford, UK, p. 262 – 273.

YIANNIKOURIS A; JOUANY JP. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, Saint-Genès-Champanelle, v.51, 81-99.

ZAMBOLIM L; COSTA H; VENTURA JA; VALE FXR. 2002. Controle de doenças em pós-colheita de frutas tropicais. In: ZAMBOLIM L. (Ed.) *Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas*. Viçosa. UFV. p. 443- 511.

ZHANG D, SPADARO D, GARIBALDI A, GULLINO ML. 2010. Efficacy of the antagonista *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*, v.54, 172–180.

ZHAO Y; WANG R; TU K; LIU K. 2011. Efficacy of preharvest spraying with *Pichia guilliermondii* on postharvest decay and quality of cherry tomato fruit during storage. *African Journal of Biotechnology*, v.10(47), 9613-9622.

6. OBJETIVO

Selecionar leveduras e definir uma estratégia de uso para a aplicação de leveduras antagonistas visando o controle biológico e resfriamento no manejo de podridões pós-colheita em uva causada por *Alternaria alternata* e *Aspergillus niger* no Submédio do Vale São Francisco.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial de isolados de leveduras para o controle de podridões causadas por *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*, diante da sua resistência intrínseca a temperatura e baixa disponibilidade de água.

Avaliar o potencial de isolados de leveduras quanto ao número de aplicações, as aplicações em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto e o resfriamento no manejo de podridões pós-colheita em uva.

CAPÍTULO I

UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS NO MANEJO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM UVA

RESUMO

O Submédio do Vale do São Francisco se destaca no cenário nacional como o maior produtor e exportador de uvas finas de mesa no Brasil. Entretanto, alguns aspectos da pós-colheita podem restringir a comercialização, dentre os quais se destacam as doenças fúngicas. Algumas alternativas de controle são utilizadas na tentativa de reduzir a atividade desses patógenos e o controle biológico é considerado uma alternativa promissora por fazer emergir uma agricultura sustentável fundamentada em princípios ecológicos. Nesse contexto, as leveduras têm apresentado relevante potencial de biocontrole. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de leveduras previamente selecionados quanto ao seu potencial de controle de podridões causadas por *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*, considerando a sua resistência intrínseca a temperatura e baixa disponibilidade de água. Foram selecionados isolados de leveduras a partir do efeito dos isolados no controle de podridões pós-colheita com inoculação de leveduras padronizadas em 10^8 céls.mL⁻¹ e 24 hrs depois 10^6 esporos.mL⁻¹ dos patógenos; a tolerância à baixa atividade de água (a_w) em meio de cultivo utilizando PEG6000 com potenciais osmóticos (0, -2, -5, -10, -15, -20 MPa) e diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35 e 40°C); a sobrevivência das leveduras à diferentes condições de UR(30, 40, 50, 60, 80%) e a eficiência de controle de podridões pós-colheita causada por *A. niger* e *A. alternata* pela aplicação prévia de isolados de levedura. Os isolados L7K, L9, L60K e LF apresentaram elevada eficiência de controle de podridões pós-colheita causada pelo fungo *Aspergillus niger*, e os isolados L7K e LF para o fungo *Alternaria alternata* diferindo significativamente da testemunha. Os isolados L10, L7K e LF apresentaram faixa ótima de crescimento em torno de 25 a 30°C tolerando até 35°C e o L9 com crescimento ótimo em torno de 20°C e tolerância até 30°C. O isolado L7K se destacou sobrevivendo a partir de 40% de Umidade Relativa, apresentando o melhor crescimento quando exposto a umidade relativa mais elevada 60-80%. Houve efeito significativo da aplicação prévia de leveduras sobre a severidade dos cachos apresentando eficiência de controle de podridões superior a 52% para os isolados LF, L7K e L10 em *Alternaria alternata* e superior ou igual a 55% para LF, L7K, L10 e L9 para *Aspergillus niger*.

Palavras chaves: Doenças pós-colheita, leveduras antagonista, estresse ambiental, Atividade microbiana.

ABSTRACT

The São Francisco Valley stands out on the national scene as the largest producer and exporter of fine table grapes in Brazil. However, some aspects of post-harvest may restrict the marketing, among which stand out the fungal diseases. Some control alternatives are used in an attempt to reduce the activity of these pathogens and biological control is considered a promising alternative to emerge for sustainable agriculture based on ecological principles. In this context, the yeasts have shown significant potential for biocontrol. This study aimed to evaluate the potential of yeasts isolates for tolerance to abiotic stresses and their effect during post-harvest applications to control postharvest decay in grape caused by *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in the Lower Basin of the San Francisc. Yeasts isolates were selected from the effect of the isolates in controlling postharvest rot inoculated with yeasts standardized at 10^8 céls.mL⁻¹ and 24 hrs after 10^6 esporos.mL of pathogens; Tolerance to low water activity (*a_w*) in culture medium using PEG6000 with osmotic potentials (0 , -2 , -5, -10, -15 , -20 MPa) and different temperatures (20 , 25, 30, 35 and 40 ° C); The survival of yeasts at different RH conditions (30 , 40 , 50 , 60 , 80 %) and control efficiency of postharvest decay caused by *A. niger* and *A. alternata* by prior application of yeasts isolates. The L7K, L9, L60K and LF isolates showed high efficiency control postharvest caused by the fungus *Aspergillus niger* rot, and L7K and LF isolates for the fungus *Alternaria alternata* differing significantly from the control. The L10 , L7K and LF isolates showed optimal growth range of around 25 to 30 ° C tolerating 35 ° C and L9 with optimal growth at around 20 ° C and tolerance to 30 ° C. The isolated L7K stood surviving from 40 % RH, showing the best growth when exposed to higher relative humidity of 60-80 %. There was a significant effect of prior application of yeasts on the severity of presenting bunches control efficiency of greater than 52 % for LF, L7K and L10 in *Alternaria alternata* and isolates higher or equal to 55 % for LF , L7K , L9 and L10 to rot *Aspergillus niger*.

Keywords: Postharvest diseases, antagonistic yeasts, environmental stress, microbial activity.

1. INTRODUÇÃO

O Submédio do Vale do São Francisco se destaca no cenário nacional como o maior produtor e exportador de uvas finas de mesa no Brasil, com mais de 10 000 hectares de área cultivada (Lima, 2012). No entanto, apesar do elevado nível tecnológico do manejo da cultura, alguns aspectos relacionados à pós-colheita podem restringir a comercialização de uvas, principalmente nos casos em que é necessário o armazenamento por longo período. Isto se dá em virtude da queda na atividade fisiológica, da sensibilidade à desidratação, o desgrane e de infecções fúngicas (Artés-Hernandez e Tomás-Barberà, 2006).

As infecções quiescentes mais frequentes são causadas pelos fungos *Alternaria alternata* Fr. Keissl., *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz & Sacc., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. e *Botrytis cinerea* Pers., enquanto as infecções adquiridas surgem a partir do manejo incorreto do fruto durante a etapa pós-colheita ou na etapa de transporte e armazenamento expressas pelos gêneros: *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* Van Tiegh, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Lind.), entre outros destacados com sintomas de podridões (Oliveira et al., 2006).

Algumas alternativas de controle são utilizadas na tentativa de reduzir a atividade desses patógenos e minimizar a ocorrência de podridões nos frutos. Tradicionalmente, o controle de doenças pós-colheita de frutos baseia-se principalmente na utilização de fungicidas sintéticos (Li et al., 2011). No entanto, há uma grande preocupação com os danos que podem causar tanto para o meio ambiente quanto para a saúde do homem, principalmente para a aplicação pós-colheita em produtos para consumo *in natura*.

O controle biológico utilizando antagonistas microbianos tem emergido como uma abordagem promissora para o controle de podridões, seja aplicado isoladamente ou como parte de uma estratégia de controle integrado para reduzir o uso de fungicidas sintéticos (Fravel, 2005; Tian, 2006). Entre as alternativas propostas para o controle biológico, as leveduras destacam-se

como potenciais agentes, as quais ocorrem naturalmente sobre a superfície de frutos e tem sido eficazes (Nally et al., 2013), além de possuírem vários mecanismos de ação como a competição por nutrientes e espaço, a antibiose, a produção de enzimas hidrolíticas, parasitismo, formação de biofilme e indução de resistência em plantas (Giobbe et al., 2007; Zhang et al., 2010; Mari et al., 2012; Lutz et al., 2013).

A aplicação prévia pode melhorar o sistema biológico, porque permite ao antagonista uma maior interação com o agente patogênico, bem como a colonização dos tecidos antes da chegada do patógeno (Wei et al., 2014). No entanto a tolerância às condições ambientais desfavoráveis é uma das principais características que interferem na eficiência de controle de doenças pelos diferentes agentes microbianos. As principais variáveis que afetam a colonização e a eficiência de controle são a temperatura, baixa umidade relativa, radiação UV, estresse oxidativo, a falta de nutrientes, pH adverso e atividade de água (Teixidó et al., 1998; Liu et al., 2011, 2012, 2013).

Dessa forma, é fundamental compreender os mecanismos microbianos de resposta ao estresse, para buscar maior resistência a condições ambientais desfavoráveis e melhorar as taxas de sobrevivência desses microrganismos (Cañamás et al., 2008). Por isso, a tolerância ao estresse abiótico é um atributo essencial para leveduras utilizadas como agentes de biocontrole (Liu et al., 2013).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de leveduras previamente selecionados quanto ao seu potencial de controle de podridões causadas por *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*, considerando a sua resistência intrínseca a temperatura e baixa disponibilidade de água.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de leveduras LF, L9, L7K, L60K, L7, L8, L3A e L10 utilizados nos experimentos, foram obtidos a partir de isolamento de frutas cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco e são mantidos na coleção de

microrganismos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido, e foram previamente selecionados quanto ao potencial de controle biológico de podridões pós-colheita de frutas. Os fungos *Alternaria alternata* e *Aspergillus niger* são oriundos da coleção de fungos patogênicos do Laboratório de Patologia Pós-Colheita da Embrapa-Semiárido, tendo sido isolados de frutos sintomáticos do polo Juazeiro-BA/Petrolina-PE.

Cultivo, produção de inóculo e preparação de suspensão das leveduras

As leveduras foram cultivadas em meio de cultura líquido SD-Y (Peptona 2,0%, extrato de levedura 1,0%) em agitador orbital a 120 RPM por 72h, a 27°C e fotoperíodo de 12h. Após o período de crescimento, o caldo de cultivo foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min, e resuspenso em NaCl 0,8%(p/v) por 2 vezes para eliminação de resíduos do meio de cultura. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 100µl da suspensão e diluído em água esterilizada (1:10 v/v) para contagem em câmara de Neubauer. As suspensões foram padronizadas a 10^8 céls.mL⁻¹.

Preparação das suspensões de inóculo dos patógenos

Os patógenos foram cultivados por 15 dias, em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) a 25°C com fotoperíodo 12h. Após máximo crescimento, adicionou-se 3 mL de Triton X-100 0,05% à superfície do meio e os conídios foram removidos com o auxílio da Alça de Drigalsk. As suspensões foram padronizadas a 10^6 esporos.mL⁻¹ com auxílio de câmara de Neubauer.

Seleção de isolados de leveduras para o controle de podridão pós-colheita causada por *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*.

Frutos de uva var. Sugaone foram adquiridos no mercado local e encaminhados ao laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido para serem utilizados no experimento de controle de podridão pós-colheita. Os cachos foram selecionados para padronização da maturação e as bagas foram individualizadas, mantendo-se um fragmento do pedicelo. Posteriormente, passaram pelo processo de desinfestação utilizando álcool etílico 70%,

hipoclorito de sódio (NaOCl 1,0%) e lavagens sucessivas em água destilada esterilizada para remoção de resíduos.

Em seguida, foram realizados pequenos ferimentos com furador de 5 mm de profundidade nas bagas. As suspensões de leveduras foram padronizadas para 10^8 céls/mL⁻¹ e pulverizadas nas bagas onde permaneceram por 24 horas em condições de 25°C na sala de incubação. Após esse período foi adicionada uma alíquota de 20 µl da suspensão do patógeno com 10^6 esporos.mL⁻¹ em cada ferimento, sendo, em seguida, levadas para sala de incubação onde foram mantidas durante todo o processo de avaliação. O tratamento testemunha recebeu apenas a inoculação do patógeno e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos constituído por oito isolados de leveduras com três repetições. A parcela experimental foi formada por dez bagas individualizadas e os dados obtidos foram avaliados pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

O cálculo de eficiência de controle foi realizado em função do tratamento controle utilizando a equação: $Eficiência\ Controle\ (\%) = \frac{(C_i - T_i)}{C_i} \times 100$, na qual C_i equivale à severidade da podridão no tratamento controle, e T_i é a severidade nos demais tratamentos.

Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à temperatura e baixa atividade de água (a_w), em meio de cultivo

A avaliação da tolerância à baixa atividade de água (a_w) foi realizada utilizando os isolados L9, L10, L7K e LF com base em um gradiente de concentrações de Polietilenoglicol (PEG) 6000: 0, 119,6g/L, 202,2g/L, 295,7g/L, 380,53g/L e 428,38g/L, equivalentes aos potenciais osmóticos de 0, -2, -5, -10, -15, -20 MPa (Villela et al., 1991). As diferentes massas de PEG6000 foram adicionadas a meio BSM+Y (basal salt médium + yeasts) (Glucose 30g/L, K₂HPO₄ 1,0g/L, KCl 0,5g/L, MgSO₄.7H₂O 0,5g/L, NaNO₃ 3,g/L, FeSO₄.7H₂O 0,01g/L, Extrato de Levedura 5,0g/L). Em seguida, os frascos contendo o meio de cultivo foram inoculados com suspensões de leveduras de forma a alcançar 10^3 cels.mL⁻¹.

No segundo experimento, após a inoculação em meio BSM+Y os isolados L7K, L9, L10 e LF foram incubados em estufa BOD com diferentes temperaturas: 20, 25, 30, 35 e 40°C. O período de crescimento foi de 72 horas para os isolados, exceto para LF que foi incubado por 96 horas, já que seu crescimento é mais lento. O experimento foi realizado em duplicata, os dados obtidos transformados em \log_{10} e a avaliação do crescimento das leveduras foi realizada em contagem em câmara de Neubauer.

Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à baixa umidade relativa após aplicação em frutos.

O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a correlação entre a tolerância à baixa a_w em meio de cultivo e a capacidade de colonização da superfície de bagas de uva em baixa UR do ar. Para tanto, as leveduras foram avaliadas em laboratório quanto à tolerância a baixa UR utilizando bagas destacadas de uva tratadas com suspensões dos isolados LF, L7K, L9, L10 de 10^8 céls.mL⁻¹. Para obtenção das diferentes URs foram utilizadas soluções concentradas de diferentes sais em frascos hermeticamente fechados, conforme descrito na tabela (Winston e Bates 1960). Após a adição das soluções, os frascos foram mantidos com 100g de sílica gel por 24 horas, exceto aquele contendo água destilada, que a seguir foi removida e permaneceu por mais 24h para estabilização da UR do ar interna.

Tabela 1 – Estabilidade da UR do ar interna utilizando diferentes soluções concentradas de diversos sais para avaliação da tolerância dos isolados de levedura a baixa umidade relativa.

Componentes	U.R (%)
Sílica gel azul	30%
Solução 200 g/L MgCl ₂	40%
Solução Glicerol 60%	50%
Solução saturada de MgCl ₂	60%
Água destilada	80%

Procedimentos experimentais

Após a coleta em campo, as bagas foram individualizadas mantendo fragmento do engaço e evitando feridas. Passaram pelo processo de desinfestação superficial utilizando etanol/NaOCl, e receberam pulverização com suspensões de leveduras contendo 10^8 céls.mL⁻¹, sendo transferidas para os frascos previamente preparados. A UR do ar interna foi continuamente monitorada utilizando um psicrômetro digital ao longo do experimento.

O número de células culturáveis à superfície das bagas foi avaliado pela ressuspensão em solução contendo surfactante. Ao final do período as bagas foram colocadas em recipientes com solução de Triton X-100 0,05%, e agitadas por 30 min em agitador orbital a 120 rpm. A suspensão obtida sofreu diluição serial (10X), e alíquotas de 100µl foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsk. As placas foram incubadas a 27°C por 24h, e submetidas à contagem de colônias.

O experimento consistiu de 4 tratamentos (LF, L7K, L9, L10), com três repetições e utilizando oito bagas por tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos foram transformados utilizando a equação $\log_{10}X$ de forma a obter uma distribuição lognormal (Loper, 1984).

Avaliação da eficiência de controle de podridões pós-colheita em uva var. Sagraone

A avaliação da eficiência de controle de podridões foi realizada utilizando os isolados LF, L7K, L9, L10. Os cachos de uva de var. Sagraone foram selecionados e padronizados, passando em seguida pelo processo de desinfestação utilizando álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio (NaOCl 1,0%) e lavagens sucessivas em água destilada esterilizada para remoção de resíduos.

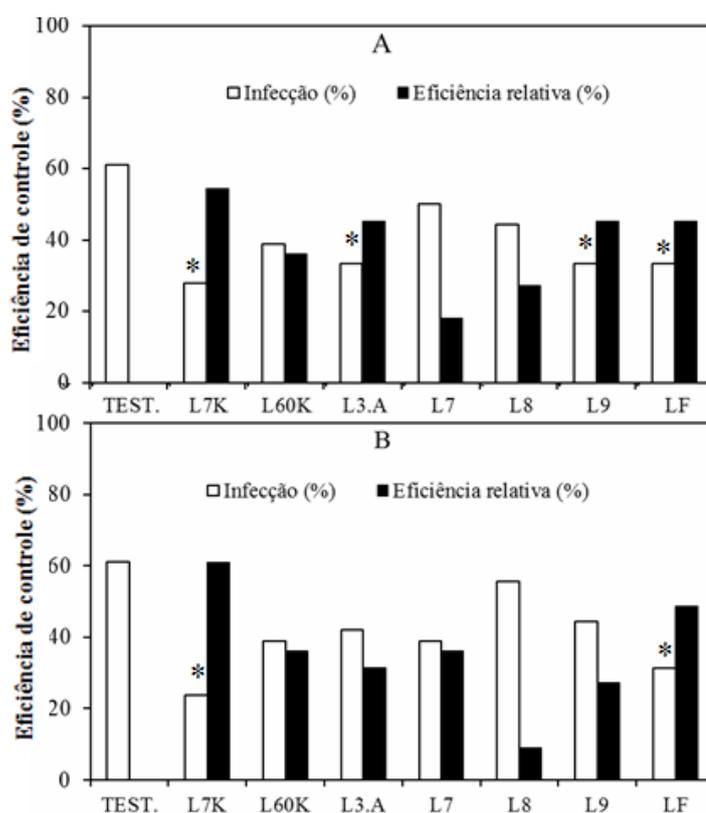
Após desinfestação, os cachos foram pulverizados com suspensões de leveduras padronizadas a 10^8 céls.mL⁻¹ conforme descrito anteriormente, e

permaneceram por 24 horas em condições de 25°C na sala de incubação. Após esse período, os cachos foram pulverizados com a suspensão do patógeno com 10⁶ esporos.mL até molhamento do cacho, sendo, em seguida, levadas para sala de incubação onde foram mantidas durante todo o processo de avaliação em recipientes isolados. O tratamento testemunha recebeu apenas a inoculação do patógeno e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito cachos por parcela, com 3 repetições por tratamento.

3. RESULTADOS

Seleção de isolados de leveduras para o controle de podridões pós-colheita causadas por *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*.

Houve efeito significativo da aplicação de leveduras sobre a incidência de podridão de bagas de uva var. Sagraone inoculadas artificialmente com *A. niger*, quando comparados à testemunha pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). Os isolados L7K, L9, L3A e LF apresentaram eficiência de controle igual ou superior a 50% (Figura 1A). Quando inoculados com *A. alternata*, apenas os isolados L7K e LF se diferenciaram do tratamento testemunha, com eficiência de controle de 60 e 52%, respectivamente (Figura 1B). A partir destes resultados, apenas os isolados L7K, L9, L3A e LF foram selecionados para a continuidade dos estudos.



Asteriscos sobre as colunas indicam tratamentos com incidência significativamente diferente da testemunha pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$)

Figura 1 – Efeito da aplicação de isolados de levedura em uva var. Sugaone, sobre a incidência de podridão causada por *Aspergillus niger* (A) e *Alternaria alternata* (B), 10 dias após a inoculação.

Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à temperatura e baixa atividade de água (a_w), em meio de cultivo

Os isolados L10, L7K e LF apresentaram faixa ótima de crescimento em torno de 25 a 30°C, tolerando até 35°C e decaindo rapidamente até 40°C. Já o isolado L9 apresentou crescimento ótimo ao redor de 20°C e o mais rápido crescimento nas condições de cultivo, no entanto apresentou redução do número de células viáveis em temperaturas superiores a 25°C (Figura 2A).

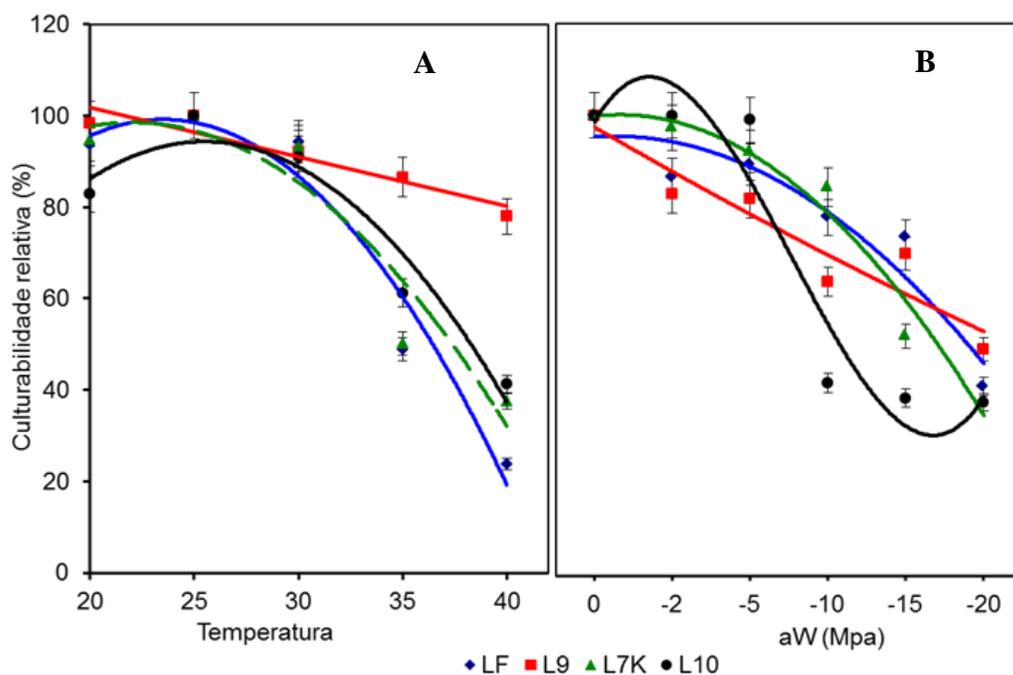


Figura 2 – Culturabilidade de isolados de leveduras (LF, L7K, L9 e L10) em meio com baixa atividade de água (a_w) e diferentes condições de temperatura (A) e diferentes concentrações de PEG 6000 (B), com concentração (0, -2, -5, -10, -15, -20).

Os isolados apresentaram diferentes comportamentos quando cultivados em meio com diferentes a_w à temperatura de 25°C (Figura 2B). Os isolados L10, L7K e LF apresentaram elevado número de unidades formadoras de colônias (UFC) até -5 Mpa e redução da contagem a a_w menores. Já o isolado L9 sofreu redução do número de UFC a partir das primeiras alterações no potencial osmótico do meio, devido ao aumento da concentração do osmólito e consequente queda da atividade de água do meio (a_w). Além disso, foi verificada a presença de formação de grumos nas concentrações de -2Mpa nos quatros isolados e -10Mpa para LF e L9.

Avaliação da tolerância de isolados de leveduras à baixa umidade relativa após aplicação em frutos.

Todos os isolados apresentaram forte limitação quanto à sobrevivência em baixas umidades relativas (UR) (Figura 3). O isolado L7K se destacou com maiores contagens de células viáveis por baga a partir de 40% de UR, e população mais elevada à superfície das bagas entre 50-60%. O isolado L9

apresentou número de células viáveis constantes entre 30-60% de UR, apresentando número similar ao do isolado L7K apenas quando à 80% de UR. Os isolados L10 e LF apresentaram a menor tolerância à baixa UR, com ligeiro aumento do número de colônias a partir de 50% de UR, apresentando números similares ao demais isolados quando à 80% (Figura 3).

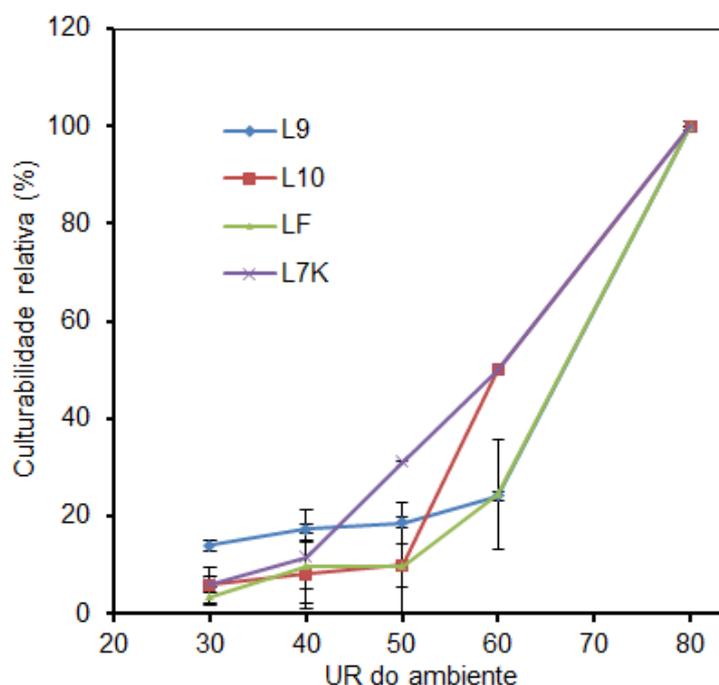


Figura 3 – Tolerância de isolados de leveduras à baixa umidade relativa do ambiente controlado após a pulverização de bagas com suspensões de leveduras contendo 10^8 céls.mL⁻¹ e expostas a diferentes condições de UR.

Avaliação da eficiência de controle de podridões pós-colheita em uva var. Sagraone

Houve efeito significativo da aplicação de leveduras sobre a severidade dos cachos. Quando inoculados com *A. alternata*, os isolados LF, L7K e L10 diferiram estatisticamente da testemunha, apresentando eficiência de controle em torno de 52%, 61% e 58% respectivamente. Para *A. niger*, todos os isolados apresentaram severidade das podridões significativamente diferente do tratamento testemunha (Tabela 2), com eficiência de controle igual ou superior a 55%.

Tabela 2 – Influência da aplicação de isolados de leveduras sobre a severidade (%) de podridão pós-colheita causada por *A. alternata* e *A. niger* em cachos de uva var. Sagraone.

Isolados	<i>A. alternata</i>	<i>A. niger</i>
LF	22,03 a	22,80 a
L7K	17,56 a	20,84 a
L9	28,27 ab	21,09 a
L10	19,00 a	18,34 a
Test	45,97 b	50,87 b

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Os isolados utilizados neste estudo foram previamente selecionados a partir de 87 isolados de leveduras obtidos de diferentes frutos coletados no Submédio do Vale do São Francisco, sendo posteriormente pré-selecionado oito isolados com experimentos de inibição de patógeno de uva e manga *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de posterior aplicação em campo. E destes, quatro isolados apresentaram maior potencial de controle de podridões pós-colheita em uva.

No primeiro experimento deste trabalho, verificou-se que os isolados L7K, L9, L3A e LF apresentaram resultados promissores para o controle de podridões e foram selecionados para a continuidade do estudo. Diversos estudos ao longo dos últimos 30 anos têm demonstrado o potencial de leveduras para o controle de podridões em frutos e oleráceas. Resultados similares aos obtidos nestes estudos foram observados por Sperandio (2012), ao avaliar isolados de leveduras para o controle de podridão causada por *Penicillium digitatum* em laranja. Wang et al. (2008), relataram que a levedura *Rhodospiridium paludigenum* conseguiu inibir a atuação do patógeno *A. alternata* em tomate cereja apresentando melhor tratamento com incidência de apenas 13%. Em estudos posteriores, o mesmo grupo relatou que cinco

isolados de leveduras avaliados para o controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em trabalho similar a este, reduziram significativamente a incidência de podridões em tomates cereja (Wang et al., 2010)

Dos isolados de levedura avaliados, dois (L7K e LF) apresentaram potencial para controle de *A. alternata* e quatro (L7K, LF, L9 e L3A) para *A. niger*. Em outro patossistema envolvendo *A. alternata*, Qin et al. (2004), selecionaram um isolado de levedura que reduziu significativamente a incidência de podridões em cereja.

A tolerância dos agentes de controle a variáveis ambientais é uma característica importante ao se considerar sua aplicação em campo ou, no caso de patógenos pós-colheita, em ambiente controlado. De acordo com Torija et al. (2003), a temperatura afeta diretamente a ecologia microbiana e as reações bioquímicas da levedura. O crescimento das leveduras pode ocorrer sob uma ampla faixa de temperatura variando entre 0-47°C, sendo que a maioria das espécies se enquadra com temperatura ótima na faixa entre 20-30°C (Landell, 2006).

Conforme observado na Figura 2A todos os isolados avaliados estão inseridos nessas condições, já que apesar de tolerar temperaturas acima de 30°C há uma forte redução no número de células viáveis, diferindo das espécies patogênicas que se enquadram entre as faixas de 30-37°C, apresentando melhor crescimento a 37°C (Landell, 2006). Resultados encontrados por Narayanan et al. (2012), em estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* confirmam o mesmo comportamento apresentado pelos isolados. Esses autores encontraram uma faixa ótima de crescimento nas temperaturas de 28 a 30°C, com tolerância até 45°C, porém com redução da taxa de multiplicação.

A exposição de leveduras às condições adversas como temperatura, salinidade ou a estresse osmótico, podem iniciar uma série de mecanismos afetando as estruturas celulares, principalmente as membranas celular e organelas de diferentes macromoléculas, influenciando e acarretando danos em suas funções fisiológicas. Para contornar essas situações desfavoráveis, a

levedura responde rapidamente sintetizando moléculas que lhe permitem atenuar ou reparar os danos causados pelo estresse como no caso da síntese de trealose e de glicerol que tem como finalidade resguardar as células da desidratação e proteger as estruturas celulares dos possíveis efeitos da condição de estresse (Estruch, 2000; Mager e Siderius 2002; Folch-Mallol et al., 2004).

São poucos os estudos com a atividade de controle biológico e dinâmico crescimento de estresse adaptado a antagonistas (Teixidó et al., 1998; Teixidó et al., 2006). Antes e após a aplicação de leveduras antagônicas sobre mercadorias colhidas, os fatores ambientais como temperatura, estresse oxidativo, pH e atividade de água podem influenciar a sua viabilidade e, portanto, eficácia (Teixidó et al., 1998; Liu et al., 2011; 2012). Portanto, um dos principais fatores para buscar melhor eficiência quanto à utilização de leveduras no biocontrole é ter um conhecimento prévio da tolerância dos isolados aos estresses abióticos.

Na Figura 2B, foi observado o comportamento diferenciado dos isolados submetidos a diferentes a_w , avaliados a 25°C. Wang et al. (2010), ao trabalharem com *Rhodosporidium paludigenum* avaliando a tolerância a estresses, verificaram que a baixa atividade da água inibiu o crescimento de *R. paludigenum* em caldo de nutrientes de levedura dextrose, mas a levedura cresceu melhor no meio modificado com NaCl do que com outros solutos iônicos. Narayanan et al. (2012) ao avaliarem a tolerância osmótica de quatro isolados de *S. cerevisiae* utilizando diferentes concentrações de glicose observaram que todos os isolados testados foram capazes de suportar até 30% de glicose, porém o seu máximo crescimento 15%-20%. Oliveira (2008), ao trabalhar com mutantes da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* relata a sensibilidade do mutante Gdosm1a medida que foi aumentando o estresse osmótico com diferentes concentrações de sacarose.

A formação de grumos observados na Figura 2 também chamados de floculação, pode ser induzida por estresse osmótico, é controlada por uma família de genes (FLO) envolvidas na proteção contra estresses múltiplos,

incluindo antibióticos (Smukalla et al., 2008), assim como pode ser um mecanismo de adaptação a nutrientes (Zara et al., 2011) como detectado para FLO11D na levedura *Zygosaccharomyces rouxii* (Watanabe et al., 2013). Na natureza, o crescimento das leveduras apresenta certo número de respostas adaptativas, tal como a filamentação, crescimento invasivo, a floculação, e a formação de biofilme, para ultrapassar um ambiente prejudicial (Fidalgo et al., 2006), que muitas vezes, podem atuar protegendo as células do contato direto com o estresse osmótico permitindo assim o crescimento (Oliveira, 2008).

Houve limitação dos isolados (LF, L9 e L10) quanto à sobrevivência em baixa UR, com redução significativa da população à superfície das bagas em umidades inferiores a 60%. Os isolados L7K e L10 apresentaram maior tolerância, com maior número de colônia aos 40% e 50% de UR e, quando em condições de UR mais elevada, apresentou o maior número de células viáveis à superfície das bagas entre os isolados avaliados. Esta característica ganha importância quando se considera que no Submédio do Vale do São Francisco a umidade relativa média anual varia de 56% a 73% (Angelloti e Costa, 2010).

Além disso, foi verificado que não houve uma correlação direta entre os isolados nos experimentos avaliados. Pois, embora o L7K tenha apresentado potencial de inibição quanto às podridões pós-colheita em uva nos experimentos iniciais *in vitro*, não se mostrou tolerante a baixa aw e a temperaturas mais elevadas, mas se mostrou tolerante a baixa umidade relativa e quando expostas às condições de campo se destacou com maior eficiência de controle. Sant'ana (2009), relata que a resposta aos diferentes tipos de estresse é uma característica fundamental na adaptação dos organismos vivos às condições adversas do ambiente.

Dos quatro isolados avaliados, três (L7K, LF e L10) apresentaram eficiência para o controle de *A. alternata* e *A. niger*, diferindo estatisticamente da testemunha. A utilização dos isolados 24 horas antes da inoculação do patógeno foi executada, considerando a competição o principal mecanismo de ação dos isolados. Ao entrar em contato com a superfície do fruto com ferimentos durante o manuseio, a levedura cresce rapidamente de forma a

utilizar os nutrientes e tornando indisponível para o patógeno, como uma forma de proteção. Dessa forma, Li et al. (2008), e Liu et al. (2012), afirmam que, durante esse período a competição da disponibilidade de nutrientes causa a exclusão dos patógenos do nicho formado pelas lesões à superfícies dos frutos, resultando no controle das lesões.

Resultados similares foram encontrados no trabalho de Lima et al. (2013), ao avaliarem a eficiência das leveduras *Wickerhamomyces anomalus* e *Meyerozyma guilliermondii* para o controle de *C. gloeosporioides* em mamão, obtendo redução de 30% e 41,17% da doença, respectivamente, nas mesmas condições utilizadas neste estudo. Em outro caso, Gholamnejad et al. (2010), ao trabalharem com três cepas de *Candida membranfaciens* e duas de *Rhodotorula mucilaginosa*, verificaram que todas as cepas foram eficientes, reduzindo significativamente a área lesionada nas condições do estudo. Resultados similares para a videira foram obtidos por Bleve et al. (2006), no controle, de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* em bagas, destacando a levedura *Issatchenkia orientalis* com a maior atividade antagonista.

Dessa forma, a partir dos resultados adquiridos, a atuação das leveduras impedindo a sobrevivência dos patógenos tem intensificado os estudos quanto à importância da inoculação logo após a colheita, além de associar a possíveis tratamentos durante a pré-colheita, essa eficiência estar associada diretamente com os mecanismos de ação, sendo considerada uma alternativa vantajosa para o controle de doenças em frutas e conseqüentemente para os consumidores.

5. CONCLUSÕES

- Os isolados L7K, L9, L3A e LF apresentaram elevada eficiência de controle de podridões pós-colheita causada pelo fungo *Aspergillus niger*, e os isolados L7K e LF para o fungo *Alternaria alternata* diferindo significativamente da testemunha.
- Os isolados L10, L7K e LF apresentaram faixa ótima de crescimento em torno de 25 a 30°C tolerando até 35°C e o L9 com crescimento ótimo em torno de 20°C e tolerância até 30°C.
- O isolado L7K se destacou sobrevivendo a partir de 40% de umidade relativa, apresentando o melhor crescimento quando exposto a umidades relativas mais elevadas de 60-80%.
- Houve efeito significativo da aplicação prévia de leveduras sobre a severidade dos cachos apresentando eficiência de controle de podridões superior a 52% para os isolados LF, L7K e L10 em *Alternaria alternata* e superior ou igual a 55% para LF, L7K, L10 e L9 para *Aspergillus niger*.

AGRADECIMENTOS

A FAPESB, UNEB e EMBRAPA SEMIÁRIDO pela valiosa contribuição, durante o desenvolvimento da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angelotti, F., Costa, N.D. 2010. Sistema de produção do melão. *Embrapa Semiárido*. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/melao/sistemaproducaomelao/clima.html>>. Acesso em: 21 Jan 2014.

Artés-Hernández, F., Tomás-Barberán, F.A., 2006. Modified atmosphere packaging preserves quality of SO₂-free 'Superior seedless' table grapes. *Postharvest Biology and technology*, Amsterdam 39, 146-154.

Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108, Issue 2. 204-209.

Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Casals, C., Solsona, C., Teixidó N., 2008. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology* 49. 86–95.

Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 469-486.

Fao., 2010. The State of Food Insecurity in the World 2010: *Addressing food insecurity in protracted crises*. Rome. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103. 11228-11233.

Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., Robles A.A.C., 2004. La respuesta a estrés em la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 46, 24-46.

Fravel D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Plant Biology* 43, 337–359.

Gholamnejad, J., Etebarian, H.R., Sahebani, N., 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science* 4(1). 001-007.

- Giobbe, S., Marceddu, S., Scherm, B., Zara, G., Mazzarello, V.L., Budroni, M., Migheli, Q., 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research* 7, 1389–1398.
- Landell, M.F., 2006. *Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã-Viamão/RS*. Porto Alegre-RS. 136p. (Dissertação mestrado).
- Li, B.Q., Zhou, Z.W., Tian, S.P., 2008. Combined effects of endo- and exogenous trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of two antagonistic yeasts. *Biological Control* 46, 187–193.
- Li, R., Zhang, H., Liu, W., Zheng, X., 2011. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology* 146. 151–156.
- Lima, J.R., Gondim, D.M.F., Oliveira, J.T.A., Oliveira, F.S.A., Gonçalves, L.R.B., Viana, F.M.P., 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology* 83, 58-64.
- LIMA MF. 2008. Doenças que comprometem a produção e a comercialização da uva. In: *I Simpósio Internacional de Vitivinicultura do Submédio São Francisco*. FENAGRI. 22p.
- Lima, M.F., 2012. *Uva de Mesa: Fitossanidade*. 2. ed. Rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 111p.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y., 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology* 167. 153–160.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., Tian, S., Farrell R., 2012. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology* 80, 578–590.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Tian, S., Hershkovitz, V., Tworkoski, T., 2011. Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. *FEMS Microbiology Ecology* 76, 145–155.
- Loper, J.E., Suslow, T.V., Schroth, M.N., 1984. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology* 74, 1454–1460.
- Lutz, M.C., Lopes, C.A., Rodriguez, M.E., Sosa, M.C., Sangorrin, M.P., 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic

yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology* 164, 166–172.

Mager, W.H., Siderius, M., 2002. Novel insights into osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research* 2, 251-257.

Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., Bertolini, P., 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology* 73, 56–62.

Nally, M.C., Pesce, V.M., Maturano, Y.P., Toro, M.E., Combina, M., Castellanos De Figueiroa, L.I., Vazquez, F., 2013. Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biology and Technology* 86, 456–462.

Narayanan, R., Reddy KN; CH JYOTHI P. 2012. Avaliação de potencial probiótico do stress tolerante *Saccharomyces cerevisiae* e desenvolvimento da Mídia economicamente viável para o crescimento máximo. *Journal of Food Processing & Tecnology* 3:178. Doi: 10.4172/2157-7110.1000178.

Oliveira, M.V.V., 2008. Isolamento e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos para osmotolerância. Rio de Janeiro: UENF - CAMPOS DOS GOYTACAZES. 66p. (Tese Doutorado).

Oliveira, S.M.A., Terao, D., Dantas, S.A.F., Tavares, S.C.C.H., 2006. Patologia pós-colheita. In: OLIVEIRA SMA; TERAO D; DANTAS SAF; TAVARES SCCH. *Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 855p.

Qin, G., Tian, S., Yong, X.U., 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 31. 51–58.

SANT'ANA GS. 2009. Resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces cerevisiae* e efeito protetor do íon sódio na morte celular induzida por ácido. Ouro Preto – MG: UFOP. 130p. (Tese Doutorado).

Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., 2008. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast . *Cell* 135. 726-737.

SPERANDIO E.M. 2012. *Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do cerrado*. Brasília-DF: UnB. 100p. (Dissertação Mestrado).

Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N., 1998. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. *Mycological Research* 102, 1409–1417.

Tian, S.P., 2006. Microbial control of postharvest diseases of fruits and vegetables: current concepts and future outlook. In: RAY RC; WARD OP. (Eds.), *Microbial biotechnology in horticulture*. Science Publishers Inc., Enfield. 1. p.163–202.

Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillon, J.M., Mas A., 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 80, 47-53.

Villela, F.A., Filho, L.D., Sequeira, E.L., 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glycol 6.000 e da temperature. *Pesquisa. Agropecuária Brasileira*, Brasília 26. 1957-1968.

Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., Zheng, X.D., 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospodium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology* 123. 234–239.

Wang, Y., Wang, P., Xia, J., Yu, T., Lou, B., Wang, J., Zheng, X.D., 2010. Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodospodium paludigenum*. *International Journal of Food Microbiology* 143. 103-108.

Watanabe, J., Uehara, K., Mogi, Y., 2013. Adaptation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* to an osmotic environment through copy number amplification of *FLO11D*. *Genetics: Early Online*. 49p.

Wei, Y., Mao, S., Tu, K., 2014. Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry, *Biological Control* 73, 68-74.

Winston, P.W., Bates, D.H., 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecological Society Of America* 41(1). 232-237.

Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Zara, S., 2011. Air-liquid biofilm formation is dependent on ammonium depletion in *Saccharomyces cerevisiae* flor strain. *Yeast* 28, 809-814.

Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2010. Efficacy of the antagonista *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control* 54, 172–180.

CAPÍTULO II

UTILIZAÇÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO E RESFRIAMENTO NO MANEJO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA DE UVA NO SUBMÉDIO DO VALE DO SÃO FRANCISCO.

RESUMO

A região do Submedio do Vale do São Francisco é considerada a principal região produtora de uvas do nordeste. Entretanto, a ocorrência de podridões vem afetando a qualidade das uvas e tornando-se um fator limitante para produção. Isto se deve a problemas relacionados ao controle de patógenos em pré-colheita, a danos mecânicos na colheita, transporte e inadequação no armazenamento. Dessa forma, as leveduras vêm se destacando por atuar de maneira biológica sem comprometer a qualidade pós-colheita. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de leveduras diante do número de aplicações pré-colheita e em diferentes épocas de desenvolvimento do fruto para o controle de doenças pós-colheita em Uva. Foram avaliados tanto o efeito dos isolados no controle de podridões pós-colheita com inoculação de leveduras padronizadas em 10^8 céls.mL⁻¹ e 24 hrs depois 10^6 esporos.mL dos patógenos, verificando a eficiência de controle em condições de campo através da aplicação da suspensão de leveduras, com pulverizações em dois períodos: quinze dias antes da colheita e a segunda dois dias antes da colheita; como também o número de aplicações pré-colheita realizadas em 3, 2 semanas e 1 dia antes da colheita e as diferentes épocas de aplicações dos agentes para o controle de doenças pós-colheita sob infecção natural. Houve efeito da aplicação pré-colheita de diferentes isolados de leveduras destacando-se L7K e LF reduzindo a incidência e severidade de podridões pós-colheita, apresentando elevada eficiência de controle. Aplicações pré-colheita realizada a partir da 3ª semana antes da colheita apresentaram redução na incidência e severidade de podridões em condições refrigeradas e de comercialização. Os isolados LF e L7K reduziram a incidência e severidade de podridões pós-colheita após armazenamento em câmara fria, destacando a floração como melhor época de aplicação. O biofungicida se mostrou mais eficiente quando realizadas aplicações pré-colheita a partir da 3ª semana, destacando a floração como melhor época de aplicação.

Palavras chaves: Podridões pós-colheita, leveduras antagonistas, pulverizações pré-colheita.

ABSTRACT

The region of the São Francisco Valley is considered one of the main areas producing grapes in the northeast. However, the occurrence of rot is affecting the quality of the grapes and becoming a limiting factor to production. This is due to problems related to the control of pathogens in pre-harvest, mechanical damage at harvest, transport and inadequate storage. Thus, the yeasts are distinguishing themselves by acting organic manner without compromising the postharvest quality. This study aimed to evaluate the potential of yeast isolates on the number of pre-harvest applications at different times of development of the fruit for the control of postharvest diseases in grape. The effect of the isolates in the control of postharvest decay inoculated with yeast standardized on 10^8 were evaluated both céls.mL⁻¹ and 24 hrs after 10^6 esporos.mL of pathogens, checking the efficiency of control under field conditions by applying the yeast suspension with sprays into two periods: two weeks before harvest , and the second two days before the harvest; as well as the number of pre-harvest applications performed on 3, 2 weeks and 1 day before the harvest and at different times of applications of agents for the control of postharvest diseases in natural infection. There was no effect of pre-harvest application of different isolates of yeasts and LF L7K reducing the incidence and severity of post-harvest rots, showing high efficiency control. Pre-harvest applications made on or after the 3rd week before harvest had reduced incidence and severity of decay in refrigerated and marketing conditions. The LF and L7K isolates reduced the incidence and severity of post-harvest rots after storage in a cold chamber, highlighting how best flowering time of application. The biofungicide was more efficient when carried out pre -harvest applications from the 3rd week, highlighting the best flowering time of application.

Keywords: Postharvest decay, antagonistic yeasts, preharvest sprays.

1. INTRODUÇÃO

A área plantada de uva no Brasil corresponde atualmente a 82.897 hectares e uma produção de 1.514.768 toneladas de frutos tanto no processamento quanto no consumo “*in natura*” (IBGE, 2012). No entanto, alguns aspectos relacionados à pós-colheita podem restringir a comercialização das uvas. Nos casos em que a logística de armazenamento e transporte, como no Submédio do Vale do São Francisco, requerem longo período entre a colheita e o consumo, a queda na atividade fisiológica, a sensibilidade à desidratação, o desgrane e as infecções fúngicas podem causar grandes perdas ou desvalorização da produção (Artés-Hernandez e Barberà, 2006), sendo a última, a maior causa de alterações, podendo chegar a 80-90% dos casos (Oliveira et al., 2006).

As podridões pós-colheita são responsáveis por grandes perdas nos segmentos de hortaliças e fruteiras (HF) em todo o mundo, com estimativas que chegam a 50% em regiões tropicais (Janisiewicz e Korsten, 2002; Fao, 2010). Em geral, isto se deve a problemas relacionados ao controle de patógenos em pré-colheita, a danos mecânicos na colheita, transporte e inadequação no armazenamento (Barkai-Golan, 2001; Snowdon, 2010). Um dos maiores entraves para as regiões produtoras de uvas são as perdas causadas por patógenos que infectam resíduos florais ou que são capazes de produzir infecções quiescentes (Viret et al., 2004; Snowdon, 2010). *Alternaria alternata* Fr. Keissl., *Aspergillus niger* van Tieghem, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Lind e *Cladosporium herbarum* (Pers.:Fr.) Link são fungos de maior ocorrência na região Semiárida (Pearson e Goheen, 1988; Terao et al., 2007; Lima et al., 2009; Camargo et al., 2011).

Os mercados consumidores têm se tornado mais exigentes em relação à qualidade e inocuidade dos alimentos, principalmente os consumidos *in natura*. Este fato tornou cada vez mais evidente a necessidade de medidas de controle economicamente viáveis e mais seguras tanto para a saúde do homem quanto para o ambiente. Nesse contexto, o controle biológico é um método fundamentado nas relações ecológicas entre as populações microbianas e

destas populações com o hospedeiro, mais especificamente entre o patógeno, o hospedeiro e seu antagonista ou agente de controle (Cook, 2007). A utilização de leveduras no controle de doenças pós-colheita é uma estratégia promissora para a redução do uso de fungicidas sintéticos (Nunes, 2012). Nesse processo, é possível selecionar agentes com mecanismos de defesa inócuos como a competição por espaço e nutrientes e a produção de enzimas hidrolíticas, parasitismo, formação de biofilme e indução de resistência em plantas (Giobbe et al., 2007; Zhang et al., 2010; Mari et al., 2012; Lutz et al., 2013). Dessa forma, as leveduras podem reduzir a proliferação e desenvolvimento do fungo, mantendo a maior qualidade do fruto para consumo, com menores riscos à saúde (Nunes e Manso, 2011).

Aplicações de agentes de controle durante a fase pré-colheita podem evitar as infecções, como as quiescentes visto que os microrganismos antagonistas interagem com os frutos, estabelecendo-se preferencialmente na epiderme e outros sítios, e competindo com o agente patogênico, reprimindo sua atividade e conseqüentemente protegendo de infecções subseqüentes (Zhao et al., 2011; Wei et al., 2014). Por isso, o tratamento pré-colheita com agentes de biocontrole surgiu como uma estratégia útil para o controle de doenças pós-colheita (Cañamás et al., 2008a, Cañamás et al., 2008b, Droby et al., 2009, Ippolito e Nigro, 2000). Alguns trabalhos já demonstraram o potencial de biocontrole com aplicações pré-colheita utilizando leveduras, como no caso da aplicação de *Cryptococcus laurentii* para o controle de podridões pós-colheita em cereja (Tian et al., 2004), uva (Meng et al., 2010) e morango (Wei et al., 2014).

A partir desta hipótese, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de leveduras considerando o número de aplicações, as aplicações em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto e o resfriamento no manejo de podridões pós-colheita em uva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para realização dos experimentos foram utilizados os isolados de leveduras LF, L7K, L9, L10 e L60K, oriundos do isolamento de frutas na região do Submédio do Vale do São Francisco e mantidos na coleção de microrganismos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido. Os isolados foram previamente selecionados quanto ao potencial de controle de podridões pós-colheita da uva.

Integração de estratégia para o controle de podridões pós-colheita da uva

O experimento foi realizado utilizando parreiral de videira de mesa da variedade Sugaone localizado no campo experimental da Embrapa Semiárido no Perímetro Irrigado de Bebedouro (Petrolina, PE), manejado segundo as recomendações para a região do Submédio do Vale do São Francisco, conforme Soares e Leão (2009).

Cultivo, produção de inóculo e preparação de suspensão das leveduras

As leveduras foram cultivadas em meio de cultura líquido SD-Y (Peptona 2,0%, extrato de levedura 1,0%) em agitador orbital a 120 rpm por 72h, a 27°C e fotoperíodo de 12h. Após o período de crescimento, o caldo de cultivo foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min, e ressuspendido em NaCl 0,8%(p/v) por 2 vezes para remoção de resíduos de meio de cultura. Uma alíquota da suspensão foi diluída em água estéril (1:10) para contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Posteriormente, a calda para pulverização foi padronizada de forma a obter uma suspensão de 10^8 céls.mL⁻¹.

Aplicação dos tratamentos em campo

As pulverizações foram realizadas em dois períodos: quinze dias antes da colheita e dois dias antes da colheita, com suspensão de 10^8 céls.mL⁻¹ dos isolados, com 2,0 g.L⁻¹ de dextrina para melhor aderência no cacho. Foram utilizados pulverizadores costais individualizados para cada tratamento e o

tratamento testemunha não recebeu nenhuma pulverização. Os dados meteorológicos foram monitorados em uma estação automática (Figura 1).

Após a colheita, os cachos foram transportados ao laboratório e inoculados com suspensão de isolados de *A. niger* e de *A. alternata*, conforme descrito anteriormente. Um grupo de cachos de cada tratamento foi mantido sem aplicação dos patógenos para a avaliação da ocorrência natural de podridões.

Após a colheita, os cachos foram processados adotando o procedimento padrão para frutos para exportação desde a colheita, o que consistiu do envolvimento em saco plástico perfurado; embalagem em caixa de papelão de 6 kg; envoltório em plástico microperfurado e papel absorvente; papel ondulado antichoque. Em seguida, as caixas foram armazenadas em câmara fria a 2 °C e 90% de UR por trinta dias. Após este período foram expostas à simulação de um possível período de comercialização, com exposição à temperatura ambiente durante quinze dias. As avaliações foram realizadas semanalmente durante todo o período em câmara fria e diariamente após a retirada desta, registrando-se o número de cachos com sintomas (incidência) e o número de bagas sintomáticas por cacho, considerada a severidade.

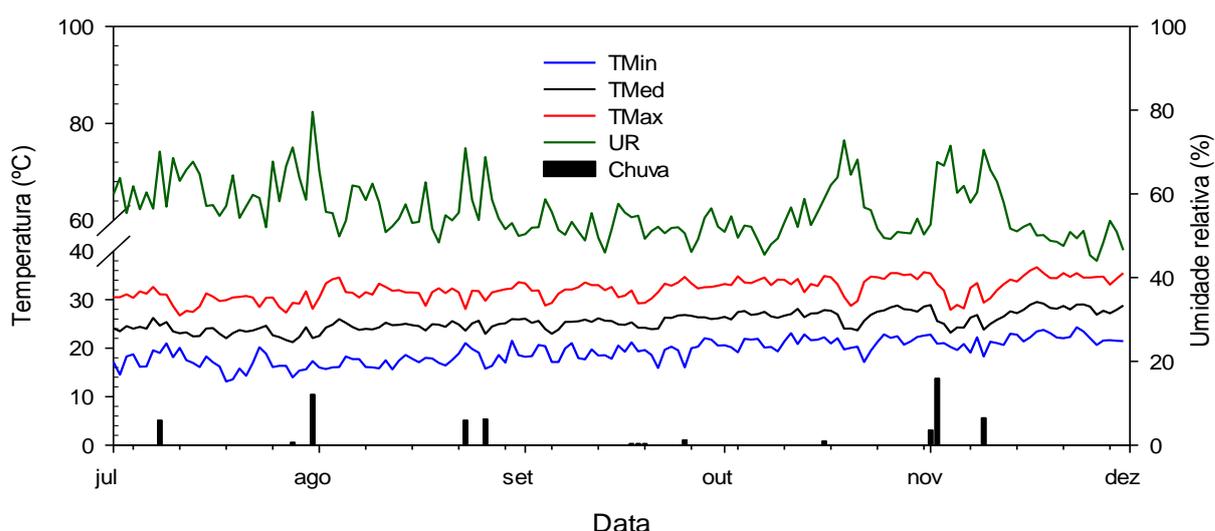


Figura 1 – Flutuação das variáveis climáticas temperaturas (máxima, mínima e média), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (chuva) no período de realização do experimento (jul – dez/2011).

A partir dos dados de severidade obtidos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a equação $AACPD = \sum \left[\frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \right]$, onde, Y_i é a incidência de podridão no tempo t_i em dias, e Y_{i+1} é a incidência de podridão no tempo t_{i+1} .

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de no mínimo oito cachos por parcela, até atingir 6 kg.embalagem⁻¹. O cálculo de eficiência de controle foi realizado em função do tratamento controle utilizando a equação: $Eficiência\ Controle\ (\%) = \frac{(C_i - T_i)}{C_i} \times 100$, na qual C_i equivale à severidade da podridão no tratamento controle, e T_i é a severidade nos demais tratamentos. Para fins de análise da variância, os dados de incidência e severidade, obtidos em percentagem, foram transformados pela função $X'_{ij} = \arcseno X_{ij}$.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, transformados quando necessário, e quando significativos foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa computacional IBM SPSS Statistics 20.

Avaliação do número de aplicações pré-colheita de isolados de leveduras para o controle de doenças pós-colheita

O experimento foi realizado em parreiral da variedade Crimson Seedless em uma área particular, localizada no Projeto Maria Tereza em Petrolina – PE, no segundo semestre de 2013. O experimento foi em blocos ao acaso, com 9 tratamentos utilizando dois isolados de leveduras (LF e L7K) e o biofungicida Serenade® (Bayer CropScience), e aplicações realizadas a 3, 2 semanas e 1 dia antes da colheita. As pulverizações foram realizadas com pulverizadores costais individualizados para cada tratamento, utilizando suspensão de 10⁸ céls.mL⁻¹ para os isolados de leveduras e 0,25% para o biofungicida. A testemunha não recebeu nenhuma pulverização. Os dados meteorológicos foram monitorados em uma estação automática (Figura 2).

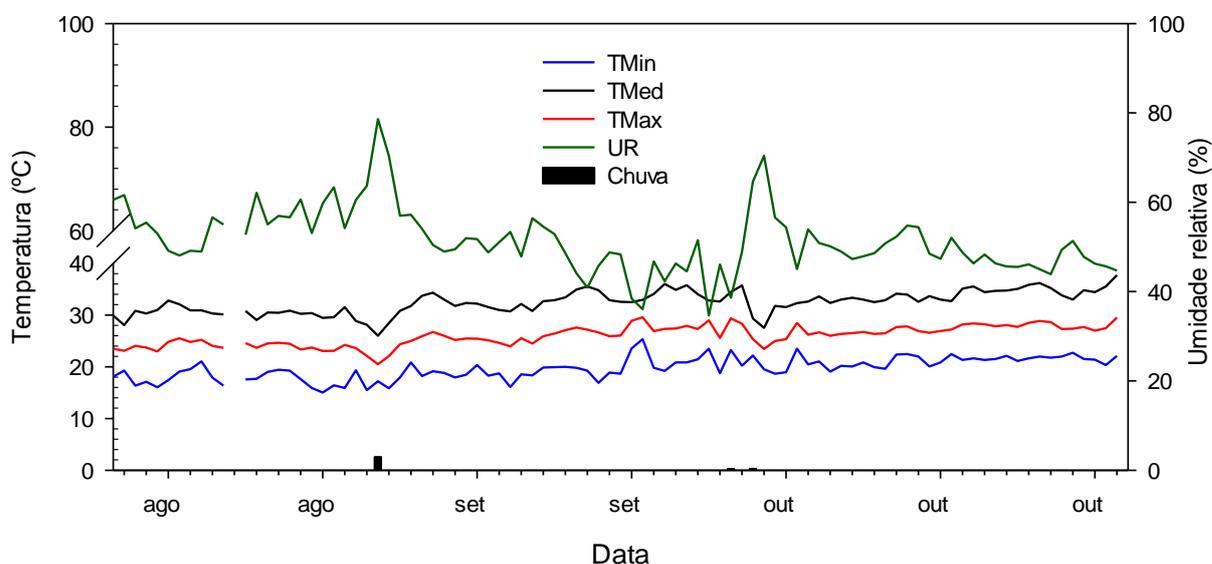


Figura 2 – Flutuação das variáveis climáticas temperaturas (máxima, mínima e média), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (chuva) no período de realização do experimento (ago – out/2013).

Após a colheita, os cachos foram processados e armazenados conforme descrito no experimento anterior, exceto que o período em câmara fria foi de 21 dias e por sete dias em temperatura ambiente, após sua remoção.

Ao longo de todo o período foi avaliada a qualidade dos cachos, registrando-se a ocorrência de sintomas de podridão. A perda de peso foi avaliada a partir das pesagens dos cachos individualmente a cada semana com balança de precisão, calculando a proporção de perda de peso tomando como base o peso inicial. As avaliações foram realizadas semanalmente durante todo o período em câmara fria e a cada três dias após a retirada desta, registrando-se os cachos com sintomas (incidência) e o número de bagas sintomáticas por cacho (severidade).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro blocos e 5 repetições. Para fins de análise da variância os dados obtidos foram transformados pela função $X'_{ij} = \arcseno X_{ij}$.

Avaliação da eficiência de aplicação de isolados de levedura em diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos

O trabalho foi conduzido no segundo semestre de 2013, utilizando cachos de uvas var. Midnight provenientes de um plantio comercial localizado em Petrolina-PE. Foram coletadas amostras de cachos de uva da variedade Midnight após passarem pelo processo de pulverização realizada com isolados de leveduras e biofungicida Serenade, com pulverizadores costais individualizados para cada tratamento. As pulverizações foram realizadas de acordo com os estágios de desenvolvimento do fruto: floração, ervilha, pintor e pré-colheita, realizados até os 15 dias antes da colheita, semanalmente durante todo o período. Os dados meteorológicos foram monitorados em uma estação automática (Figura 3).

As concentrações utilizadas para os isolados de leveduras foram 10^8 céls.mL⁻¹ conforme descrito anteriormente e para o biofungicida Serenade® 0,5%. Após a colheita, quando já estavam separados por tratamentos, os cachos de uva receberam o choque térmico sendo armazenados por 24 horas em câmara fria, processo responsável pela diminuição do metabolismo do fruto, a partir da retirada imediata do calor que a fruta recebe quando em condições de campo, e contribui para deteriorização do fruto (Cantillano, 2006). Recebendo, em seguida, o mesmo procedimento realizado em *packing houses*, conforme descrito nos experimentos anteriores e, posteriormente, encaminhadas para câmara fria, onde permaneceu por 30 dias, sendo em seguida expostas às condições naturais durante sete dias. As avaliações foram realizadas conforme descrito no item anterior.

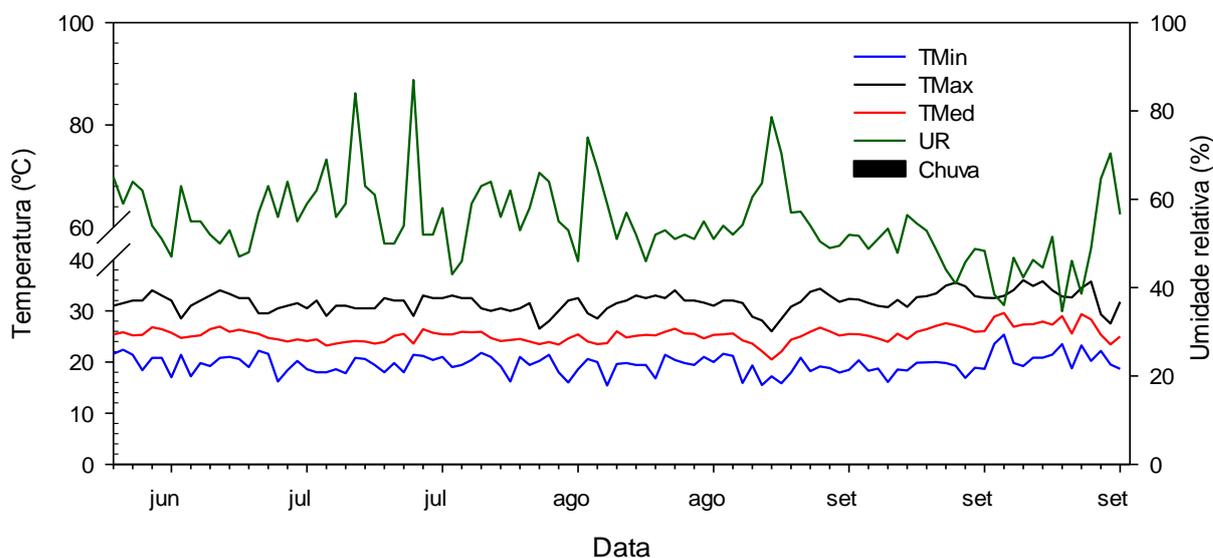


Figura 3 – Flutuação das variáveis climáticas temperaturas (máxima, mínima e média), umidade relativa do ar (UR) e precipitação (chuva) no período de realização do experimento (jun – set/2013).

RESULTADOS

Os isolados de leveduras foram selecionados de acordo com estudos realizados anteriormente que demonstraram capacidade de sobreviver em diferentes condições, inclusive em campo. Dessa forma, avaliou-se o potencial desses isolados diante de aplicações pré-colheita para o controle de podridões pós-colheita causadas por *A. niger* e *A. alternata* em uva.

Visto que durante a realização dos experimentos de acordo com os dados meteorológicos não houve precipitações, as condições de clima seco no semiárido desfavoreceram a atuação de patógenos e consequentemente a redução da incidência de doenças nas videiras que se proliferam rapidamente quando em condições de alta umidade e chuvas.

Integrando a aplicação pré-colheita de leveduras e resfriamento para o controle de podridões pós-colheita da uva causadas por *A. niger* e *A. alternata*

Na figura 4A é possível observar que durante os primeiros 15 dias após a inoculação de *A. niger*, o isolado LF se destacou por apresentar a menor incidência de cachos sintomáticos e, ao final do período de armazenamento em câmara fria (31 dias) o isolado LF apresentou menor incidência diferindo estatisticamente dos isolados L7K, L60K e testemunha (Tabela 1). Nos tratamentos com a inoculação de *A. alternata*, até o 15º dia os isolados L7K, LF, L60K e testemunha apresentaram incidência menor que 10% (Figura 4B). Aos 31 dias todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha. Ao final do período em condição ambiente (45 dias) não houve diferença entre os tratamento e testemunha tanto para *A. alternata* quanto para *A. niger*.

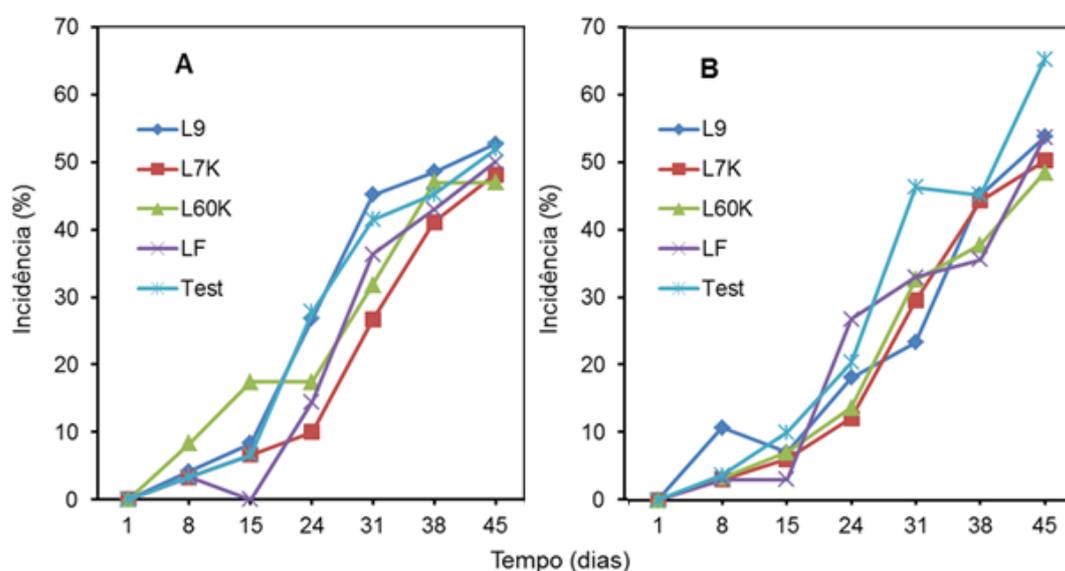


Figura 4 – Evolução da incidência de podridão causada por *A. niger* (A) e *A. alternata* (B) após inoculação artificial em uva var. Sugaone e manutenção em câmara fria (2 °C até 31d) e ambiente (25 °C até 45d).

Os isolados L7K e L9 apresentaram baixa severidade de podridões, diferindo significativamente da testemunha durante o período sob refrigeração (31 dias). Após exposição à temperatura ambiente o isolado L7K permanece com maior eficiência diferindo estatisticamente dos isolados L9, L60K e da testemunha (Tabela 1). Para *A. alternata* durante o período de armazenamento, a incidência de podridões foi muito baixa e não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha. Contudo, após permanência em condições naturais (45 dias), o L7K se destaca com baixa severidade, diferindo do L9 e testemunha e com resultado similar ao LF (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito da aplicação pré-colheita de diferentes isolados de leveduras sobre a severidade de podridões causadas por *A. niger* (A) e *A. alternata* (B) em frutos de uva var. Sagraone.

Isolados	Incidência (%)		Severidade (%)	
	<i>Aspergillus niger</i>			
	31 dias	45 dias	31 dias	45 dias
L7K	45,15 b	52,65 a	0,71 a	4,14 a
LF	26,67 a	48,15 a	1,14 ab	13,14 ab
L9	31,82 ab	46,97 a	1,21 a	14,78 b
L60K	36,30 b	50,00 a	1,23 ab	16,35 b
Testemunha	41,48 b	51,85 a	2,43 b	13,57 b
<i>Alternaria alternata</i>				
L7K	32,65 a	48,48 a	0,87 a	5,80 a
LF	23,33 a	45,19 a	1,14 a	9,86 ab
L9	29,55 a	50,25 a	2,06 a	16,53 c
L60K	32,96 a	53,70 a	1,76 a	11,58 abc
Testemunha	46,30 b	65,28 a	1,87 a	14,20 bc

*Valores seguidos de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Ao avaliar a eficiência de controle de podridão causada por *A. niger* durante o período de armazenamento, verificou-se que todos os isolados apresentaram eficiência de controle superior a 50%, destacando o isolado L7K que atingiu mais de 70% ao 31º dia (Figura 5A). No 45º dia, foi observado que os isolados apresentaram um declínio da eficiência na maioria dos tratamentos e apenas o isolado L7K apresentou eficiência de controle em torno de 50%.

Os isolados L7K e LF apresentaram a maior eficiência de controle de podridão causado por *A. alternata* ao final do período em câmara fria, atingindo valores de 52% e 40%, respectivamente (Figura 5B). Ao final do período em condições ambiente (45 dias), o isolado L7K apresentou eficiência de controle de 60%, enquanto o isolado LF, apesar de uma pequena redução, apresentou eficiência de controle superior a 30%. A aplicação do isolado L60K, apresentou eficiência inferior a 20%, enquanto o isolado L9 apresenta resultados similares à testemunha.

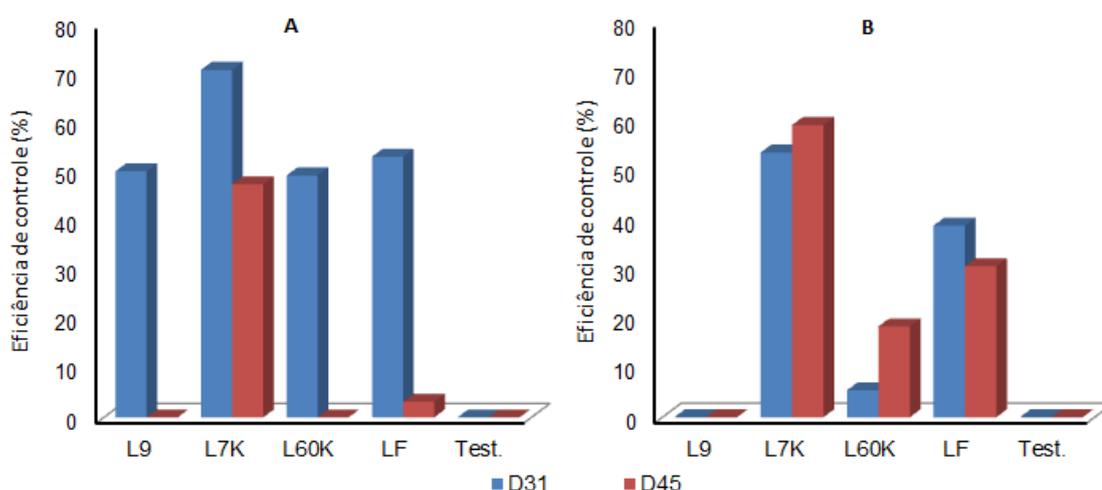


Figura 5 - Eficiência de isolados de leveduras no controle (%) de podridões pós-colheita causado por *Aspergillus niger* (A) e *Alternaria alternata* (B) em uvas var. Sagraone.

Avaliação do número de aplicações pré-colheita de agentes de controle sobre a podridão pós-colheita em uva var. Crimson Seedless

O experimento foi realizado em condições de campo, em área de produtor localizada no DISNC (Petrolina, PE). Conforme observado na Figura 6, não houve diferença significativa entre os tratamentos e testemunha e o número de aplicações para as variáveis, peso inicial e peso final dos cachos durante a fase de armazenamento em câmara fria ou em condições normais de ambiente.

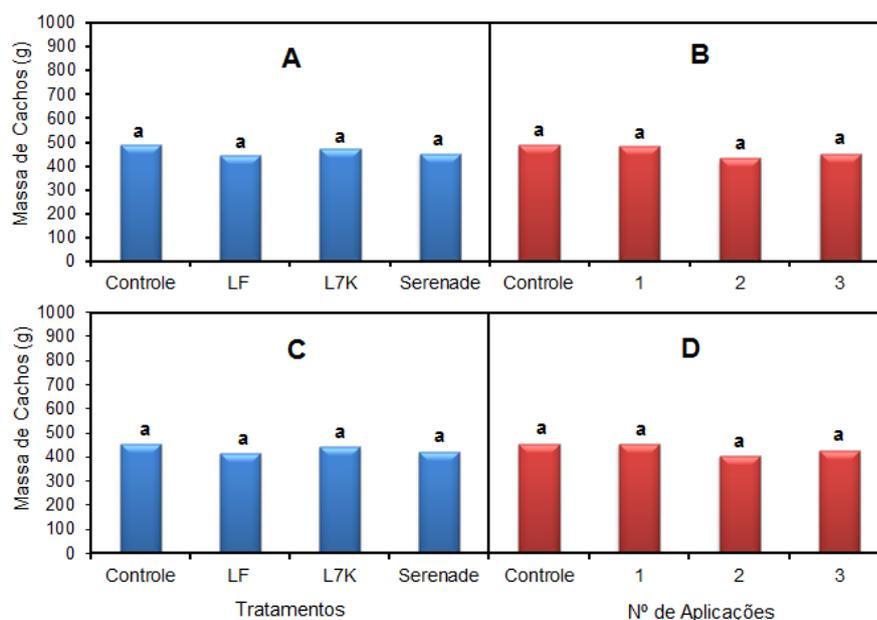


Figura 6 - Efeito do tratamento com diferentes agentes de controle e do número de pulverizações sobre o peso inicial (A e B) e peso ao sair do armazenamento (C e D) em câmara fria (28 dias) em uva var. Crimson Seedless.

A incidência de *Aspergillus* sp. foi muito baixa, no entanto houve interação significativa entre os agentes de controle aplicados e o número de pulverizações pelo teste de F ($p < 0,05$). Aplicações de Serenade por duas semanas consecutivas eliminaram a ocorrência de podridões causadas por *Aspergillus* sp. e para os isolados de levedura a aplicação por 3 semanas consecutivas obteve o mesmo resultado (Tabela 2).

Para o total de podridões, não houve diferença significativa entre os tratamentos, embora tenham também diferido da testemunha, enquanto que pulverizações por três semanas consecutivas apresentou a menor incidência.

Tabela 2 – Incidência (%) de podridões pós-colheita ao final do período de armazenamento em câmara fria em uva var. Crimson Seedless por *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger* e podridão total após a aplicação de agentes de controle com diferentes números de aplicações.

	Controle	LF	L7K	Serenade	Média
<i>Cladosporium</i> sp.					
Testemunha	45,38	45,38	45,38	45,38	45,38 a
1	45,38	10,00	25,00	28,75	21,25 ab
2	45,38	29,17	32,50	35,00	32,22 ab
3	45,38	22,50	15,00	10,00	15,83 b
Média	45,38 A	20,56 B	24,17 B	24,58 B	
<i>Aspergillus</i> sp.					
Testemunha	2,37 aA	2,37 bA	2,37 bA	2,37 bA	2,37 b
1	2,37 aBC	5,00 abB	0,00 cC	17,50 aA	7,50 a
2	2,37 aBC	4,17 aB	11,25 aA	0,00 cC	5,14 ab
3	2,37 aA	0,00 cB	0,00 cB	0,00 cB	0,59 c
Média	2,37 A	3,05 A	3,75 A	4,03 A	
Total					
Testemunha	48,52	48,52	48,52	48,52	48,52
1	48,52	35,00	35,00	45,00	40,88
2	48,52	38,33	52,50	35,00	43,59
3	48,52	46,67	15,00	20,00	32,55
Média	48,52	40,00	34,17	33,33	

*Valores seguidos de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

A incidência de podridões pós-colheita durante o período total de avaliação considerado neste trabalho (câmara fria + condições naturais) foi muito elevada, demonstrando a suscetibilidade da uva às podridões e a necessidade de estratégias adequadas de armazenamento. Houve um rápido avanço na incidência, mesmo em um período curto de avaliações após a remoção da câmara fria (5 dias).

Avaliando a severidade de podridões na var. Crimson Seedless em condições refrigeradas (Tabela 3), verificou-se que os tratamentos com a aplicação do isolado LF e Serenade apresentaram menor severidade para *Cladosporium* sp. e podridão totais, enquanto que para *Aspergillus* sp. apenas o isolado L7K. Além disso, as três aplicações realizadas na semana da colheita foram as que apresentaram melhores resultados diferindo estatisticamente da testemunha para *Cladosporium* sp. e podridões totais e dos demais números de aplicações para *Aspergillus* sp.

Tabela 3 - Severidade de podridões pós-colheita (%) em período de armazenamento em câmara fria em uva var. Crimson Seedless por *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.* e podridões em geral, após a aplicação de agentes de controle em diferentes números de aplicações.

Tratamento	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	Total
Controle	90,00 a	3,89 b	93,89 a
LF	64,17 b	6,39 a	72,50 b
L7K	72,92 ab	1,67 b	80,00 ab
Serenade	65,83 b	5,83 a	75,00 b
Aplicações			
Controle	90,00 a	3,89 ab	93,89 a
1	73,08 ab	6,92 a	83,25 a
2	71,53 ab	4,72 a	80,00 a
3	58,89 b	1,67 b	62,56 b

*Valores seguidos de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

De acordo com a área abaixo da curva de progresso da doença, foi observado que durante o período de comercialização (refrigeração+ambiente) os isolados LF e L7K diferiram estatisticamente da testemunha em ambos os patossistemas avaliados (Tabela 4), bem como quando aplicadas três semanas antes da colheita.

Tabela 4 - Área abaixo da curva de progresso da doença ao longo do período de comercialização (armazenamento em frio + ambiente) em uva var. Crimson Seedless por *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.* e podridões em geral, após a aplicação de agentes de controle em diferentes números de aplicações.

	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	Total
Tratamento			
Controle	256,07 a	2,60 a	281,62 a
LF	208,48 b	0,47 b	212,63 b
L7K	209,04 b	1,59 b	214,21 b
Serenade	232,42 ab	1,61 b	237,38 b
Aplicações			
Controle	240,18 a	2,47 a	259,55 a
1	229,98 ab	2,45 a	252,16 a
2	228,74 ab	0,93 b	252,97 a
3	208,48 b	0,47 b	212,63 b

*Valores seguidos de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Avaliação da eficiência de controle de podridões de uva var. Midnight com aplicações de agentes de controle em diferentes estágios de desenvolvimento

Os isolados LF e L7K apresentaram efeito significativo ($P < 0,05$) sobre o peso de cacho na colheita, com cachos menores que o tratamento testemunha e aqueles oriundos de plantas tratadas com Serenade (Tabela 5). Além disso, houve diferença significativa entre as épocas de aplicações, destacando as fases de chumbinho e pintor com menor peso do cacho (%), diferindo estatisticamente do controle.

Tabela 5 - Efeito do tratamento com diferentes agentes de controle e da época de aplicação sobre o peso inicial, peso ao sair do armazenamento em câmara fria por 28 dias e durante o período em exposição à temperatura ambiente por 5 dias em uva var. Midnight.

	Inicial	Refrigeração	Ambiente
	Tratamentos		
Testemunha	384,25 a	355,96 a	349,11 a
LF	346,45 b	318,89 b	313,13 b
L7K	323,77 b	298,01 b	290,89 b
Serenade	352,95 ab	331,40 ab	324,26 ab
	Épocas		
Testemunha	384,25 a	355,97 a	349,11 a
Floração	354,29 ab	328,34 ab	318,59 ab
Chumbinho	328,32 b	303,99 b	298,13 b
Pintor	335,15 b	310,56 b	303,18 b
Pré-colheita	346,47 ab	321,52 ab	317,81 ab

*Colunas apresentando letras similares são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Ao longo do processo de armazenamento em câmara fria e em condições ambientais, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, com o Serenade apresentando a menor perda de massa (Tabela 6). Em se tratando de épocas de aplicações não houve diferença significativa entre os tratamentos e testemunha.

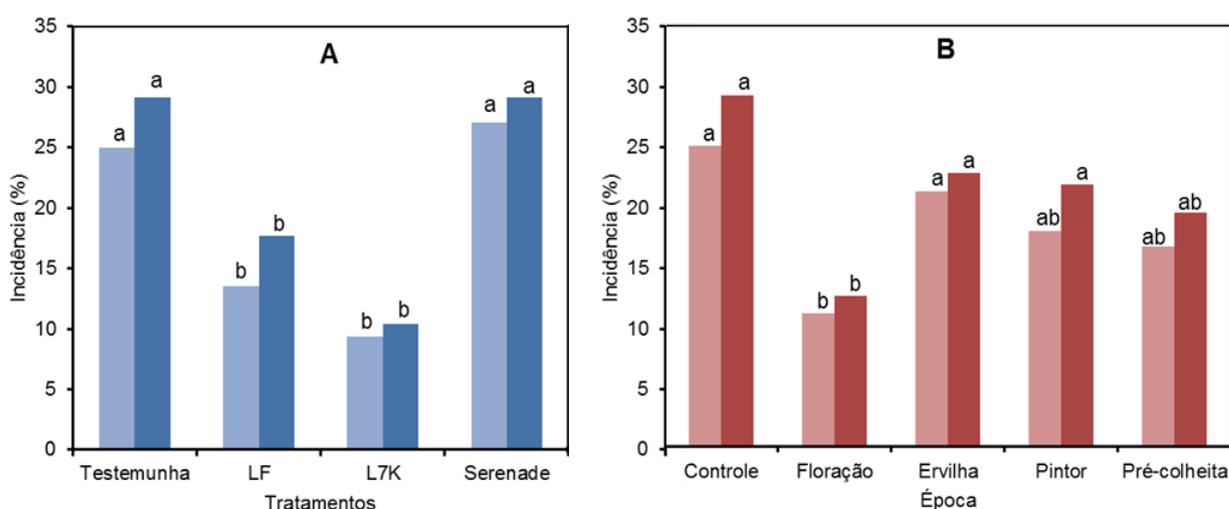
Não houve interação significativa entre os agentes de controle e as épocas de pulverização sobre a incidência de podridões pós-colheita em uva na var. Midnight ao final do período de armazenamento em câmara fria. Os isolados de leveduras LF e L7K reduziram a incidência de podridão de

Cladosporium sp. em torno de 14% e 10% e 17% e 11% para podridão total, diferindo estatisticamente do Serenade e da testemunha (Figura 7A). As pulverizações durante a fase de floração apresentaram maior eficiência tanto para controle de *Cladosporium* sp. quanto para a podridão total, apresentando a menor incidência de podridões, diferindo estatisticamente da fase de ervilha e pré-colheita e do tratamento controle (Figura 7B).

Tabela 6- Perda de massa (%) de cachos ao longo do processo de armazenamento em câmara fria por 28 dias e período de exposição à temperatura ambiente por 5 dias com diferentes agentes de controle e épocas de aplicação.

	Armazenamento	Ambiente
Tratamentos		
Testemunha	7,38 a	9,44 ab
LF	8,01 a	9,36 ab
L7K	7,99 a	10,03 a
Serenade	6,21 b	8,79 b
Épocas		
Testemunha	7,38 a	9,44 a
Floração	7,42 a	9,90 a
Chumbinho	7,52 a	9,47 a
Pintor	7,37 a	9,08 a
Pré-colheita	7,30 a	9,13 a

*Valores seguidos de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).



*Colunas apresentando letras similares são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Figura 7 - Incidência de podridões pós-colheita (%) ao final do período de armazenamento em câmara fria causadas por *Cladosporium* sp. e podridão

total em uva var. Midnight após a aplicação de agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos.

Por outro lado, houve efeito significativo na interação entre os agentes de controle e as épocas de aplicação pelo teste de F ($P > 0,05$) (Tabela 7) ao final do período total de duração do experimento, com predomínio de ocorrência de *Penicillium sp* e *Cladosporium sp*. O isolado LF reduziu a incidência sintomas causados por *Penicillium sp.*, sendo significativamente diferentes dos demais tratamentos e da testemunha apresentando menor incidência.

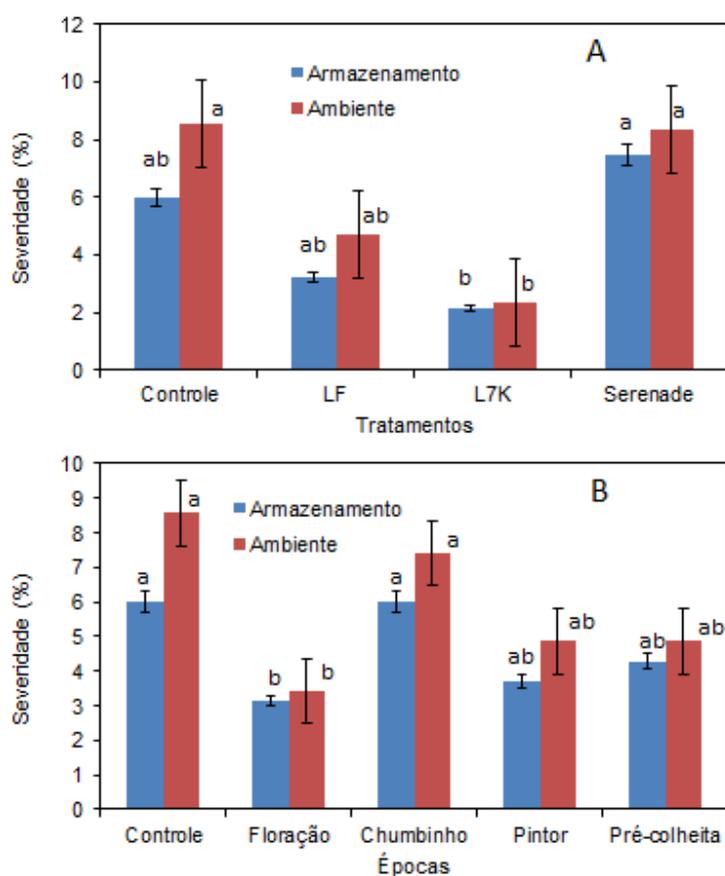
Tabela 7 - Incidência de podridões pós-colheita (%) em período de armazenamento e comercialização (36 dias) em uva var. Midnight por *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* e podridões em geral, após a aplicação de agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos.

Tratamento	Época				Total
	<i>Cladosporium sp.</i>				
	Floração	Ervilha	Pintor	Pré-colheita	
Testemunha	59,38 bA	59,38 aA	59,38 aA	59,38 bA	59,38 a
LF	59,38 bA	57,26 aA	50,65 aA	75,00 aA	60,13 a
L7K	71,88 aA	46,88 aAB	37,50 aB	53,13 bAB	51,50 a
Serenade	53,13 bA	59,38 aA	59,38 aA	53,13 bA	56,25 a
Total	61,50 A	54,50 A	49,00 A	60,38 A	
	<i>Penicillium sp.</i>				
Testemunha	43,75 aA	43,75 aA	43,75 aA	43,75 aA	43,75 a
LF	0,00 cB	16,13 bA	0,38 bB	3,13 bB	3,88 b
L7K	6,25 bB	40,63 aA	50,00 aA	53,13 aA	37,50 a
Serenade	43,75 aA	43,75 aA	53,13 aA	34,38 aA	43,75 a
Total	16,63	35,25	31,75	30,25	
	Podridão total				
Testemunha	71,88	71,88	71,88	71,88	71,88
LF	59,38	61,00	53,38	75,00	61,63
L7K	71,88	62,50	68,75	68,75	67,88
Serenade	59,38	62,50	68,75	56,25	61,63
Total	65,63	64,47	65,69	67,97	

*Valores seguidos de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

Não houve interação significativa entre os agentes de controle e as épocas de aplicação avaliadas ($P < 0,05$) ao final do período de refrigeração. O isolado L7K se mostrou eficiente, reduzindo a severidade e apresentando valor menor que 4%, diferindo estatisticamente do Serenade pelo teste de Tukey

($P < 0,05$) (Figura 8A). Após remoção da câmara fria e exposição à condições ambiente, o isolado L7K apresentou menos de 3% de severidade, com diferença significativa do serenade e testemunha com aproximadamente 9%. Para aplicações em diferentes épocas, foi observada baixa severidade para a época de Floração, tanto para condições refrigeradas como para condições ambientes (Figura 8B).



*Colunas apresentando letras similares são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

Figura 8 - Severidade de podridões pós-colheita (%) ao final do período de armazenamento (29 dias) em câmara fria e comercialização (5 dias) em uva var. Midnight (A) após aplicação de agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos (B).

De acordo com a tabela 8 houve interação significativa para os patossistemas avaliados. Para o *Cladosporium* sp., foi possível observar que só houve diferença significativa promovidas pelas diferentes épocas de aplicação, destacando a fase de pintor por apresentar a menor severidade,

diferindo estatisticamente das demais e da testemunha. Para *Penicillium* sp., os isolados LF e L7K diferiram significativamente do Serenade e da testemunha com baixa severidade, além disso, houve diferença estatística entre as épocas de aplicação com menor severidade, destacando as épocas de Floração e Chumbinho quando comparada a testemunha. Já para podridão total, os isolados LF e L7K apresentaram menor severidade, diferindo estatisticamente do Serenade e da testemunha, e se tratando das épocas de aplicação, as fases de chumbinho e pintor foram as que demonstraram maior eficiência apresentando baixa severidade e diferindo estatisticamente da testemunha.

Tabela 8 - Severidade de podridões pós-colheita (%) em período de comercialização (armazenamento em frio + ambiente) em uva var. Midnight por *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e podridão total após a aplicação de agentes de controle em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos.

Épocas	Tratamentos				Média
	Testemunha	LF	L7K	Serenade	
<i>Cladosporium</i> sp.					
Testemunha	5,20 aA	5,20 abA	5,20 bA	5,20 aA	5,20 ab
Floração	5,20 aA	4,34 cB	12,62 aA	3,65 bB	6,87 a
Chumbinho	5,20 aA	5,25 abA	3,54 cB	4,62 abAB	4,47 b
Pintor	5,20 aA	2,85cB	2,00 cB	4,57 abAB	3,14 c
Pré-colheita	5,20 aA	6,68 aA	2,74 cB	3,83 bB	4,41 b
Média	5,20 A	4,78 A	5,22 A	4,17 A	
<i>Penicillium</i> sp.					
Testemunha	5,14 aA	5,14 a	5,14 aA	5,14 aA	5,14 a
Floração	5,14 aA	0,00 bB	0,29 cB	6,51 aA	2,26 b
Chumbinho	5,14 aA	0,34 bC	1,14 bcB	4,28 aA	1,92 b
Pintor	5,14 aA	0,00 bC	3,37 bB	5,77 aA	3,04 ab
Pré-colheita	5,14 aA	0,23 bC	5,82 aA	3,54 bB	3,20 ab
Média	5,14 A	0,14 C	2,65 B	5,02 A	
Total					
Testemunha	10,68 aA	10,68 aA	10,68 aA	10,68 aA	10,68 a
Floração	10,68 aA	4,57 bcB	12,50 aA	10,50 aA	9,19 ab
Chumbinho	10,68 aA	6,22 bB	5,20 bB	9,02 aA	6,81 b
Pintor	10,68 aA	2,91 cC	5,37 bB	11,42 aA	6,56 b
Pré-colheita	10,68 aA	6,91 bB	9,48 aA	14,27 aA	10,22 ab
Média	10,68 A	5,15B	8,13AB	11,30A	

*Valores seguidos de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

DISCUSSÃO

Apesar dos estudos comprovarem a eficiência da aplicação de alguns microrganismos, ou biofungicidas, em tratamento pós-colheita para o controle de doenças, as infecções ainda são um fator limitante à conservação de frutas e hortaliças, podendo ocorrer desde a fase em campo até a etapa pós-colheita, comprometendo a produção. Segundo Ippolito e Nigro (2000), um antagonista aplicado no campo antes da colheita terá mais tempo para interagir com o agente patogênico, em comparação a um antagonista aplicado após a colheita. Dessa forma, estudos realizados utilizando microrganismos com pulverizações pré-colheita são considerados alternativas úteis para o controle de podridões pós-colheita (Cañamás et al., 2008a, Cañamás et al., 2008b, Droby et al., 2009; Ippolito e Nigro, 2000).

Os resultados apontaram a eficiência dos agentes de controle quanto à redução de incidência de podridões pós-colheita tanto durante o armazenamento em câmara fria quanto em condições ambiente quando aplicados em pulverização pré-colheita.

No experimento em var. Crimson Seedless com diferentes números de pulverizações próximas à colheita, não houve efeito sobre o peso dos cachos após armazenamento em câmara fria e condições ambiente. Já avaliando o efeito do tratamento com os diferentes agente de controle e épocas de aplicação na var. Midnight, observou-se que os isolados L7K e LF apresentaram cachos com menor peso (Tabela 5). Contudo em ambos os casos não houve efeito sobre a perda de massa ao longo do processo de armazenamento em câmara fria. Trabalhos como o de Meng et al (2010) avaliaram atuação de levedura *Cryptococcus laurentii*, e observaram que os tratamentos pré-colheita com apenas leveduras e levedura+quitosana após a colheita quando armazenados a 0 °C, durante 42 d, seguido por 3 d o armazenamento a 20 °C obtiveram perda de peso significativamente maior do que o controle em uvas.

O controle de doenças pós-colheita utilizando leveduras antagonistas muitas vezes envolve vários modos de ação, incluindo a competição por nutrientes e espaço, a produção de enzimas hidrolíticas, parasitismo, formação de biofilme e indução de resistência em plantas (Giobbe et al., 2007; Zhang et al., 2010; Mari et al., 2012; Lutz et al., 2013). Neste trabalho, observou-se que para as condições experimentais, com inoculação dos patógenos após colheita na var. Sagraone, os isolados de leveduras apresentaram maior eficiência para inibição dos patógenos.

Já com relação à severidade nas condições avaliadas da var. Sagraone, diante do armazenamento em câmara fria com os patógenos *A. niger* e *A. alternata*, intensificam-se a capacidade de sobrevivência das leveduras quando submetidos a diferentes condições de estresses, inclusive quando expostas ainda em campo.

A competição por nutrientes é considerada um dos mecanismos de ação de leveduras mais importantes devido à baixa exigência nutricional de muitas espécies de leveduras (Elad e Chet, 1987; Mekbib et al., 2011; Bautista-Rosales et al., 2013). Além disso, as leveduras podem estar associadas com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na resistência induzida, conforme observado no trabalho de Lu et al (2013), no qual a promoção de resistência pelo tratamento pré-colheita de tangerina com *Rhodosporium paludigenum* resultou em redução de podridões causadas por *Penicillium digitatum* e *P. italicum*.

A integração da aplicação de agentes de controle nas condições de armazenamento mostrou ser muito importante neste trabalho, com os melhores resultados sendo alcançados durante a fase de resfriamento. No entanto, esta integração com o frio depende da capacidade de sobrevivência do antagonista a baixa temperatura, pois pode interferir em sua eficácia para biocontrole (Meng et al., 2010). A refrigeração promove o retardamento da atividade da maioria dos microrganismos, além de moderar os processos metabólicos dos frutos, apresentando maior eficiência, quanto mais rápido for aplicada (Silveira et al, 2005). Karabulut et al (2003), por exemplo, observou que a levedura

Metschnikowia fructicola, reduz a incidência de podridão pós-colheita exposta a 1°C por 30 dias, seguidos de 2 dias a 20°C, a partir de aplicações pré-colheita em uva.

Ao avaliar o efeito do número de pulverizações no experimento realizado na var. Crimson Seedless, seguido do armazenamento sob refrigeração e condições de comercialização observou-se que o período de aplicações realizadas três semana antes da colheita contribuiu para uma menor incidência, destacando uma elevada suscetibilidade da uva às podridões quando em condições ambiente. Os resultados obtidos estão de acordo com Wei et al (2014), que relatam a maior redução da incidência do mofo cinzento em morango quando pulverizados com *Cryptococcus laurentii* em três aplicações com intervalos de 3 dias, sendo a primeira 6 dias antes da colheita e o último no dia da colheita. Apresentando a partir de 6 dias, uma percentagem de decomposição de frutas mais baixa do que os demais tratamentos.

Se tratando da severidade tanto em condições refrigeradas quanto de comercialização, alguns agentes se mostraram eficientes apresentando caixa severidade diante das variáveis analisadas. Ippolito et al (2005), avaliando a atuação da *Aureobasidium pullulans* em cereja com tratamentos pré-colheita após armazenamento (câmara fria + temperatura ambiente), relatou que a estirpe conseguiu reduzir em 50% as podridões na fruta quando comparado com o controle.

Avaliando diferentes agentes e épocas de aplicação na var. Midnight sobre a incidência tanto em condições refrigeradas, onde observou-se a eficiência dos isolados apresentando baixa incidência, principalmente na época de floração, como em condições de comercialização diante dos patógenos *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp (Tabela 7). De forma similar, Meng et al (2010) em uva de mesa e Tian et al (2004), em cereja doce, relataram a eficiência da levedura *Cryptococcus laurentii* quando pulverizada em pré-colheita, tanto armazenada em câmara fria, quanto após exposição em condições naturais, apresentando o melhor desempenho e conseqüentemente, proporcionando redução da doença quando em temperatura baixa 0 °C.

Se tratando da severidade, um dos agentes de controle avaliados se destacou com baixa severidade, bem como a época de floração (Figura 8B) nas duas condições expostas (refrigeração e comercialização), isso intensifica a importante estratégia de aplicações de agentes de controle durante a fase pré-colheita, visto que os microrganismos antagonistas interagem com os frutos, estabelecendo-se preferencialmente na epiderme e outros sítios, e competindo com o agente patogênico, reprimindo sua atividade e consequentemente protegendo de infecções subsequentes (Zhao et al., 2011; Wei et al., 2014).

Esses resultados são consistentes com o de Wei et al (2014), onde relatam a eficiência do controle biológico de pulverização pré-colheita com *C. laurentii* correlacionada com a sua frequência de aplicação. Além disso, as épocas de aplicações de microrganismos antagônicos e sua capacidade de sobreviver em populações suficientes sobre a superfície do fruto após a aplicação é de vital (Benbow e Sugar, 1999).

Dessa forma, verificou-se que tratamentos com agente de controle biológico na pré-colheita, apresentam potencial de inibição de podridões pós-colheitas, além de não prejudicar a qualidade do fruto durante o processo de armazenamento. Ainda são poucos os estudos específicos que determinem a melhor época de aplicação e número de aplicações para redução das doenças pós-colheitas. Dessa forma, foi possível constatar que além do potencial dos isolados de levedura apresentados, o número de aplicações e a época de pulverização são fatores que também podem influenciar na redução de podridão pós-colheita.

CONCLUSÕES

- Houve efeito da aplicação pré-colheita de diferentes isolados de leveduras L7K e LF reduzindo a incidência e severidade de podridões pós-colheita, apresentando elevada eficiência de controle.
- Aplicações pré-colheita realizada a partir da 3ª semana antes da colheita apresentaram redução na incidência e severidade de podridões em condições refrigeradas e de comercialização.
- Os isolados LF e L7K reduziram a incidência e severidade de podridões pós-colheita após armazenamento em câmara fria, destacando a floração como melhor época de aplicação.
- O Serenade se mostrou mais eficiente quando realizadas aplicações pré-colheita a partir da 3ª semana, destacando a floração como melhor época de aplicação.

AGRADECIMENTOS

A FAPESB, UNEB e EMBRAPA SEMIÁRIDO pela valiosa contribuição, durante o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Artés-Hernández, F., Tomás-Barberán, F.A. 2006. Modified atmosphere packaging preserves quality of SO₂-free 'Superior seedless' table grapes. *Postharvest Biology and technology* 39, Amsterdam, 146-154.

Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control. *Elsevier Science*. Amsterdam. 418p.

Bautista-Rosales, P.U., Calderon-Santoyo, M., Servin-Villegas, R., Ochoa-Alvarez, N.A., Ragazzo-Sanchez, J.A. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological control* 65, 293–301.

Benbow, J.M., Sugar, D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease* 83, 839-844.

Camargo, R.B., Peixoto, N.A., Terao, D., Ono, E.L., Cavalcanti, L.S. 2011. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no Pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. *Revista Caatinga* 24, Mossoró, n.1, 15-19.

Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Casals, C., Solsona, C., Teixidó, N. 2008a. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Postharvest Biology and Technology* 49, 86–95.

Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., Teixidó, N. 2008b. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biology and Technology* 49, 96–106.

Cantillano, R.F.F. 2006. Fisiologia e manejo na colheita e pós-colheita de morangos. In: CARVALHO SP (Coord.). *Boletim do Morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico*. Belo Horizonte: FAEMG, p. 160.

Cook, R.J. 2007. Model system in the science of biological control. In: Vincent, C., Goettel, M.S., Lazarovits, G. *Biological control: A global perspective*. CAB International, Wallingford, UK. 399–414.

Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm. *Postharvest Biology and Technology* 52, 137–145.

Elad, Y., Chet, I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77, 190–195.

FAO. 2010. The State of Food Insecurity in the World 2010: *Addressing food insecurity in protracted crises*. Rome. 57p. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103. 11228-11233.

Giobbe, S., Marceddu, S., Scherm, B., Zara, G., Mazzarello, V.L., Budroni, M., Migheli, Q. 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research* 7, 1389–1398.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola Municipal*. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=27&i=P>> Acesso em 21 Jan. 2014

Ippolito, A., Nigro, F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19, 715–723.

Ippolito, A., Schena, L., Pentimone, I., Nigro, F. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology* 36. 245–252.

Janisiewicz, W.J., Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40, 411–441.

Karabulut, O.A., Smilanick, J.L., Mlikota, Gabler, F., Mansour, M., Droby, S. 2003. Nearharvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. *Plant Disease* 87. 1384-1389.

Lima, M.F., Lopes, D.B., Tavares, S.C.C. de H., Tessmann, D.J., Melo, N.F. 2009. Doenças e alternativas de controle. In: SOARES, J.M., LEO, P.C. de S. (Ed.). *A vitivinicultura no Semiárido brasileiro*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Semi-Árido. 543-596.

Lu, L., Yea, C., Guoa, S., Shenga, K., Shaoa, L., Zhoua, T., Yua, T., Zheng, X. 2013. Preharvest application of antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum* induced resistance against postharvest diseases in mandarin orange. *Biological Control* 67. 130–136.

Lutz, M.C., Lopes, C.A., Rodriguez, M.E., Sosa, M.C., Sangorrin, M.P. 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic

yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology* 164, 166–172.

Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., Bertolini, P. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology* 73, 56–62.

Mekbib, S.B., Regnier, T.J.C., Korsten, L. 2011. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. *Tropical Plant Pathology* 36, 233–240.

Meng, X.H., Qin, G.Z., Tian, S.P. 2010. Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage. *LWT - Food Science and Technology* 43, 596–601.

Nunes, C., Manso, T. 2011. *Metschnikowia andawensis* as a new biocontrol agente of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 61, 64-71.

Nunes, C.A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology* 133, 181-196.

Oliveira, S.M.A., Terao, D., Dantas, S.A.F., Tavares, S.C.C.H. 2006. Patologia pós-colheita. In: OLIVEIRA, S.M.A., TERAO, D., DANTAS, S.A.F., TAVARES, S.C.C.H. *Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 855p.

Pearson, R.C., Goheen, A.C. (Ed.). 1988. Compendium of grape diseases. St. Paul: American Phytopathological Society, 92p.

Silveira, N.S.S., Michereff, S.J., Silva, I.L.S.S., Oliveira, S.M.A. 2005. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. *Caatinga*, Mossoró 18, n.4, 283-299.

Snowdon, A. 2010. A color atlas of post-harvest disease and disorders of fruits and vegetables. General introduction and fruits. London: *Manson Publishing* 1, 302p.

Soares, J.M., Leao, P.C. de S. (Ed.). 2009. A vitivinicultura no Semiárido brasileiro. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 756p.

Terao, D., Tavares, S.C.C.H., Silva, I.L.S.S., Saraiva, A.C.M., Choudhury, M.M. 2007. Patologia pós-colheita de uva. In: LIMA MAC (ed.). *Uva de mesa: pós colheita*. 2 ed. Brasília-DF. Embrapa Informação Tecnológica. 49-62.

Tian, S.P., Quin, G.Z., Xu, Y., Wang, Y.S. 2004. Application of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Acta Botanica Sinica* 46, n11. 1324-1330.

Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V.G., Cole, F.M. 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers : light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology*, 94, 850-857.

Wei, Y., Mao, S., Tu, K. 2014. Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry, *Biological Control* 73. 68-74.

Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control* 54, 172–180.

Zhao, Y., Wang, R., Tu, K., Liu, K. 2011. Efficacy of preharvest spraying with *Pichia guilliermondii* on postharvest decay and quality of cherry tomato fruit during storage. *African Journal of Biotechnology* 10. n 47, 9613-9622.