

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ISOLADOS DE
Bacillus spp. NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS,
CAUSADORES DE PODRIDÕES NO PERÍODO PÓS-COLHEITA DA
MAÇÃ

ROBERTA SOLDATELLI PAGNO

Caxias do Sul

2009

ROBERTA SOLDATELLI PAGNO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ISOLADOS DE
Bacillus spp. NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS,
CAUSADORES DE PODRIDÕES NO PERÍODO PÓS-COLHEITA DA
MAÇÃ

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia”.

Orientadora: Profa. Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

Caxias do Sul

2009

Quero dedicar este trabalho a Deus,
aos meus pais Lucia e Roberto,
à minha irmã Barbara
e ao meu noivo Renato.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, pela saúde e pela coragem para a realização de mais um objetivo na minha vida. A minha família - pai, mãe e irmã pelo apoio nos momentos difíceis, pela paciência e pela ajuda nos momentos em que precisei. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao meu noivo Renato, obrigada pela paciência nos momentos de ausência, e também pelo apoio nos momentos de recaída. Obrigada pela persistência! Estou muito feliz em compartilhar mais uma etapa da minha vida com você. Te amo muito!

A minha avó Rosa e ao meu avô Lineu pelo apoio e pela preocupação. Adoro vocês, vocês são um exemplo de coragem e persistência!! Também quero agradecer minhas tias, tios, primos, primas pelo apoio. Valeu!

A minha orientadora Rute Terezinha da Silva Ribeiro pelos seus ensinamentos e pelo conhecimento transmitido. Obrigada pela paciência e por acreditar na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Universidade de Caxias do Sul.

À colega Marli Camassola pela paciência e ajuda em fazer a eletroforese.

Às bolsistas do laboratório Elisa Zorzi e Fabiane Mezzomo pela ajuda na realização deste trabalho. Se não fosse pela ajuda de vocês, não teríamos o trabalho completo. Vocês estavam sempre dispostas, principalmente nos horários difíceis em que eu não poderia estar no laboratório porque não podia deixar o emprego. Obrigada pelas idéias, pelo conhecimento compartilhado. Foi muito gratificante para mim trabalhar com vocês.

À técnica do laboratório de Fitopatologia Márcia Pansera pela ajuda nos momentos de dúvidas, por me ouvir nos momentos de angústia e preocupação. Obrigada por acreditar!

À todos aqueles que fizeram a sua parte quando eu precisei – as bolsistas do laboratório de Fitopatologia Araceli, Camila, Fran, Jaque, Rose, e ao Luís. À colega Carol, obrigada por compartilhar seu conhecimento quando precisei. Sou eternamente grata!

Agradeço a empresa Agropecuária Schio Ltda. por ter cedido as maçãs para a realização deste trabalho.

À família Spigolon, da Linha Santana, em São Marcos, por emprestar um espaço na câmara fria para fazermos os testes com as maçãs.

À Mari e a Rosângela, da sala de lavagem e autoclavagem pelo apoio nos momentos de dúvida.

Enfim, caso não tenha citado alguém, agradeço a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e que torceram por mim.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1.INTRODUÇÃO	15
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A cultura da maçã.	17
2.2 Doenças fúngicas da macieira.	24
2.3 Doenças do período pós-colheita da maçã, causadas por fungos fitopatogênicos.	26
2.3.1 <i>Penicillium</i> sp.	29
2.3.2 <i>Botrytis cinerea</i>	33
2.3.3 Podridão causada por <i>Alternaria</i> sp.	36
2.4 Controle Biológico	39
2.4.1 Controle biológico com <i>Bacillus</i> spp.	45
2.4.1.1 Características do gênero <i>Bacillus</i>	45
2.4.1.2 Antibióticos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	47
2.4.1.3 <i>Bacillus</i> utilizados no controle biológico.	49
2.5. Análise protéica dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. por SDS-PAGE	51
2.5.1 Dosagem de proteínas totais	52
2.6 Impacto do controle biológico com espécies de <i>Bacillus</i> , sobre o ambiente e os organismos não-alvo	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	58

3.1 Isolamento e identificação de bactérias do solo.	58
3.2 Isolamento dos fungos causadores de podridão da maçã.	58
3.3 Seleção <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Bacillus</i> spp., com atividade antagonista.	59
3.4 Avaliação <i>in vitro</i> do antagonismo com os isolados de <i>Bacillus</i> spp.	60
3.5 Avaliação da estabilidade térmica dos metabólitos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	60
3.6. Testes <i>in vivo</i> de antagonismo na fruta.	61
3.7 Estimativa da massa molecular de proteínas por SDS-PAGE.	62
3.8 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.	63
3.9 Análises Estatísticas.	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	64
4.1 Isolamento e identificação dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	64
4.2 Seleção <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. com atividade antagonista.	65
4.3 Avaliação <i>in vitro</i> do antagonismo dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	67
4.4 Avaliação da estabilidade térmica dos metabólitos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	72
4.5 Antagonismo <i>in vivo</i>	76
4.5.1 Avaliação <i>in vivo</i> do filtrado da cultura dos isolados F62 e FR2B2.	83
4.6 Análise protéica.	86
4.7 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.	87
5 CONCLUSÕES.	89
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de maçã nos municípios do Rio Grande do Sul na safra 2008/09 (Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã 2009).	21
Tabela 2. Resumo das exportações por país no município de Vacaria, RS, em 2008 (Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã).	23
Tabela 3. Características bioquímicas e morfológicas dos isolados F62 e FR2B2.	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de <i>Penicillium</i> que causam podridão pós-colheita na maçã (Adaptado de Jones and Aldwinckle 1990).	30
Quadro 2. Tipos de antagonismos entre espécies importantes para o controle biológico de patógenos de plantas (Adapatado de Pal & Gardener 2006).	41
Quadro 3. Antibióticos produzidos por agentes de controle biológico (Adaptado de Pal & Gardener 2006).	43
Quadro 4. Produtos para o biocontrole a base de <i>Bacillus</i> spp. (Adaptado de Pal & Gardener 2006).	51
Quadro 5. Isolados de <i>Bacillus</i> spp. e as suas origens.	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação na produção de maçã pelos Estados brasileiros em relação ao período – 1990-2005 (Bittencourt & Mattei 2008).	18
Figura 2. Localização dos municípios produtores de maçã no Estado de Santa Catarina (Pereira <i>et al.</i> 2006).	19
Figura 3. Municípios produtores de maçã no Estado do Rio Grande do Sul (Atlas Sócio Econômico do RS).	20
Figura 4. Relação entre a quantidade de maçã brasileira exportada em relação ao período – 1990-2004 (Pereira <i>et al.</i> 2006).	22
Figura 5. <i>Penicillium</i> sp. em ágar batata-dextrose (Arquivo pessoal 2009).	30
Figura 6. <i>Penicillium</i> sp. visto ao microscópio óptico (Arquivo pessoal 2009).	31
Figura 7. “Mofo-azul” causado por <i>Penicillium expansum</i> (Jones and Aldwinckle 1990).	32
Figura 8. Colônia de <i>Botrytis cinerea</i> em ágar batata-dextrose (Arquivo pessoal 2009).	34
Figura 9. Conidióforo de <i>Botrytis cinerea</i> (Arquivo pessoal 2009).	35
Figura 10. Lesão inicial na maçã, causada por <i>Botrytis cinerea</i> (Jones & Aldwinckle 1990).	36
Figura 11. Lesões causadas por <i>Alternaria</i> sp., em maçãs (Jones & Aldwinckle 1990).	38
Figura 12. Conídios de <i>Alternaria</i> sp. (Arquivo pessoal 2009).	38
Figura 13. Esporo de <i>Bacillus</i> visto em microscopia eletrônica (Driks 2004).	46
Figura 14. Estrutura dos lantibióticos (Strein 2005).	49
Figura 15. Sistema descontínuo de eletroforese. 1ºetapa – aplicação das amostras, 2º etapa – início de migração das moléculas, 3ºetapa – concentração das moléculas de proteína numa estreita faixa entre os géis empilhador e separador e 4º etapa – corrida no gel de separação (Alfenas 1998).	52

Figura 16. Desenvolvimento de um produto de controle biológico (Adaptado de Montesinos 2003).	55
Figura 17. Halos de inibição produzidos pela cultura de isolados de <i>Bacillus</i> spp. contra fungos fitopatogênicos isolados da maçã. A) Placa mestra; B) <i>Alternaria</i> sp. versus isolados de <i>Bacillus</i> spp.; C) <i>Botrytis</i> sp. versus isolados de <i>Bacillus</i> spp. ; D) <i>Penicillium</i> sp. versus isolados de <i>Bacillus</i> spp..	66
Figura 18. Efeito de oito isolados de <i>Bacillus</i> spp. sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos: A) <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Botrytis</i> sp.; C) <i>Penicillium</i> sp. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,001$.	68
Figura 19. Desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos desafiados por dois isolados de <i>Bacillus</i> , em meio BDA. A) <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Alternaria</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. F62; C) <i>Alternaria</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. FR2B2; D) <i>Botrytis</i> sp.; E) <i>Botrytis</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. F62; F) <i>Botrytis</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. FR2B2; G) <i>Penicillium</i> sp.; H) <i>Penicillium</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. F62; I) <i>Penicillium</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. FR2B2.	69
Figura 20. Efeito do caldo de cultura autoclavado dos isolados de <i>Bacillus</i> spp., sobre o crescimento fúngico de: A) <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Botrytis</i> sp.; C) <i>Penicillium</i> sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,001$.	74
Figura 21. Desenvolvimento dos fitopatógenos em meio ágar batata dextrose enriquecido com o filtrado autoclavado dos isolados F62 e FR2B2; A) controle <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Alternaria</i> sp. X isolado F62; C) <i>Alternaria</i> sp. X isolado FR2B2; D) <i>Botrytis</i> sp.; E) <i>Botrytis</i> sp. X F62, F) <i>Botrytis</i> sp. X FR2B2.	75
Figura 22. Antagonismo <i>in vivo</i> na maçã. A) controle - <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Alternaria</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. F62; C) <i>Alternaria</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. FR2B2; D) controle - <i>Botrytis</i> sp.; E) <i>Botrytis</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. F62; F) <i>Botrytis</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. FR2B2; G) controle - <i>Penicillium</i> sp.; H) <i>Penicillium</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp. F62; I) <i>Penicillium</i> sp. X <i>Bacillus</i> spp.	

FR2B2.	76
Figura 23. Incidência de lesões desenvolvidas pelos fitopatógenos em frutas tratadas com as culturas de <i>Bacillus</i> spp. e armazenadas em temperatura ambiente: A) <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Botrytis</i> sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$	81
Figura 24. Desenvolvimento de lesões em frutas tratadas após o período de refrigeração: A) <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Botrytis</i> sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$	82
Figura 25. Número de lesões desenvolvidas pelos fitopatógenos em frutas tratadas com o filtrado dos isolados F62 e FR2B2 armazenadas em temperatura ambiente: A) <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Botrytis</i> sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$	83
Figura 26. Número de lesões desenvolvidas pelos fitopatógenos em frutas tratadas com o filtrado dos isolados F62 e FR2B2 após a retirada da câmara fria. A) <i>Alternaria</i> sp.; B) <i>Botrytis</i> sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$	85
Figura 27. Eletroforese em gel de poliacrilamida. A) marcador molecular; B) células de cultura do isolado F62; C) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm do isolado F62; D) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do isolado F62; E) células de cultura do isolado FR2B2; F) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm do isolado FR2B2; G) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do isolado FR2B2.	86
Figura 28. Concentrações médias de proteínas obtidas pelo método de Bradford. 1) células de cultura do isolado F62; 2) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm do isolado F62; 3) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do isolado F62; 4)	

células de cultura do isolado FR2B2; 5) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm
do isolado FR2B2; 6) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do
isolado FR2B2..... 88

RESUMO

A cultura da maçã tem se tornado uma das principais bases da economia dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo o primeiro o maior produtor da fruta no Brasil. A ampliação da demanda nas últimas décadas tem como principal motivo o aumento da exportação. Para isso, é necessário manter a qualidade da fruta desde o plantio até a chegada no mercado consumidor. As doenças pós-colheita são responsáveis por perdas significativas na produção, principalmente as causadas pelos fungos *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp.. Com a finalidade de combater infecções, fungicidas químicos são muito utilizados, mas os riscos de contaminação humana, ambiental e a seleção de linhagens resistentes de fitopatógenos têm levado ao desenvolvimento e emprego de novas alternativas. Entre elas, o controle biológico tem merecido destaque devido à descoberta de vários micro-organismos capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, entre os quais, algumas bactérias do gênero *Bacillus*. A produção de metabólitos com atividade antifúngica e a capacidade de resistência a vários tipos de estresses, são características que fazem deste tipo de micro-organismo um promissor agente de controle biológico. Com base no que foi exposto, o presente estudo teve como objetivo principal fazer uma avaliação do potencial antagonista de isolados de *Bacillus* spp., obtidos de amostras de solo, contra fungos causadores de podridão no período pós-colheita da maçã. Os fungos foram isolados de maçãs recém-colhidas. Com a finalidade de selecionar isolados com melhor atividade antagonista, realizaram-se testes de antagonismo *in vitro*, com destaque para dois isolados de *Bacillus* – F62 e FR2B2, que inibiram o crescimento micelial dos três fungos avaliados – *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp.. Também foi avaliada a estabilidade térmica dos metabólitos produzidos por estes isolados, no qual somente o (s) metabólito (s) do isolado F62 manteram a sua atividade, inibindo o crescimento micelial dos três fungos. A avaliação do antagonismo *in vivo* demonstrou que somente o caldo de cultura foi capaz de inibir o desenvolvimento de lesões, além de confirmar que o armazenamento das frutas a 0°C retarda o crescimento fúngico. A análise das proteínas por SDS-PAGE revelou a presença de proteínas somente no caldo de cultura não autoclavado, indicando que a inibição do desenvolvimento dos fungos pode ter ocorrido por moléculas protéicas e não protéicas, visto que os dois tipos de caldo foram eficientes na inibição dos fungos alvo.

ABSTRACT

The apple crop has become one of the main basis of the economy of the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, the first being the largest producer of fruit in Brazil. Increased demand in recent decades is the main reason of the increase in exports. Therefore, it is necessary to maintain the quality of fruit from planting to arriving to the consumer. The post-harvest diseases are responsible for significant losses in production, mainly caused by the fungus *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. and *Penicillium* sp.. In order to fight infections, fungicides are widely used, but the risks for of humans and environment and selection of resistant strains of pathogens have led to the development and use of new alternatives. Among them, biological control has been highlighted by the discovery of several microorganisms capable of inhibiting the growth of pathogenic fungi, including some bacteria of the genus *Bacillus*. The production of metabolites with antifungal activity and resistance to various types of stresses are features that make this type of micro-organism a promising biological control agent. Based on the foregoing, the present study aimed to make an assessment of the antagonist potential of 60 isolates of *Bacillus* spp., obtained from samples of soil of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, against fungi that cause rot in the post-harvest apple. The fungi were isolated from freshly harvested apples. In order to select strains with improved antagonistic activity, tests were antagonistic *in vitro*, with emphasis on two strains of *Bacillus* - FR2B2 and F62, which inhibited the mycelial growth of three fungi evaluated – *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. and *Penicillium* sp.. The thermal stability of the metabolites produced by these isolates was also analyzed. Evaluation of antagonism *in vivo* showed that only the culture medium was able to inhibit the development of lesions, and confirm that the storage of fruit at 0° C retards fungal growth. The analysis of proteins by SDS-PAGE revealed the presence of proteins only in the non-autoclaved culture medium, indicating that the inhibition of fungi may be due to protein and non-protein molecules, since the two types of broth were effective in inhibiting target fungi.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de produção de maçãs é de grande importância, em que o Brasil vem concentrando esforços para garantir a competitividade de mercado. Perdas na produção de frutas economicamente importantes decorrem da susceptibilidade às infecções fúngicas originadas no campo, assim como ao posterior ataque de micro-organismos patogênicos durante o transporte e armazenamento. De acordo com o Sebrae, o Rio Grande do Sul, o segundo maior produtor nacional de maçã, e Santa Catarina respondem por 95,6% da produção brasileira. No período de 2008-2009, o Rio Grande do Sul produziu 438.452 toneladas, segundo dados fornecidos pela AGAPOMI.

Muitas doenças podem afetar a qualidade das frutas, prejudicando a sua comercialização e o seu consumo. As doenças causadas por fungos predominam no período pós-colheita e os principais agentes causais são *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Phialophora malorum*, *Pezizula malicorticis* e *Mucor piriformis*, entre outros.

Vários métodos são utilizados para o controle de doenças após a colheita. O manejo convencional preconiza a aplicação de fungicidas e de antioxidantes e a sanitização com cloro, entre outras técnicas; no entanto, vários problemas são associados principalmente ao uso de fungicidas, como a seleção de linhagens fúngicas mais resistentes, a contaminação ambiental e os danos à saúde humana. Com esta preocupação, muitos pesquisadores estão buscando métodos alternativos de controle. Atualmente, faz parte do conhecimento científico que muitos micro-organismos e/ou seus metabólitos representam um grande potencial no controle de fungos patogênicos associados às plantas, sendo a sua utilização, uma alternativa para o controle das doenças.

Espécies de *Bacillus* têm sido usadas para o controle de diversas doenças de folhas e pós-colheita de hortifrutigranjeiros, sendo um importante agente para o controle biológico. Além disso, a capacidade de produzir endosporos resistentes ao calor é uma das principais características do

gênero, pois estes esporos permanecem viáveis por longos períodos, o que é desejável pelas biofábricas.

O solo é uma fonte inesgotável de bactérias do gênero *Bacillus*, muitas delas, provavelmente, com potencial como agentes de controle biológico. Para obter informações sobre as populações de bactérias de solos associados à cultura da maçã, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial antagônico de bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas em solos de localidades dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, contra os fungos *Penicillium* sp., *Botrytis cinerea* e *Alternaria* sp, comuns nos períodos pré- e pós-colheita da maçã na região produtora do Sul do Brasil. Os objetivos específicos foram os seguintes:

- isolar *Bacillus* spp. do solo, nas regiões produtoras de maçãs, do Sul do Brasil;
- identificar os isolados pela observação da morfologia e das suas características bioquímicas;
- selecionar *in vitro* os melhores isolados de *Bacillus* spp., quanto ao poder inibitório do desenvolvimento dos fungos alvo;
- avaliar *in vivo* o desempenho dos isolados de *Bacillus* spp., selecionados *in vitro*, na proteção de maçãs infectadas com os fitopatógenos e mantidas nas temperaturas de 0°C e 20°C;
- avaliar a atividade biológica do caldo de cultura bruto, dos isolados de *Bacillus* spp., selecionados *in vitro*, na proteção de maçãs infectadas com os fitopatógenos e mantidas nas temperaturas de 0°C e 20°C;
- identificar a presença de proteínas nos caldos de culturas dos *Bacillus* spp., por meio de eletroforese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da maçã

A macieira (*Malus* spp.) pertence à família Rosaceae. Originária da Europa e da Ásia, sua exploração comercial moderna no Brasil teve início na década de 60, em Santa Catarina. Em poucos anos, a maçã se transformou em produto de intensa comercialização no país. O principal mercado consumidor é São Paulo, onde a maior oferta do produto nacional ocorre no mês de fevereiro (Bertoni *et al.* 2006).

Segundo Pereira *et al.* (2006), a introdução da pomicultura no Brasil ocorreu, provavelmente, no município de Valinhos, no Estado de São Paulo, pelo fruticultor Batista Bigneti, em 1926. A partir deste ano, foram iniciadas algumas pesquisas isoladas com diferentes cultivares.

O surgimento da pomicultura no Estado de Santa Catarina foi favorecido por vários fatores, como: *i*) a decadência da atividade madeireira a partir de 1950; *ii*) a constatação técnica, com base em um pomar experimental no qual foram testadas várias espécies de frutíferas de clima temperado, de que a maçã era uma das espécies com melhor sucesso no município de Fraiburgo; *iii*) a ênfase por parte do governo federal na substituição de importações, tendo em vista a crise de divisas e ao fato de que, nos anos 1960, a maçã era o segundo item agrícola mais importante nas importações brasileiras, perdendo apenas para o trigo; *iv*) os incentivos fiscais concedidos. Na época, o reflorestamento era feito com *Pinus*, mas a Lei Federal 5.106, de 1966, previa a inclusão da macieira, impulsionando os produtores a investirem na pomicultura. Assim, o desenvolvimento da pomicultura brasileira é dividido em três períodos distintos: *i*) formação da estrutura de produção, que vai até o final dos anos 80, caracterizado pelo aumento da área plantada e da produção; *ii*) a partir de 1990, com a intensificação e consolidação da produção nacional no abastecimento do mercado interno e abertura de caminhos para a exportação, quando houve a conquista dos consumidores pelo preço e sabor; *iii*) o último período, a partir do final dos anos 90, que caracterizou-se pela reestruturação da produção,

com o surgimento dos programas de produção integrada de maçãs, com o cultivo de variedades mais adequadas às exigências dos consumidores e com maior produtividade (Pereira *et al.* 2006).

Dentre as fruteiras de clima temperado cultivadas no Brasil, a macieira foi a cultura que mais se desenvolveu nos últimos anos, sendo explorada comercialmente, principalmente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, sendo que Santa Catarina é o maior Estado produtor e, junto com o Rio Grande do Sul, representam mais de 95% da produção total (Bertoni *et al.* 2006; Bittencourt & Mattei 2008). A trajetória crescente da participação de Santa Catarina no cenário nacional e as grandes oscilações apresentadas pelo Rio Grande do Sul são ilustradas na Figura 1. Pode-se verificar também na mesma figura, que a participação do Estado do Paraná, praticamente se manteve em níveis baixíssimos ao longo de todo o período (1990-2005) (Bittencourt & Mattei 2008).

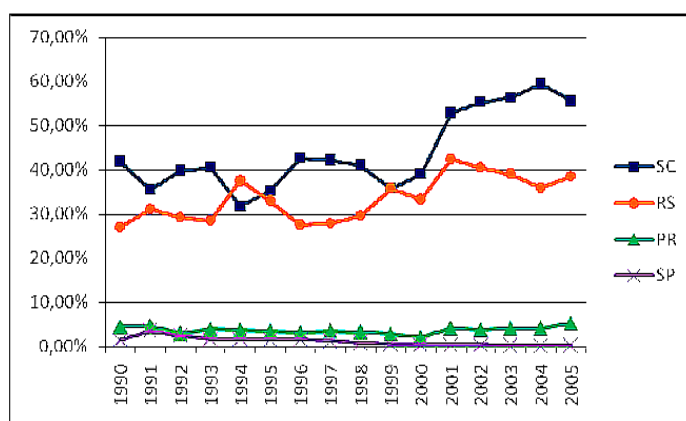


Figura 1. Participação na produção de maçã pelos estados brasileiros período 1990 - 2005 (Bittencourt & Mattei 2008).

A melhor condição climática do sul do País é um fator relevante para a maior produtividade da pomicultura. O fator determinante no plantio das macieiras numa região depende do período de baixa temperatura, necessário para o repouso vegetativo e conseqüente quebra de dormência. Como

mostra a Figura 2, a região de Fraiburgo, localizada no Meio-oeste Catarinense, tornou-se a maior área produtora do Brasil, ao lado de São Joaquim, também em Santa Catarina e Vacaria, no Rio Grande do Sul, agregando a estes municípios forte imagem associada à pomicultura (Bertoni *et al.* 2006; Coelho *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2006).

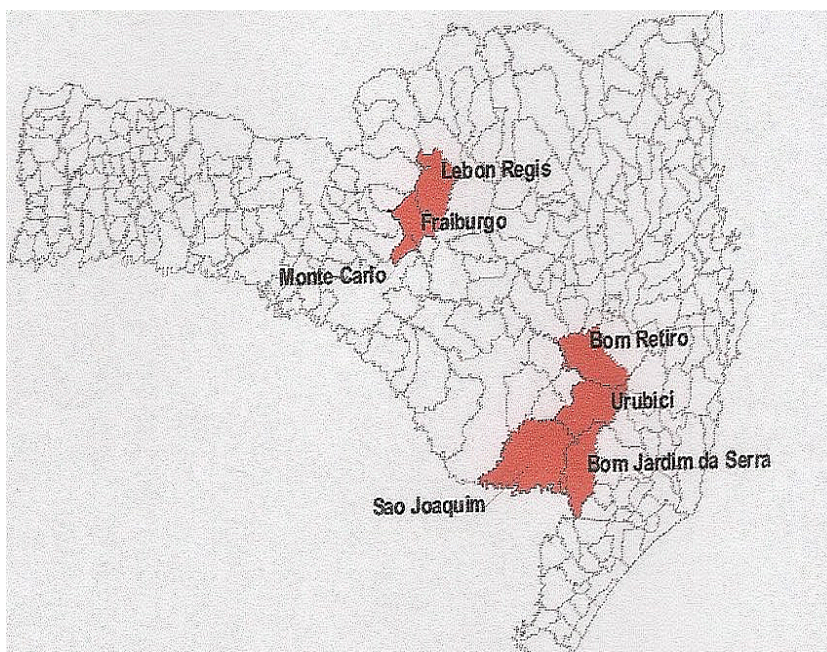


Figura 2. Localização dos municípios produtores de maçã no Estado de Santa Catarina (Pereira *et al.* 2006).

A região Serrana do Rio Grande do Sul é a maior área produtora do Estado (Figura 3). Os municípios que se destacam em função da sua produtividade e área cultivada (em hectares) são: Vacaria (5.995), Caxias do Sul (2.054), Bom Jesus (1.450), Muitos Capões (675), Monte Alegre (609), Ipê (470), São José dos Ausentes (368), Antônio Prado (251), São Francisco de Paula (237), Flores da Cunha (196), Lagoa Vermelha (167), Encruzilhada do Sul (145), outros (564,96), totalizando 13.181,96 ha (Bertoni *et al.* 2006).

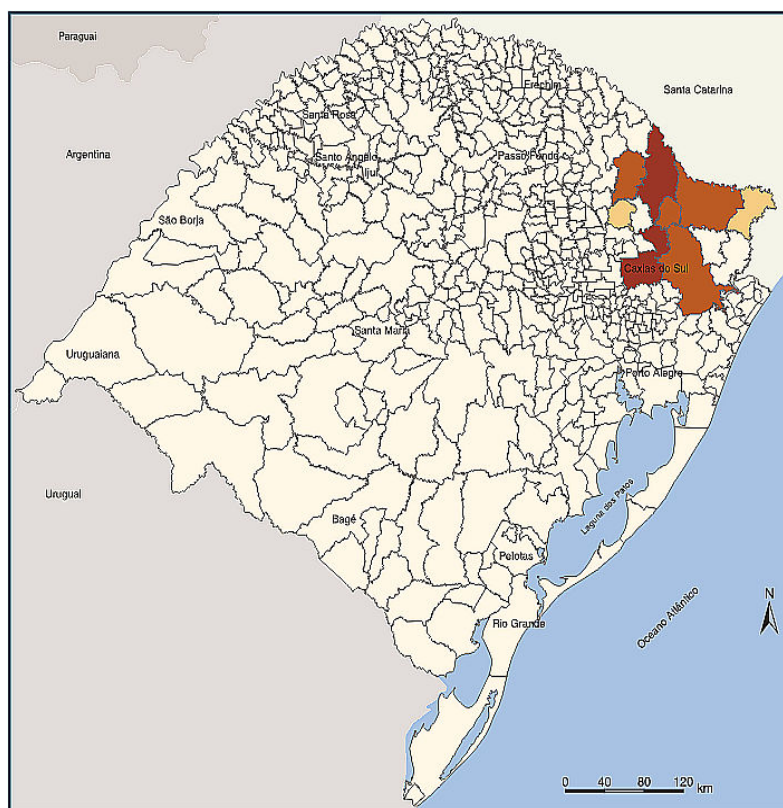


Figura 3. Região produtora de maçã no Estado do Rio Grande do Sul
(Atlas Sócio Econômico do RS).

Na Tabela 1 são apresentados os dados sobre a produção de maçã nos municípios do Rio Grande do Sul, na safra 2008-2009.

Tabela 1. Produção de maçã nos municípios do Rio Grande do Sul na safra 2008/09.*

MUNICÍPIO	GALA E	GOLDEN/	FUJI E	OUTRAS	TOTAL	SAFRA 07/08	Variação 2008/2009
	CLONES	BELG.	CLONES				
	t	t	t	t	t	t	
Vacaria	144.533	115	75.099	16.587	236.334	215.829	9,50
Caxias do Sul	36.249	43	18.936	3.074	58.302	49.190	18,52
Bom Jesus	19.248	4	18.242	770	38.264	32.910	16,27
Monte Alegre dos Campos	14.569	-	8.589	1.150	24.308	21.254	14,37
Muitos capões	16.094	-	6.317	1.176	23.587	18.987	24,23
São Francisco de Paula	9.359	274	6.817	291	16.741	14.072	18,97
Ipê	4.540	1	1.180	189	5.910	8.665	(31,79)
São José dos Ausentes	1.936	-	4.448	-	6.384	6.846	(6,75)
Antônio Prado	984	-	89	1.294	2.367	4.220	(43,91)
Campestre da Serra	2.660	-	758	-	3.418	3.073	11,23
Encruzilhada do Sul	3.030	-	34	300	3.364	2.249	49,58
Veranópolis	1100	-	65	1.340	2.505	2.039	22,85
Cambará do Sul	907	670	193	66	1.836	1.962	(6,42)
Canela	540	-	653	47	1.240	1.865	(33,51)
Lagoa Vermelha	2.984	-	668	246	3.898	1.784	118,50
Farroupilha	903	15	95	810	1.823	1.585	15,02
Jaquirana	1110	-	893	-	2.003	1.570	27,58
Flores da Cunha	525	-	6	449	980	1.507	(34,97)
Protásio Alves	500	-	-	200	700	1.143	(38,76)
Bento Gonçalves	601	-	209	28	838	1.110	(24,50)
Nova Paduá	606	-	36	62	704	686	2,62
Caseiros	1.240	-	159	331	1.730	575	200,87
São Marcos	501	-	136	31	668	245	172,65
Barracão	200	-	45	-	245	145	68,97
Gramado	135	-	45	-	180	130	38,46
Morro Redondo	-	-	-	120	120	30	300,00
Nova Petrópolis	3	-	-	-	3	3	0,00
TOTAL DA SAFRA 08/2009	265.057	1.122	143.712	28.561	438.452	393.674	11,37
PARTICIPAÇÃO VARIETAL (%)	60,45	0,26	32,78	6,51	100,00	-	-
TOTAL DA SAFRA 2007/2008	226.991	1.448	138.394	26.841	393.674	-	-
VARIAÇÃO DA SAFRA 07/2008	16,77	(22,51)	3,84	6,41	11,37	-	-

*AGAPOMI - Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã, 2009.

A produção brasileira de maçãs se expandiu significativamente nas últimas décadas. Aliado ao fato de o País possuir mais de trinta anos de tradição no cultivo comercial da fruta, fatores como a produção de variedades modernas, disponibilidade de terras, regiões com condições climáticas favoráveis e as recentes preocupações com produtividade e infra-estrutura de embalagem e conservação, transformaram o Brasil em um grande produtor. A cadeia produtiva da maçã possui inserção destacada no cenário da fruticultura brasileira, o que lhe confere inquestionável importância na economia nacional (Bertoni *et al.* 2006). O significativo crescimento da produção e a boa

aceitação das variedades nacionais consolidaram a queda das importações. E, à medida que o consumo aparente foi crescendo ao longo dos anos, este foi sendo suprido cada vez mais pela produção nacional, diminuindo a participação percentual no abastecimento pela maçã importada. A Argentina tem sido o principal fornecedor de maçã para o Brasil e a principal variedade importada é a Red Delicious, de coloração vermelha intensa (Pereira *et al.* 2006).

As exportações brasileiras de maçã iniciaram em meados dos anos 1980, viabilizadas por forte movimento dos produtores que objetivavam o aumento da qualidade de seus produtos. Nas décadas seguintes, devido ao alto crescimento da produção interna e qualidade da fruta bem aceita pelo consumidor externo e pelo preço atrativo, as exportações das maçãs brasileiras cresceram muito. Os volumes exportados de frutas atingiram um volume mais significativo a partir do início dos anos 1990, chegando, em 2004, em torno de 15% da produção nacional (Figura 4).

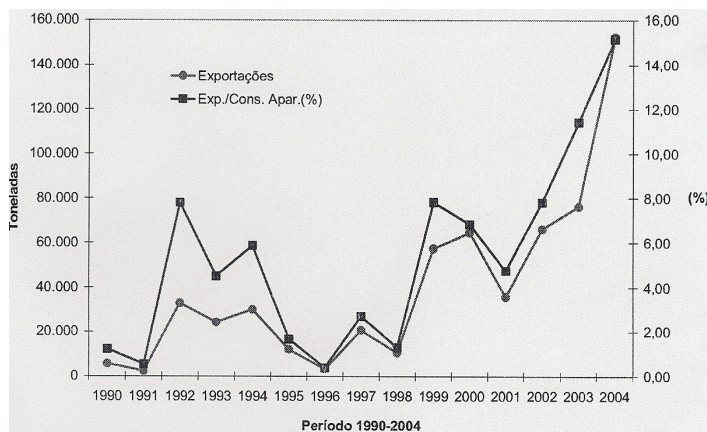


Figura 4. Relação entre a quantidade de maçã brasileira exportada no período 1990 - 2004 (Pereira *et al.* 2006).

Segundo a Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã, a Holanda foi o país, para o qual o município de Vacaria, RS, mais exportou no ano de 2008, seguido da Itália e Alemanha, com destaque para a cv. Gala (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo das exportações por país, no município de Vacaria, RS, em 2008.*

PAÍS	GALA E CLONES E CLONES	FUJI	CRIPPS PINK	BRAEBURN	TOTAL	VARIAÇÃO
Holanda	9.595	3.903	4.163	910	18.571	39,55%
Itália	2.336	1.244	287	0	3.867	8,24%
Alemanha	1.309	226	166	0	1.701	3,62%
Inglaterra	2.360	32	212	0	2.604	5,55%
Portugal	2.095	1.871	42	106	4.114	8,76%
Bélgica	1.524	106	444	0	2.074	4,42%
Irlanda	1.781	0	0	0	1.781	3,79%
França	4.449	169	614	0	5.232	11,14%
Filipinas	43	0	0	0	43	0,09%
Emirados Árabes	85	0	0	0	85	0,18%
Espanha	821	514	42	0	1.377	2,93%
Dinamarca	1.731	127	516	42	2.416	5,15%
Suécia	847	0	0	0	847	1,80%
Cingapura	42	0	0	0	42	0,09%
Oriente Médio	71	0	0	0	71	0,15%
Finlândia	339	0	0	0	339	0,72%
Hong Kong	42	0	0	0	42	0,09%
Libia	212	0	0	0	212	0,45%
Noruega	0	9	0	127	136	0,29%
Rússia	1.206	42	0	0	1.248	2,66%
Malta	42	0	0	0	42	0,09%
Kuwait	106	0	0	0	106	0,23%
TOTAL	31.036	8.243	6.486	1.185	46.950	100,00%

*AGAPOMI - Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã, 2009.

Os cultivares mais plantados no Brasil são Gala (46%) e Fuji (45%). Estes podem dividir-se, ainda, em Imperial Gala, Royal Gala, Mondial Gala, Fuji Suprema e outras. As maçãs destas variedades têm sabor e qualidade adequados à preferência dos consumidores, tanto nacionais quanto internacionais (Fioravanço 2009; Pereira *et al.* 2006). Atualmente, estão sendo plantadas também,

porém em menor escala, os cultivares: Senshu, Braeburn, Sansa e Jonagold, mutações mais coloridas de Gala e Fuji (Bertoni *et al.* 2006). O cultivar Gala produz frutos muito atrativos, com a epiderme lisa e brilhante. O tamanho dos frutos é de pequeno a médio e o formato redondo-cônico. A polpa é de coloração amarelo-creme, firme, crocante e suculenta. O cultivar Fuji apresenta frutos de tamanho médio a grande, redondos, epiderme fina, lisa, de coloração rosa-pálido. A polpa é aromática, amarelo-claro, firme, muito suculenta, de sabor doce e agradável (Fioravanço 2009).

2.2 Doenças fúngicas da macieira

A cultura da macieira é uma atividade muito competitiva e requer o uso constante da tecnologia. Assim, a pomicultura enfrenta uma série de desafios peculiares ao cultivo desta espécie, típica de clima temperado. Afora as dificuldades normais como a falta de adaptação das plantas em algumas regiões, deve-se ressaltar a importância das doenças, as quais podem comprometer a produção, caso não sejam eficientemente controladas. A macieira pode desenvolver várias doenças, muitas delas de ocorrência mundial, como é o caso da sarna, que é limitante para esta cultura. Entretanto, ainda existem vários desafios tipicamente brasileiros, como a mancha foliar de *Glomerella* cujo ciclo não é conhecido e o atual sistema de controle não é eficiente (Boneti & Katsurayama 1998).

A sarna, causada pelo fungo *Venturia inaequalis*, é uma das principais doenças foliares da macieira, sendo encontrada em todas as regiões produtoras de maçã do mundo. Os sintomas são típicos e manifestam-se nas folhas, ramos novos, flores, pedúnculos e frutos (Boneti & Katsurayama 1998, Cesa *et al.* 2006). No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez em 1950, no Estado de São Paulo (Cesa *et al.* 2006). A sarna da macieira pode ocasionar até 100% de perdas, caso não sejam adotadas medidas de controle (Santos & Wanser 2006).

O oídio da macieira, causado pelo fungo *Podosphaera leucotricha*, é uma doença muito disseminada nos países de clima semi-árido. O fungo pode infectar as folhas, ramos, flores e frutos,

onde produz uma massa esbranquiçada, formada por micélio e esporos, que pode cobrir todo o tecido verde da planta (Boneti & Katsurayama 1998; Xu, 1999). É uma das principais doenças de maçãs cultivadas em todo o mundo. Os prejuízos são causados pela infecção primária nos botões florais, ocasionando uma perda geral da vitalidade das plantas infectadas (Urbanietz & Dunemann 2005).

A mancha foliar de *Glomerella* está disseminada por todas as regiões produtoras de maçã do sul do Brasil, notadamente nas regiões de clima mais quente. A doença se manifesta durante o verão, causando desfolhamento severo das macieiras dos cultivares Gala, Golden Delicious, Granny Smith e Senshu (Boneti & Katsurayama 1998). A mancha das folhas da macieira, também conhecida como mancha foliar de *Glomerella*, ou mancha foliar da Gala, pode causar desfolhamento superior a 75% e consequentemente afetar a produção nos anos seguintes (Rolleberg, 2008).

A podridão amarga, causada pelo fungo *Glomerella cingulata*, cuja forma imperfeita corresponde ao *Colletotrichum gloesporioides*, é uma doença que está disseminada em todas as regiões produtoras de maçã do mundo, sendo menos frequente em regiões de clima mais frio (Boneti & Katsurayama 1998). As perdas de produção de maçãs no sul do Brasil, causadas somente pelo ataque de podridão amarga, podem chegar a 50%. Embora *G. cingulata* possa atacar frutos intactos, a agressividade parece ser maior e a evolução da doença mais rápida em frutos com ferimentos. A rapidez da evolução dos sintomas está diretamente relacionada às condições de temperatura e umidade relativa do ar (Denardi *et al.* 2003).

Já a podridão branca, causada pelo fungo *Botryospheria dothidea*, é uma doença amplamente disseminada nas regiões pomícolas de clima mais quente, causando podridão dos frutos e cancos de ramos (Boneti & Katsurayama 1998). A sua ocorrência é mais severa em anos quentes e chuvosos, resultando em elevado índice de podridão dos frutos. No campo, os sintomas mais evidentes são a murcha das folhas, seca dos galhos e morte dos ramos. O fungo *B. dothidea* não necessita de ferimentos para causar infecção, entretanto, na presença destes, ocorre rápida colonização e desenvolvimento de lesões (Santos *et al.* 2008).

A podridão carpelar é causada por vários fungos, principalmente *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea*, que se instalam na região carpelar, resultando na podridão interna seca ou mole do fruto (Boneti & Katsurayama 1998). A podridão carpelar da maçã é uma doença que vem se tornando importante no Brasil, incidindo em todos os pomares das regiões produtoras da fruta. Registros de perdas de frutos no período pós-colheita mostram valores de até 15% (Kretzschmar *et al.* 2007).

Além das doenças que ocorrem no pomar, existem as podridões pós-colheita, que ocorrem durante o armazenamento das frutas na câmara frigorífica, e são causadas por vários fungos, sendo mais comum as infecções por *Penicillium* sp., *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp. e *Botrytis cinerea* (Boneti & Katsurayama 1998).

2.3 Doenças do período pós-colheita da maçã, causadas por fungos fitopatogênicos

Os frutos, assim como as sementes e flores estão expostos a muitos micro-organismos, embora a maioria não consiga causar doença. Os fitopatógenos, freqüentemente, infectam frutos imaturos causando prejuízos menores, que aumentam gradativamente durante o amadurecimento dos frutos (Senhor *et al.* 2009).

As podridões resultantes da atividade de patógenos ocasionam graves perdas em produtos agrícolas, principalmente quando estes são cultivados em locais distantes da área de consumo. Durante o período denominado pós-colheita, os produtos que não são manipulados adequadamente, e/ou tratados com inibidores microbianos eficientes, podem perder a qualidade e ser considerados impróprios para a comercialização. As doenças pós-colheita podem se iniciar no campo, durante a ontogenia da fruta, ou surgirem depois da colheita, com a maturação fisiológica. Após a colheita, as frutas passam por uma série de transformações endógenas resultantes do metabolismo que se reflete em várias mudanças nas suas características, tais como textura, cor, sabor e aroma, indicativas do

processo de amadurecimento e posterior senescência. Durante esse período, as frutas geralmente tornam-se mais suscetíveis aos patógenos, devido principalmente ao aumento da predisposição às injúrias mecânicas, o que as transformam em substratos adequados ao rápido desenvolvimento de micro-organismos. As infecções pós-colheita podem ocorrer via epiderme, com a penetração direta do patógeno através da cutícula intacta, ou através de aberturas naturais na superfície das frutas, como as lenticelas. No entanto, muitas doenças são iniciadas através de ferimentos ocorridos durante ou após a colheita (Silveira *et al.* 2005).

A intensidade de doenças pós-colheita é diretamente proporcional ao período entre a colheita e o consumo, sendo a ocorrência influenciada pelas condições ambientais prevalentes no período. Embora as condições de estocagem afetem o desenvolvimento de doenças pós-colheita, a intensidade das perdas durante a estocagem também é influenciada pelas condições ambientais durante o crescimento do vegetal, escolha do cultivar, local de produção, sanidade do material, nutrição da planta, práticas culturais e pela aplicação de produtos químicos. Esses fatores podem influenciar diretamente o desenvolvimento posterior da doença, pela redução da fonte de inóculo ou pela inibição da infecção (Silveira *et al.* 2005).

Os patógenos responsáveis por doenças no período pós-colheita causam muitos danos à produção de maçã. Mais de 90 espécies de fungos foram descritas por causar podridões na maçã durante a estocagem. A importância de cada patógeno depende das condições climáticas e das condições de estocagem (Leinbinger *et al.* 1997). Os fungos são os principais causadores de doenças pós-colheita em frutas, como consequência do amplo número de espécies envolvidas e da diversidade e eficiência dos mecanismos de penetração nas mesmas (Silveira *et al.* 2005). As maçãs são frequentemente estocadas por 6 a 10 meses depois da colheita e estão sujeitas ao ataque de numerosos patógenos. Devido às técnicas de estocagem mais modernas, entre os anos 60 e 70, houve uma diminuição de 15-25% nos danos pós-colheita no cultivo da maçã (Jones & Aldwinckle 1990).

Atualmente, as perdas que produtores e/ou empacotadores de maçã têm, por causa das podridões em pós-colheita, podem atingir até 35 a 40% da fruta refrigerada (Sanhueza 2009).

Dentre os fungos causadores de podridão no período pós-colheita da maçã, podem ser citados *Penicillium* sp., *Botrytis cinerea*, *Monilinia* sp., *Nectria* sp., *Gloesporium* sp., *Phialophora malorum*, *Pezicula malicorticis*, *Mucor piriformis* e *Alternaria* sp.. No entanto, vários outros fungos são encontrados durante o período de comercialização das frutas, principalmente quando são expostas a altas temperaturas, por exemplo (Jones & Aldwinckle 1990; Kupferman 1986). A maioria dos fungos que causa doença em frutas no pós-colheita não apresenta seletividade na escolha pelo hospedeiro, sendo que as diferenças na susceptibilidade de frutas a esses organismos envolvem uma série de defesas do hospedeiro, além da disponibilidade de inóculo e do nicho ecológico específico. Os estágios durante os quais o fungo torna-se quiescente podem ser a germinação do esporo, o alongamento do tubo germinativo, a formação de apressório, a penetração e a colonização. A ocorrência e a manutenção do patógeno em quiescência sobre o hospedeiro ou dentro dele indicam um equilíbrio dinâmico entre hospedeiro, patógeno e meio ambiente (Silveira *et al.* 2005).

As doenças pós-colheita em maçãs são frequentemente difíceis de serem identificadas somente por meio da observação dos sintomas. Muitos patógenos não esporulam durante o armazenamento em baixas temperaturas como 0-4°C e sob condições de atmosfera controlada. Assim, para se fazer a identificação correta do patógeno, é necessário isolá-lo através da remoção de uma parte da pele da fruta, e também da polpa, se esta estiver com lesão, e colocar em ágar batata dextrose para que o agente causal se desenvolva plenamente (Jones & Aldwinckle 1990).

A armazenagem das maçãs é feita em câmaras frigoríficas, onde são depositadas em caixas de madeiras (bins) sobrepostas, que comportam aproximadamente 3000 frutas. Quando alguma maçã está contaminada com podridão, a doença se propaga rapidamente, contaminando as outras frutas ao seu redor, sendo estimado que em 12 dias, 80% das maçãs da caixa são contaminadas, comprometendo posteriormente todo o estoque (Bassanezi & Júnior 2005).

Os fungos responsáveis por causar danos no período pós-colheita da maçã podem ser divididos em dois principais grupos: aqueles que causam danos primariamente após a colheita e aqueles que também causam danos na fruta no campo. No último grupo, a infecção ocorre no campo, mas permanece quiescente ou é adquirida no momento da colheita. Como forma de controle, é importante proteger a fruta antes da colheita (Jones & Aldwinckle 1990).

A seguir serão comentados os principais aspectos referentes aos fungos fitopatogênicos *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp., estudados neste trabalho, responsáveis por podridão no período pós-colheita da maçã.

2.3.1 *Penicillium* sp.

A podridão pós-colheita causada pelo fungo *Penicillium* spp. é conhecida como “mofo azul” e é considerada a doença mais importante nas maçãs no pós-colheita (Pianzolla *et al.* 2004; Sanhueza 2009). As variedades Fuji e Gala, sob condições favoráveis à doença, são semelhantemente afetadas pelo fungo (Blum *et al.* 2007). Antes do uso da estocagem em condições de atmosfera controlada e do uso de fungicidas após a colheita, as perdas chegavam a 90%, enquanto que atualmente, com técnicas mais modernas de estocagem, as perdas são menores que 1%. Contudo, esta doença ainda é a mais comum. Pelo menos onze espécies de *Penicillium* foram isoladas de maçãs infectadas naturalmente por este fungo, como mostra o Quadro 1.

Dentro do gênero, a espécie *P. expansum* é a mais comum e importante economicamente. Todas as espécies produzem denso crescimento micelial de coloração esverdeada quando cultivado em ágar batata-dextrose, e os conídios são pequenos, esféricos ou elípticos (Figuras 5 e 6) (Brackmann *et al.* 1996; Janisiewicz 1999; Jones & Aldwinckle 1990).

Quadro 1. Espécies de *Penicillium* que causam podridão pós-colheita na maçã.*

Espécies	Sinônimo para Espécie	Cultura	Relatos de Doenças em Pomares
<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx	<i>P. cyclopium</i> Westling <i>P. martensii</i> Biourge <i>P. solitum</i> Westling	Maçã, pera Maçã Maçã	Borecka, 1977 Heald & Ruehle, 1931 Koffmann & Penrose, 1987
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx		Maçã	Barkai-Golan, 1974
<i>P. crustosum</i> Thom		Maçã, pera	Prusky & Ben-Arie, 1985
<i>P. diversum</i> Raper & Fennell		Maçã	Borecka, 1977
<i>P. expansum</i> Link		Maçã, pera	Heald & Ruehle, 1931
<i>P. funiculosum</i> Thom		Maçã	Combrink <i>et al</i> , 1985
<i>P. puberulum</i> Bainier	<i>P. commune</i> Thom	Maçã, pera	Koffmann & Penrose, 1987
<i>P. rugulosum</i> Thom		Maçã	Barkai-Golan, 1974
<i>P. spinulosum</i> Thom		Maçã	Borecka, 1977
<i>P. verrucosum</i> Dierckx		Maçã	Heald & Ruehle, 1931
<i>P. viridicatum</i> Westling	<i>P. olivinoviride</i> Biourge	Maçã	Heald & Ruehle, 1931

*Adaptado de Jones & Aldwinckle 1990.

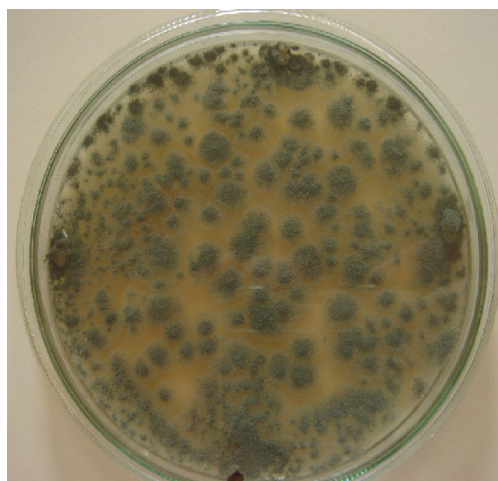


Figura 5. *Penicillium* sp. em ágar batata-dextrose (Arquivo pessoal 2009)

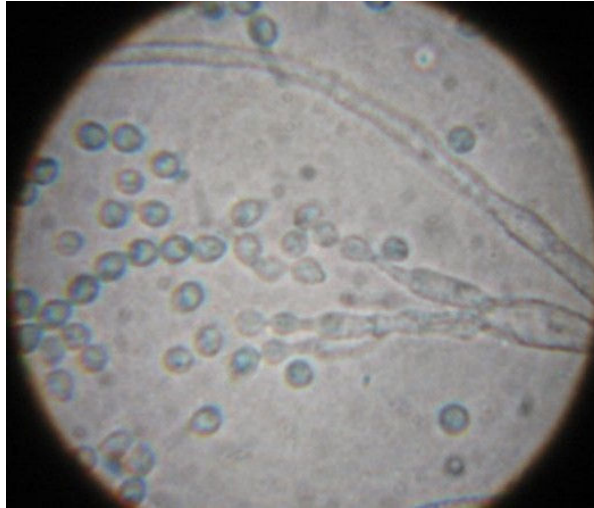


Figura 6. *Penicillium* sp. visto ao microscópio óptico (Arquivo pessoal 2009).

Penicillium spp. colonizam a epiderme da fruta e podem iniciar a infecção, se a mesma apresentar ferimentos. Este fungo produz, em grande quantidade, longas correntes constituídas pelas estruturas de frutificação chamadas conídios sobre a epiderme dos tecidos colonizados, mesmo a 0°C e tanto na presença de luz como no escuro. Os conídios são disseminados pelo ar em todas as instalações das empacotadoras e câmaras frias. Ainda, quando os frutos são suspensos em água para lavagem ou classificação, estas estruturas do patógeno os contaminam e infectam durante seu processamento (Sanhueza 2009). A podridão é aquosa, mole e profunda, com margens internas e externas bem definidas. A área de penetração do fungo se apresenta como uma mancha aquosa e translúcida, adquirindo tons de bege claro, tanto na epiderme quanto na polpa. Em condições de alta umidade, desenvolvem-se, sobre a área afetada, pequenas massas brancas e azuis constituídas de micélio e conídios do fungo (Figura 7). A podridão é de desenvolvimento rápido e os tecidos afetados podem ser destacados facilmente das frutas (Girardi *et al.* 2002). O forte odor associado à podridão também é uma das características da doença.

P. expansum produz uma micotoxina, denominada patulina, que contamina produtos derivados de frutas como maçã, pêra e uva (Paterson 2006). Além de *P. expansum*, outros fungos são capazes de produzi-la, como algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Byssochlamys* (Welke *et al.* 2009). A patulina é encontrada principalmente em maçãs maduras utilizadas na produção de suco concentrado. Possui forte atividade antibiótica contra várias bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, inclusive *Mycobacterium tuberculosis*, além de possuir atividade antifúngica. Todavia, não pode ser usada para tratamento dos frutos devido aos seus efeitos tóxicos. Ensaio em animais demonstraram que a patulina tem grande espectro de toxicidade, incluindo mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade (Pádua & Júnior 2005).



Figura 7: “Mofa-azul” causado por *Penicillium expansum* (Janisiewicz 1999).

Penicillium sp. pode ser isolado do solo dos pomares, mas a doença é rara no campo, exceto nos casos em que a fruta tenha caído no chão. A maioria das infecções ocorre quando conídios presentes no ar penetram nos ferimentos durante a colheita e manuseio da fruta. Estes conídios podem ter como origem caixas de armazenamento e bins durante a colheita. Contudo, muitas infecções podem surgir durante a estocagem através de esporos presentes em águas, como nas soluções pós-colheita e na água utilizada durante a classificação das frutas (Jones & Aldwinckle 1990).

O controle de *P. expansum* e de outras espécies de *Penicillium* é desejável para diminuir a perda da fruta causada pela podridão. O controle também minimiza os riscos de contaminação dos sucos e derivados de maçãs pela patulina (Sanhueza 2009).

Para o controle do “mofo azul”, a sanitização e métodos para minimizar ferimentos na colheita e no manuseio das frutas são essenciais. Bins e embalagens contaminadas podem ser desinfetadas após o uso. Frutas danificadas devem ser removidas das caixas de armazenamento diariamente para reduzir fontes de conídios (Jones & Aldwinckle 1990). A falta de cuidado na eliminação rápida de refugo, o uso de embalagens sujas com terra ou restos de frutas e a substituição pouco frequente da água de lavagem são fatores que contribuem, decisivamente, para aumentar o número de estruturas dos patógenos causadores das podridões. Os métodos de controle da podridão por *Penicillium* são bem conhecidos no Brasil e incluem medidas que asseguram a diminuição da suscetibilidade da fruta às infecções, tais como a utilização de fungicidas em pré e pós-colheita; a colheita no ponto adequado para cada cultivar; armazenagem da fruta sob condições de atmosfera controlada e a diminuição da população do agente causal (Sanhueza 2009). Como forma alternativa de controle, o emprego de agentes biológicos têm sido estudado por muitos cientistas no mundo inteiro (Janisiewicz 1999).

2.3.2 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea é um fitopatógeno que ataca mais de 200 espécies diferentes de plantas (Govrin & Levine 2000, Zheng *et al.* 2000). Pode penetrar diretamente nos tecidos vegetais saudáveis através de ferimentos (Zheng *et al.* 2000). Conhecida como “mofo cinza” a doença causada pelo patógeno *Botrytis cinerea* é a segunda doença pós-colheita mais importante em maçãs estocadas, podendo ser encontrada em todas as partes do mundo. A doença se desenvolve rapidamente em temperaturas baixas, podendo causar grandes perdas devido à sua habilidade de disseminação, infectando frutas sadias durante a estocagem.

Em ágar batata dextrose, as colônias de *B. cinerea* são primeiramente brancas, tornando-se cinzas com o passar do tempo (Figura 8). Os conídios são hialinos, redondos ou ovais (Figura 9). O fungo também produz esclerócitos de coloração preta quando cultivados em cultura. Os esclerócitos não são encontrados em frutas danificadas na estocagem, mas podem ser formados em frutas caídas no chão do pomar. Os isolados de *B. cinerea* provenientes dos pomares são altamente variáveis, sendo que alguns formam conídios em cultura, e outros produzem somente esclerócitos ou esclerócitos com alguns conídios. Há uma segunda espécie do gênero, *B. mali*, que é responsável por causar podridão em maçãs, mas há poucas informações sobre ela. Sabe-se que apresenta muitos esclerócitos pequenos, conidióforos ramificados e conídios menos redondos que aqueles apresentados por *B. cinerea* (Jones & Aldwinckle 1990).

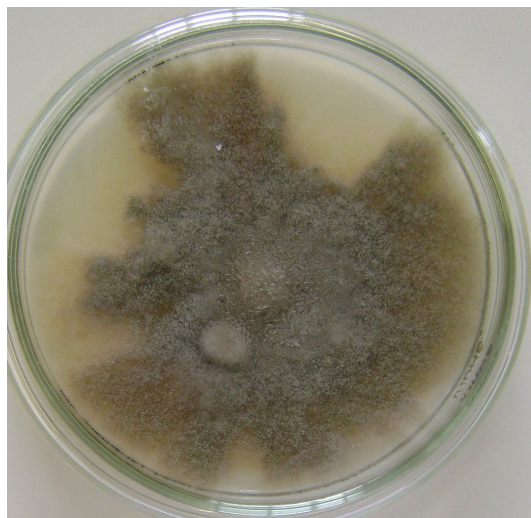


Figura 8. Colônia de *Botrytis cinerea* em ágar batata dextrose (Arquivo pessoal 2009).

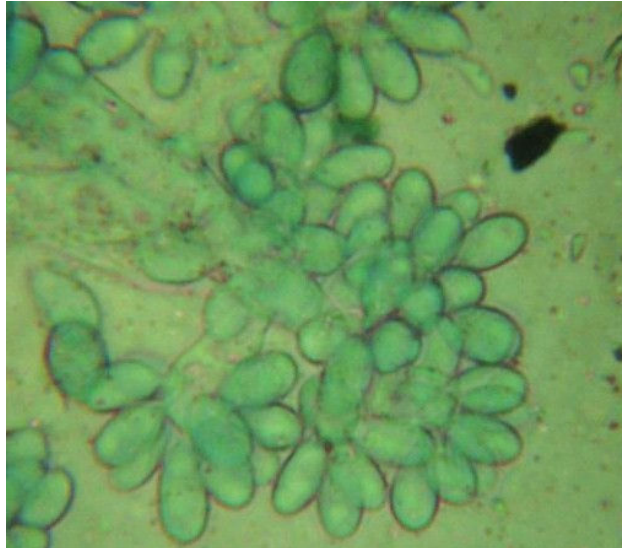


Figura 9. Conidióforo de *Botrytis cinerea* (Arquivo pessoal 2009).

As lesões causadas por *B. cinerea* nas maçãs apresentam primeiramente uma cor pálida, sem margens definidas. Com o passar do tempo, o centro das lesões torna-se marrom escuro, e as bordas permanecem com uma coloração mais clara. Em frutas não maduras, a lesão é sólida e não é separada facilmente do resto dos tecidos (Figura 10). Em estágios mais avançados, há um odor característico da podridão. Sob alta umidade, um micélio de coloração branco a cinza se desenvolve nas áreas superficiais da fruta. Em baixas temperaturas, é difícil ocorrer esporulação e, quando ocorre, o micélio torna-se acinzentado (Jones & Aldwinckle 1990).

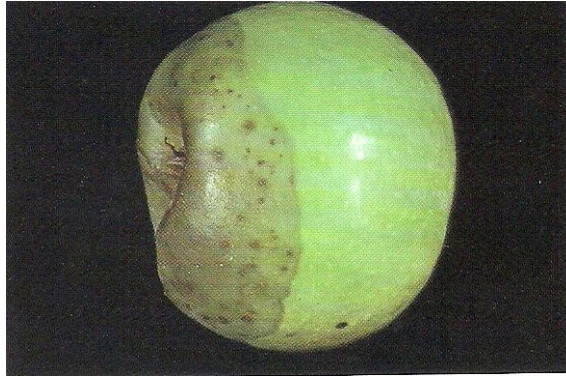


Figura 10. Lesão inicial na maçã, causada por *Botrytis cinerea* (Jones & Aldwinckle 1990).

B. cinerea é o único patógeno que pode iniciar a infecção em pós-colheita, cuja penetração ocorre diretamente pela epiderme das frutas. Contudo, o início da podridão é facilitado pela ocorrência de lesões ou ferimentos. Assim, uma fruta sadia pode ser infectada ou pelo contato com outra doente, após um processo de maceração da epiderme da fruta sadia, causado pelo fungo. Essa situação conduz à formação de “ninhos” de podridão, ou seja, grupos de frutas afetadas, freqüentemente unidas pelo micélio cinzento de *Botrytis*. A podridão causada por *B. cinerea* é raramente vista no campo, embora este patógeno seja um saprófito comum na matéria orgânica presente no chão dos pomares (Girardi *et al.* 2002; Jones & Aldwinckle 1990).

2.3.3 Podridão causada por *Alternaria* sp.

A podridão causada por *Alternaria* sp. está presente em muitas áreas do mundo, nas quais a maçã é cultivada. Contudo, raramente causa prejuízos importantes, embora, nos últimos anos tenha sido observado um aumento da incidência da doença associado com o uso de fungicidas benzimidazólicos, no controle do “mofo azul” e do “mofo cinza”, no período pós-colheita (Jones & Aldwinckle 1990).

A lesão causada por *Alternaria* é mais ou menos seca, circular, firme, levemente deprimida e geralmente profunda. Na epiderme, apresenta cor marrom escura ou preta e, em condições de alta umidade, pode ser observado o crescimento de micélio verde-acinzentado. Internamente, a podridão é, no início, marrom e, mais tarde, na área central, podem ser observadas áreas pretas e cinzentas, levemente desidratadas e firmes. As margens entre tecido sadio e doente são bem definidas (Girardi *et al.* 2002), como pode ser observado na Figura 11.

Nos pomares, o fungo pode ser encontrado normalmente na superfície das plantas, especialmente em folhas, flores e frutas. A penetração nas frutas e nas áreas lesionadas é associada à escaldadura e a ferimentos causados por insetos. A infecção ocorre, em geral, ainda no campo, antes da armazenagem refrigerada das frutas (Girardi *et al.* 2002). Em meio de cultura, *Alternaria* spp. produz micélio escuro e os seus conidióforos são ramificados, individuais ou em grupos, as vezes septados, com um ou vários conídios. Os conídios formados são longos, frequentemente dispostos em cadeia, de coloração ouro, ovais ou elipsoidais (Figura 12) (Jones & Aldwinckle 1990).

O gênero *Alternaria* inclui espécies patogênicas e não patogênicas e a espécie relacionada é *A. alternata* (Jones & Aldwinckle 1990). Existem diferentes formas (f. sp.) de *A. alternata*, cada uma produzindo toxinas específicas para a patogênese em diferentes hospedeiros.

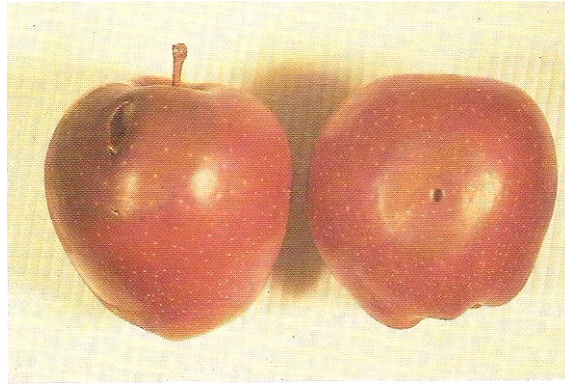


Figura 11. Lesões causadas por *Alternaria* sp., em maçãs (Jones & Aldwinckle 1990).



Figura 12. Conídios de *Alternaria* sp. (Arquivo pessoal 2009).

A podridão causada por *Alternaria* não é adequadamente controlada pelos fungicidas disponíveis (Jones & Aldwinckle 1990), porém diversas medidas podem ser utilizadas para o controle da doença, como: *i*) evitar ferimentos nas frutas durante a colheita e o armazenamento; *ii*) desinfetar as caixas de armazenamento com cloro ou vapor antes de serem preenchidas com frutas; *iii*) monitorar as condições de temperatura e atmosfera de armazenamento, bem como outras condições para manter as frutas em boas condições; *iv*) transferir as frutas do pomar para a câmara fria, o mais rápido possível; tratar a água dos tanques, onde as frutas são banhadas, com cloro para reduzir o número de propágulos de micro-organismos.

2.4 Controle Biológico

A introdução de bactérias benéficas visando aumentar a produtividade das culturas é uma atividade praticada, empiricamente, há séculos. Intuitivamente, agricultores percebiam que adicionar ao solo comum, solo onde leguminosas haviam sido cultivadas, aumentava a produtividade do primeiro. Pesquisas foram sendo realizadas em torno dessa idéia e, em 1896, já era registrada a primeira patente nos EUA sobre o uso de *Rhizobium* sp. para inoculação de sementes. A partir da década de 1940, por todo o mundo, uma grande ênfase foi dada ao uso de fungos como agentes de biocontrole e também de vírus atenuados para imunização de plantas contra estirpes virulentas, passando por estudos com solos supressivos e micorrizas, numa evolução rápida, ainda que por etapas. O uso de organismos procariotos para o biocontrole de enfermidades de plantas parece ter se iniciado há apenas algumas décadas. Yin *et al.* (1957; 1965), selecionaram uma cultura de *Streptomyces* sp. de uma coleção de 4.000 actinomicetes isolados de raízes de algodão e alfafa com forte atividade antagônica *in vitro* contra *Verticillium albo-atrum* e *Rhizoctonia solani* (Romeiro 2007).

Doenças de plantas precisam ser controladas para manter a qualidade e a quantidade de produtos alimentares. Há diferentes formas de abordagem para prevenir, suavizar e controlar estas doenças; as mais utilizadas são os fertilizantes e os pesticidas (Pal & Gardener 2006). Porém, o uso de pesticidas inclui alguns problemas associados como falhas no controle de patógenos (populações resistentes de patógenos), contaminação ambiental, atingindo as águas superficiais e subterrâneas e danos à saúde humana. Esses e outros motivos, como a pressão da sociedade por produtos livres de agroquímicos têm exigido dos pesquisadores e da indústria maior empenho em programas de controle biológico (Melo & Azevedo 1998).

No campo, a produtividade das frutas está relacionada à aplicação de fungicidas, o que pode incrementar o nível de contaminantes químicos indesejáveis no produto final, somando-se o efeito deletério já proporcionado pelas toxinas fúngicas naturais. Os métodos de controle biológico

constituem alternativas viáveis em relação ao químico tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas (Coelho *et al.* 2003).

O controle biológico, também conhecido como biocontrole, tem sido utilizado em diferentes campos da biologia, principalmente na entomologia e na patologia de plantas. Na fitopatologia, são empregados antagonistas microbianos para suprimir doenças, bem como para controlar a população de patógenos de um hospedeiro específico. Assim, o organismo utilizado para o biocontrole é chamado de agente de controle biológico (ACB). Portanto, controle biológico é a introdução massal de ACBs capazes de reduzir a população de um ou mais patógenos ou as suas atividades. ACBs também podem ser incluídos na combinação de atividades de um solo nativo e plantas associadas com organismos que contribuem para o controle biológico (Pal & Gardener 2006).

O controle biológico de doenças pós-colheita tem mostrado bons resultados, podendo ser realizado durante o ciclo da cultura ou após a colheita. O controle feito ainda no campo tem por objetivo evitar a penetração de patógenos nos tecidos e o seu posterior desenvolvimento no período de armazenamento. Já o controle após a colheita tem como objetivo evitar que os patógenos latentes causem podridões e impedir novas infecções. Em condições de pós-colheita, é possível realizar o controle por ser economicamente viável, haver limitação de superfície de aplicação dos antagonistas e capacidade de controlar as condições ambientais (Senhor *et al.* 2009).

Os princípios do controle biológico baseiam-se em ações antagonistas entre os micro-organismos, e muitos deles inibem fitopatógenos por competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos (Júnior *et al.* 2000). O Quadro 2 exemplifica os diferentes tipos de antagonismos entre organismos, com seus respectivos mecanismos e alguns exemplos de cada interação.

Quadro 2. Tipos de antagonismos entre espécies importantes para o controle biológico de patógenos de plantas. *

Tipo	Mecanismo	Exemplos
Antagonismo direto	Hiperparasitismo/predação	Líticas/Micoviroses Não-líticas <i>Ampelomyces quisqualis</i> <i>Lysobacter enzymogenes</i> <i>Pasteuria penetrans</i> <i>Trichoderma virens</i>
Outros tipos de antagonismo	Antibióticos	2,4-diacetylphloroglucinol Fenazinas Lipopeptídeos cíclicos
	Enzimas líticas	Quitinases Glucanases Proteases
	Produtos do metabolismo	Amônia Dióxido de carbono Hidrogênio cianidro
Antagonismo indireto	Competição	Exsudatos Sideróforos Competição por espaço
	Indução da resistência do hospedeiro	Contato com a parede celular fúngica Indução mediada por fitohormônios

* Adaptado de Pal & Gardener, 2006.

O antagonismo direto resulta do contato físico do patógeno com o antagonista. O parasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo, pois os hiperparasitas estão sujeitos às mesmas variações ambientais que organismo parasitado. Dentre os fungos filamentosos, *Trichoderma* é reconhecidamente o hiperparasita mais importante e um dos mais estudados (Júnior *et al.* 2000; Pal & Gardener 2006). Em contraste, o antagonismo indireto não depende do contato direto entre o patógeno e o antagonista, mas sim de atividades desenvolvidas pelo antagonista antes de ocorrer o parasitismo. Estimulação de defesa natural do hospedeiro por agentes de controle biológico é a forma mais indireta de antagonismo (Pal & Gardener 2006).

Muitos micro-organismos produzem e secretam um ou mais compostos com atividade antibiótica e, algumas vezes, estas substâncias são particularmente efetivas para suprimir patógenos de plantas e as doenças que eles causam. Em todos os casos, estes antibióticos podem ser efetivos na supressão do crescimento do patógeno tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e devem ser produzidos em

quantidades suficientes para resultar em um controle biológico eficaz. Como exemplo de bactéria biocontroladora, *Bacillus cereus* linhagem UW8 é uma espécie produtora de antibióticos (Quadro 3) (Pal & Gardener 2006).

Quadro 3. Antibióticos produzidos por agentes de controle biológico.*

Antibiótico	Origem	Patógeno alvo	Doença	Referências
2,4- diacetil-floroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium</i> spp.	Tombamento	Shanahan <i>et al.</i> 1992
Agrocin 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Coroa de galha	Kerr 1980
Bacilomicina D	<i>Bacillus subtilis</i> AU 195	<i>Aspergillus flavus</i>	Contaminação por aflatoxina	Moyne <i>et al.</i> 2001
Bacilomicina, fengicina	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	Murcha	Koumoutsi <i>et al.</i> 2004
Xantobacina A	<i>Lysobacter</i> sp., SB-K88	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	Tombamento	Islam <i>et al.</i> 2005
Gliotoxina	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Podridão da raiz	Wilhite <i>et al.</i> 2001
Iturina A	<i>B. subtilis</i> OST713	<i>Botrytis cinerea</i>	Tombamento	Paulitz & Belanger 2001; Kloepper <i>et al.</i> 2004
Micosubtilisina	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Tombamento	Leclere <i>et al.</i> 2005
Pioluteorina, pirrolnitrina	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i> e <i>R. solani</i>	Tombamento	Howell & Stipanovic 1980
Zwitermicina A	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Phytophthora medicaginis</i> e <i>Pythium aphanidermatum</i>	Tombamento	Smith <i>et al.</i> 1993

*Adaptado de Pal & Gardener, 2006

Diversos micro-organismos secretam e excretam metabólitos que podem interferir com o crescimento dos patógenos e suas atividades. Muitos produzem e liberam enzimas líticas que podem hidrolisar uma variedade de compostos poliméricos, incluindo quitina, proteínas, celulose e DNA. A secreção destas enzimas pode suprimir os patógenos de plantas. Como exemplo, o controle do fungo *Sclerotium rolfsii* por *Serratia marcescens* é mediado pela expressão de quitinases (Pal & Gardener 2006).

Outro mecanismo de controle biológico se dá através da competição por nutrientes, resultando na diminuição da incidência e severidade de doenças de plantas (Pal & Gardener 2006).

As plantas são cercadas por diversos tipos de micro-organismos, alguns dos quais podem contribuir para o controle biológico das suas doenças. Devido à facilidade de cultivo, muitas pesquisas estão sendo realizadas com vários gêneros bacterianos, como por exemplo *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* e com fungos, *Ampelomyces*, *Coniothyrium*, *Dactylella*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* (Pal & Gardener 2006).

Embora um número relativamente expressivo de importantes doenças possa ser controlado biologicamente, em termos práticos, poucas doenças têm sido controladas, dadas as limitações impostas aos produtos biológicos, tais como sensibilidade aos fatores ambientais, extrema especificidade, problemas de formulação, tempo de aplicação, persistência do efeito, etc. Por sua vez, no tocante à comercialização de agentes de biocontrole, há um número de fatores críticos que contribuem para o modesto desenvolvimento e o insucesso de formulações biológicas, como confiabilidade dos agricultores, relação custo-benefício, registro do produto por órgãos governamentais, etc (Melo & Azevedo 1998).

2.4.1 Controle biológico com *Bacillus* spp.

2.4.1.1 Características do gênero *Bacillus*.

O gênero *Bacillus* compreende um grupo heterogêneo de bactérias quimiorganotróficas. São Eubactérias Bacillaceae, geralmente Gram-positivas, formadoras de endosporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas. Uma das suas principais características é a capacidade para produzir endosporos resistentes ao calor. Estas bactérias podem secretar substâncias comercialmente importantes como enzimas amilolíticas e proteolíticas, e antibióticos, muitos dos quais com atividades antifúngicas (Melo & Azevedo 1998).

Algumas espécies de *Bacillus* resistem a vários tipos de estresse, principalmente aqueles que ocorrem no solo, *habitat* comum deste gênero, formando endosporos. Os esporos são protegidos por uma membrana resistente, têm reduzido conteúdo de água e nenhuma atividade metabólica, sendo estes fatores essenciais para a sobrevivência das células. Contudo, os esporos inertes podem retornar ao crescimento sempre que as condições abióticas voltarem ao normal. Na presença de nutrientes, o processo de germinação é iniciado e, dentro de poucos minutos, os esporos retornam ao estado vegetativo. Endosporos podem ser visualizados por microscopia eletrônica, revelando que eles são constituídos por diversas camadas concêntricas (Figura 13).

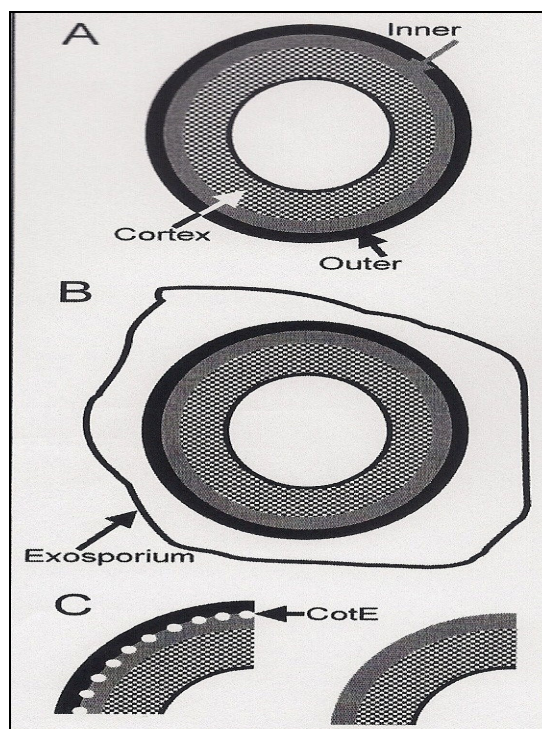


Figura 13. Esporo de *Bacillus* spp. (Driks, 2004).

No interior do esporo, denominado de *core*, estão os cromossomos com proteínas ácido-solúveis e DNA. Uma membrana lipídica e uma espessa camada de peptidoglicanos envolvem o *core*. A maior porção, o córtex, não contém peptidoglicanos e sua função é manter a atividade do *core* relativamente baixa, sendo essencial para a resistência do esporo. Ao redor do córtex, há uma estrutura em várias camadas denominada de *coat*, responsável pela resistência do esporo e pela sua germinação, possuindo funções enzimáticas que permitem a interação dos micro-organismos com o meio ambiente. Um número de espécies, incluindo *B. anthracis* e *B. thuringiensis*, possuem também uma camada adicional denominada de exoesporo, ausente em *B. subtilis*. Sua função é desconhecida (Driks 2004).

2.4.1.2 Antibióticos produzidos por *Bacillus* spp.

Os antibióticos são metabólitos secundários que se acumulam no meio de cultura no fim da fase de crescimento exponencial dos micro-organismos. Muitos destes produtos não são essenciais para o desenvolvimento daqueles que os produzem, no entanto, são favorecidos em relação aos não produtores. Em baixas concentrações, essas moléculas afetam o crescimento e as atividades metabólicas dos organismos alvo (Raaijmakers *et al.* 2002). Muitas delas tem atividade antibiótica e têm sido utilizados com fins terapêuticos no tratamento de doenças infecciosas (Melo 2005).

A maioria dos antibióticos produzidos por espécies de *Bacillus* são polipeptídios de baixo peso molecular, sintetizados no ribossomo ou por outros mecanismos. Dentre os sintetizados pelo ribossomo podem ser citados: gramicidina, tirocidina, bacitracina, micobacilina e subtilisina (Mannanov & Sattarova 2001). Os outros antibióticos são oligopeptídeos que contêm uma cadeia de ácido graxo, que exhibe alta atividade antibacteriana e antifúngica, representado por surfactina, iturina e fengicina (Tamehiro *et al.* 2002).

Peptídeos produzidos no ribossomo são sintetizados durante a fase de crescimento e os não ribossômicos ao seu final. A função destes antibióticos para os micro-organismos ainda não está totalmente esclarecida; no entanto, a teoria mais aceita relata que os antibióticos têm como responsabilidade a competição com outros micro-organismos durante a germinação do esporo.

Segundo Tamehiro *et al.* (2002), *B. subtilis*, isolado 168 é um dos mais estudados do gênero, sendo responsável por produzir três antibióticos ribossômicos – TasA, subtilisina e sublancina, e dois antibióticos não ribossômicos – surfactina e bacilisina, que contêm uma longa cadeia hidrofóbica. Os mesmos autores isolaram e identificaram também um novo antibiótico produzido por esse isolado de *Bacillus*, denominado bacilisocina, o qual contém uma estrutura fosfolipídica.

Outros autores como LI Qi-qin *et al.* (2006), relataram que *B. subtilis* B11 produz duas substâncias antimicrobianas termoestáveis, indicando que exibem alta rigidez, têm estruturas cíclicas e/ou hidrofóbicas e geralmente são resistentes a hidrólise por peptidases e proteases.

Em relação ao controle biológico Silo-Suh *et al.* (1994), identificaram dois antibióticos fungistáticos produzidos por *B. cereus* UW85, agente utilizado no controle biológico de doenças causadas por *Phytophthora medicaginis*, na alfafa. O primeiro, denominado zwittermicina A, representa uma nova classe de antibióticos produzidos por *Bacillus* spp., e inibe o alongamento do tubo germinativo dos fungos filamentosos. A segunda substância, denominada de antibiótico B, inibe fracamente o alongamento do tubo germinativo.

Leifert e colaboradores (1995) demonstraram que os antibióticos produzidos por *B. subtilis* CL27 e *B. pumilus* CL45 são tão eficazes quanto um fungicida comercial no controle das murchas causadas por *B. cinerea*.

Munimbazi & Bullerman (1997) isolaram um metabólito antifúngico e termoestável de *B. pumilus* que inibiu o crescimento micelial de várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, inibindo também a produção de aflatoxinas, ochratoxina A e patulina.

Bacillus spp. também produzem lantibióticos, que são peptídeos antibacterianos que exibem características estruturais únicas (Mannanov & Sattarova 2001), isto é, contém o aminoácido lantionina e/ou metil-lantionina (Figura 14). Os lantibióticos possuem alta atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas como *Propionibacterium acnes*, estafilococos, estreptococos e clostrídios.

Bottone & Peluso (2003) isolaram um composto antifúngico produzido por *B. pumilus* que inibiu a germinação dos esporos e o alongamento das hifas de *Mucor* e *Aspergillus*.

Kavitha *et al.* (2005), relataram que um fenômeno incomum na supressão de doenças fúngicas é a produção de proteínas antifúngicas (PAF) por *Bacillus* spp., que em geral são

polipeptídeos, como, por exemplo, a fungicina M-4, um composto de 34 resíduos de aminoácidos de sete tipos, produzido por *B. licheniformis*. Os mesmos autores, também isolaram e caracterizaram parcialmente uma proteína antifúngica termoestável produzida por *B. polymyxa* VLB16, responsável por inibir o crescimento de *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani*, agentes causais de doenças no arroz.

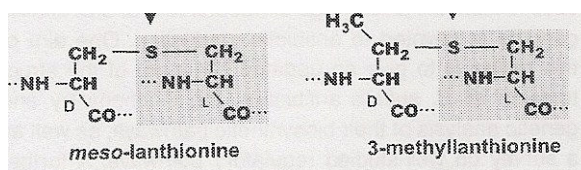


Figura 14. Estrutura dos lantibióticos (Stein 2005).

2.4.1.3 *Bacillus* utilizados no controle biológico

Vários micro-organismos têm sido relatados como potenciais agentes de biocontrole contra uma variedade de fungos fitopatogênicos. Entre eles estão as bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Bacillus* (Feio *et al.* 2004). *Bacillus* spp. produzem uma série de antibióticos e possuem habilidade para formar esporos, além de produzirem várias substâncias antimicrobianas (Edwards & Seddon 2001). São capazes de produzir mais de setenta diferentes antibióticos, e *B.subtilis* é um dos maiores produtores destas substâncias no gênero. Muitos autores têm sugerido que o uso de antimicrobianos produzidos pelo gênero *Bacillus*, pode ser uma alternativa ou um método suplementar ao tratamento químico (Foldes *et al.* 2000).

Estas bactérias podem antagonizar fungos patogênicos por competição por nicho e nutrientes, produção de compostos fungitóxicos de baixo peso molecular e por enzimas líticas extracelulares, e indiretamente, pelo estímulo da capacidade de defesa pelo hospedeiro da planta (Leclère *et al.* 2005).

Bacillus subtilis é um agente de controle biológico reconhecidamente eficaz contra fungos fitopatogênicos (Batista Junior *et al.* 2002; Utkhede & Sholberg 1986; Singh & Deverall 1984; Pusey

& Wilson 1984; Pettit *et al.* 1968). Utkhede & Sholberg (1986) relataram que 24 isolados de *Bacillus subtilis* do solo exibiram atividade antagonística diferenciada contra *P. expansum* e *B. cinerea*, e 21 isolados contra *Mucor piriformis*, e a eficácia do controle biológico dependeu do isolado e da temperatura de estocagem da maçã.

Espécies de *Bacillus* têm sido usadas para controle de diversas doenças de folhas e do período pós-colheita. Competição, antibiose, indução de resistência sistêmica (ISR) e hiperparasitismo, provavelmente estão envolvidos no controle de doenças por *Bacillus*. Certamente as células vegetativas estariam mais envolvidas que os endoesporos em iniciar estes mecanismos, porém parte dos endoesporos pode germinar e ser ativa nestes mecanismos (Collins & Jacobsen 2003).

De acordo com Coelho *et al.* (2003), no Brasil, Tavares (1996) obteve uma redução de *Penicillium expansum* em até 80%, utilizando *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, sendo o resultado obtido superior ao controle químico. As perspectivas também indicaram resultado satisfatório no controle simultâneo de diversos patógenos, aplicando metabólitos de *Bacillus* spp.

Para as biofábricas, a capacidade de formar endoesporos por isolados de *Bacillus* spp. facilita a estocagem de produtos biológicos em longo prazo e facilita, relativamente, a sua comercialização como agente de controle biológico. Dessa forma o sucesso numa formulação de *Bacillus* spp. para uso em doenças de plantas é fácil de ser alcançado.

O Quadro 4 apresenta algumas formulações de produtos contendo *Bacillus* spp. para utilização em doenças de plantas existentes no EUA.

Quadro 4. Produtos para o biocontrole a base de *Bacillus* spp..

Nome do Produto	Produtor	Espécie de <i>Bacillus</i>	Tipo da formulação	Alvo principal
Serenade	AgraQuest, Davis, CA	<i>B. subtilis</i> QST 713	Pó molhável, suspensão aquosa	Fungos e bactérias em frutas e vegetais
EcoGuard	Novozymes, Salem, VA	<i>B. licheniformis</i> SB3086	Solução aquosa	Sclerotinia homoeocarpa
kodiak	Gustafson, Plano, TX	<i>B. subtilis</i> GB03	Pó molhável	Fungos no algodão, sementes grandes de legumes, soja
Yield Shield Bio Yield	Gustafson Gustafson	<i>B. pumilus</i> GB34 <i>B. amyloliquefaciens</i> GB99 + <i>B. subtilis</i> GB122	Pó molhável Grânulos secos	Fungos na soja
Subtilex	Beker Underwood, Ames, IA	<i>B. subtilis</i> MB1600	Pó molhável	Fungos em plantas de canteiros
Hi Stick L + Subtilex	Beker Underwood	<i>B. subtilis</i> MB1600 + rhizobium	Solução aquosa	Fungos no algodão, sementes grandes de legumes, soja
				Fungos na soja, amendoim

*Adaptado de Paul & Gardener, 2006.

2.5. Análise protéica dos isolados de *Bacillus* spp. por SDS-PAGE

A evidenciação de proteínas e ácidos nucléicos pela eletroforese é precisa e valiosa para estudos taxonômicos, filogenéticos, fisiológicos e genéticos em plantas, animais, micro-organismos e partículas virais. Focalizando definidas enzimas, proteínas ou ácidos nucléicos, seu emprego tem se destacado, por exemplo, na identificação de certos grupos de fungos, bactérias e nematóides (Alfenas, 1998).

A eletroforese com SDS (dodecil sulfato de sódio) em gel de poliacrilamida é utilizado na separação de cadeias polipeptídicas e visa a determinação da massa molecular de proteínas. A proteína é desnaturada por aquecimento a 100°C, na presença de β -mercaptoetanol, que reduz as

ligações dissulfídicas (S-S) por ruptura e do detergente SDS. Esse sistema consiste de géis formados por fases de diferentes porosidades e valores de pH, além de utilizar Tris-HCl como solução tampão do gel. As amostras protéicas são aplicadas nas cavidades do gel empilhador e as moléculas migram da parte mais porosa (gel empilhador) para a menos porosa (gel separador) (Figura 15) (Alfenas, 1998).

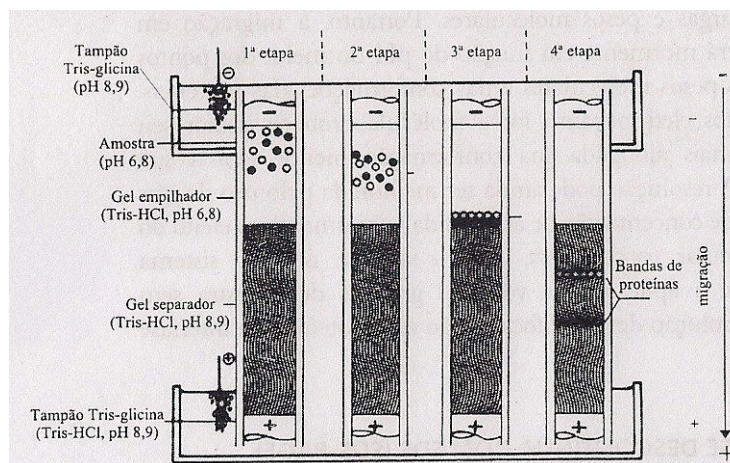


Figura 15. Sistema descontínuo de eletroforese (Alfenas 1998).

Após a separação das proteínas, o gel pode ser colorido para a visualização das bandas. Comassie blue é considerado padrão nas colorações, pois detecta a maior parte das proteínas. Coloração com prata é mais sensível, mas detecta pouca quantidade de bandas (Walker & Rapley 2008).

2.5.1 Dosagem de proteínas totais

Muitos métodos espectrofotométricos, ao longo dos anos, têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Os métodos geralmente mais utilizados são o do biureto, de Lowry, do “Coomassie

brilliant blue” BG-250 ou reagente de Bradford, do BCA ou reagente de Smith, e de absorção de proteínas no ultravioleta (Zaia *et al.* 1998).

O método descrito por Bradford (1976) para a determinação de proteínas totais é um método rápido e sensível, quando comparado aos outros métodos existentes. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Zaia *et al.* 1998).

2.6 Impacto do controle biológico com espécies de *Bacillus*, sobre o ambiente e os organismos não-alvo

O controle de doenças pós-colheita de frutas ainda baseia-se no uso de fungicidas sintéticos. Entretanto, a aplicação indiscriminada de fungicidas sintéticos vem sendo desencorajada por afetar a saúde humana e o ecossistema, aliado ao aumento da resistência antimicrobiana, com surgimento de cepas fúngicas resistentes. Os métodos físicos e biológicos constituem alternativas viáveis e desejáveis, que vêm ocupando o espaço dominado atualmente pelo produto químico tradicional, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas. O controle biológico através de metabólitos bacterianos demonstra perspectivas promissoras para restringir o uso de agrotóxicos químicos (Coelho *et al.* 2003).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com agentes de controle biológico e, conseqüentemente, há uma crescente preocupação com a segurança do ambiente e da saúde humana, levando a mudanças substanciais na regulamentação (Gardener & Fravel 2002). A introdução de agentes de controle biológico para a supressão de organismos será segura se envolver ações de pesquisa para adequar uma avaliação técnica de risco, exploração, quarentena e efeitos sobre organismos não-alvo, minimizando possíveis efeitos adversos ao ambiente e à saúde humana (Embrapa Meio Ambiente

2009). Sob o ponto de vista de segurança do alimento, um aspecto relevante a ser considerado é o da patogenicidade ao homem, isto é, determinados *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., podem ser agentes de toxinfecção alimentar, não se podendo descartar as consequências da aplicação direta em plantas destinadas ao consumo humano (Coelho *et al.* 2003).

Na utilização dos produtos a base de micro-organismos para evitar danos em plantas contra fitopatógenos devem ser considerados não somente a sua eficácia, mas também a saúde dos consumidores e a preservação do meio ambiente, nos quais prevalecem contra quaisquer outros aspectos produtivos ou econômicos. Para registro são necessários testes de biossegurança ou ambientais. É possível a ocorrência de efeitos adversos como alergenicidade, toxicidade (produção de metabólitos secundários tóxicos para plantas, animais, ou humanos) e patogenicidade (plantas e animais) (Montesinos 2003).

O desenvolvimento de um pesticida microbiano requer vários passos, nos quais incluem o isolamento do agente de controle biológico em cultura, vários testes de laboratórios *in vitro*, *in vivo* e em condições reais de aplicação, como no campo, ou no período pós-colheita, além da identificação completa do micro-organismo utilizado (Montesinos 2003). A Figura 16 resume os passos desde a descoberta do agente de controle biológico até o desenvolvimento do produto.

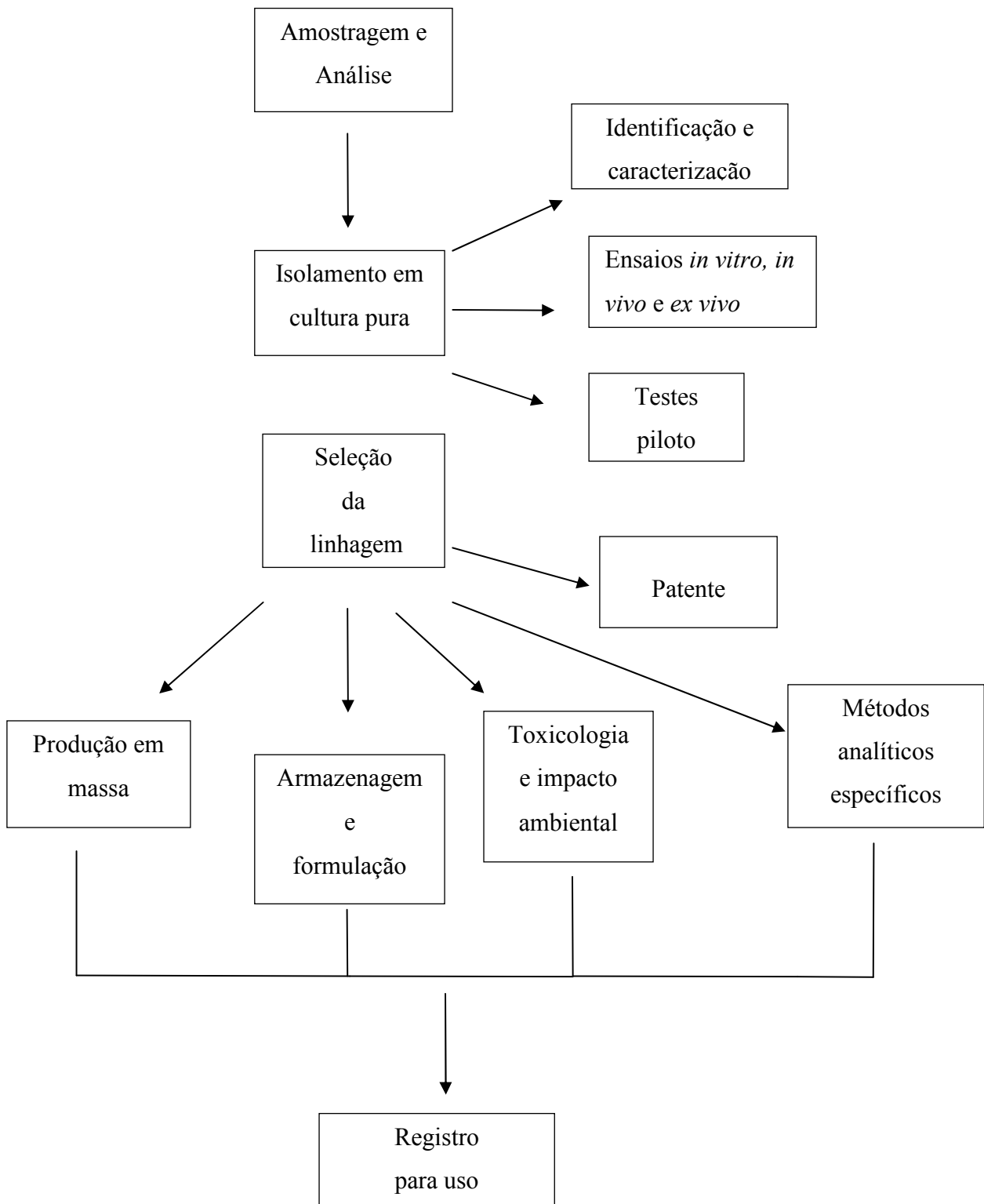


Figura 16. Desenvolvimento de um produto de controle biológico

(Adaptado de Montesinos, 2003).

A biossegurança dos micro-organismos utilizados é extremamente importante para evitar efeitos adversos em outros organismos, tanto em animais, em plantas e no meio ambiente. Estudos toxicológicos em mamíferos são necessários para garantir a saúde dos consumidores e trabalhadores, especialmente em produtos que são oriundos de metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos. Quando a identificação do agente de controle biológico está suficientemente documentada, e não havendo histórico clínico de riscos, não há necessidade de serem realizados estudos toxicológicos. A maioria dos estudos toxicológicos é realizada em ratos, como o objetivo de determinar a dose letal média (LD₅₀) e a dose letal máxima. Outros testes são realizados para testar a segurança de manipulação do produto, como verificar irritações dermatológicas, nos olhos e inalação. No caso de produção de metabólitos secundários por parte dos agentes de controle biológico, testes adicionais são feitos para averiguar a toxicidade destes (Montesinos 2003). De maneira geral, os agentes de controle biológico são tidos como mais seguros que os produtos químicos convencionais. Entretanto, eles não são completamente inócuos. No caso específico de agentes microbianos, impactos adversos sobre organismos não visados, alergias e infecções em indivíduos imunodeficientes estão entre os principais riscos potenciais (Oliveira-Filho *et al.* 2004).

A necessidade de avaliação dos produtos biológicos utilizados passou a ser mais bem compreendida a partir de regulamentos elaborados com o objetivo principal de garantir a segurança da população e do meio ambiente, além de garantir padrões mínimos de qualidade para os produtos a serem comercializados. No Brasil, o registro de produtos biológicos é recente. Segundo o Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA), o mais antigo ingrediente ativo biológico registrado data de 1991 e refere-se a inseticida baseado em metabólitos de *B. thuringiensis* (Oliveira-Filho *et al.* 2004).

De acordo com a Resolução da Anvisa nº 194, de 08 de julho de 2002, agentes microbiológicos de controle são micro-organismos vivos de ocorrência natural, bem como aqueles resultantes de técnicas que impliquem na introdução direta, num organismo, de material hereditário,

desde que não envolvam a utilização de moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) e/ou de ácido ribonucléico (RNA) recombinante ou organismo geneticamente modificado (OGM). Com base nesta legislação, para obter o registro de um agente de controle biológico, várias especificidades documentais deverão ser apresentadas, entre elas a avaliação toxicológica e de patogenicidade sobre mamíferos, considerando os seguintes aspectos:

- i) patogenicidade do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos;
- ii) infectividade / persistência do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos;
- iii) toxicidade do agente microbiológico de controle, de contaminantes microbianos e de seus subprodutos. As avaliações toxicológicas e da patogenicidade são feitas através de uma série de testes, e é dividida em três fases distintas, descritas a seguir.

A Fase I consiste em uma bateria de testes de curta duração, onde o organismo teste (mamífero) recebe uma dose máxima única do agente de controle com o objetivo de se obter a máxima chance do agente de controle causar toxicidade, infectividade e patogenicidade. Se nenhum efeito adverso for observado na Fase I, não há necessidade de se realizar nenhum dos testes da Fase II e Fase III.

A Fase II foi elaborada para avaliar uma situação particular, quando se observa toxicidade ou infectividade na Fase I, sem evidências de patogenicidade. Quando for observada patogenicidade na Fase I, devem ser realizados os estudos da Fase III.

Nas Fases II e III, estudos adicionais para avaliar efeito de toxicidade de preparações do agente biológico de controle deverão ser realizados de acordo com protocolos apropriados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e identificação de bactérias do solo

Para o isolamento das bactérias de amostras do solo foi utilizado o método proposto para *Bacillus thuringiensis*, conforme descrito pela Organização Mundial da Saúde. Após a purificação das colônias bacterianas, as células foram observadas para definição da forma, pela coloração de Gram, em microscopia óptica. As bactérias com forma de bacilo, Gram - positivas, formadoras de endoesporos e que apresentavam colônias típicas, isto é com formação de biofilme foram selecionadas e submetidas a uma série de provas bioquímicas, para classificação ao nível de espécie, de acordo com Gordon (1973). As provas bioquímicas foram: catalase; vermelho de metila; Voges-Proskauer; medição de pH no meio Voges-Proskauer; crescimento a 50 °C em estufa; crescimento em 7% de NaCl; crescimento em meio ágar Bacto Sabouraud Dextrose em pH 5,7; crescimento em caldo Bacto Sabouraud Dextrose em pH 5,7; hidrólise do amido; crescimento a 60 °C em estufa; e decomposição da caseína.

3.2. Isolamento e identificação dos fungos causadores de podridão da maçã

Os fungos responsáveis por ocasionar podridão pós-colheita na maçã foram isolados de frutas apodrecidas, cedidas pela Empresa Agropecuária Schio Ltda, localizada na cidade de Vacaria (RS). Primeiramente, foram retirados quatro fragmentos de tecido lesionado de cada fruta. Em seguida, estes foram mergulhados em uma solução de hipoclorito de sódio diluído em água por 5 minutos, com posterior lavagem em água destilada. Logo depois, as frutas foram depositadas sobre papel filtro para secar e os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meio BDA (ágar batata dextrose), as quais foram incubadas por sete dias a 28°C e fotofase de 12 horas.

A identificação dos isolados fúngicos – *Alternaria* sp.; *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp. foi realizada pela observação microscópica da morfologia e observação macroscópica das colônias.

3.3. Seleção *in vitro* dos isolados de *Bacillus* spp. com atividade antagonista

Isolados bacterianos do solo, previamente identificados como *Bacillus* spp., foram submetidos a três métodos de seleção de antagonistas, comparando-se a eficiência e rapidez na identificação de isolados antagonísticos. Para isso, cada um dos isolados foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de caldo nutriente (extrato de levedura 3g/L e peptona 5g/L), autoclavado a 1 atm por 15 minutos. Os frascos cultivados com cada uma das bactérias foram colocados em incubador orbital a 30°C por 24 horas. A seguir, as culturas foram centrifugadas em uma minicentrífuga Eppendorf 5417R por 15 minutos a 10.000 g, para obtenção dos precipitados de células, que foram logo utilizados. No primeiro método, os isolados bacterianos foram divididos em grupos de 15 e semeados em placas de Petri com meio BDA (ágar batata dextrose) + BSD (meio Bacto Sabouraud) com a ajuda de uma alça esterilizada, sendo cada uma considerada uma placa mestra. Paralelamente, foram preparadas suspensões de conídios para cada um dos fungos alvo (1×10^7 conídios mL⁻¹). Com o auxílio da alça de Drigalsky, 200 µL das suspensões foram espalhadas sobre o meio de cultura em placas de Petri. Logo depois, com o auxílio de uma alça, o inóculo de bactérias foi transferido, a partir das placas mestras. No segundo método, um disco de micélio fúngico foi semeado no centro de uma placa de Petri contendo meio BDA + BSD, e cinco isolados bacterianos foram inoculados dispostos em volta do micélio fúngico. O terceiro método consistiu na incorporação de 200 µL de uma suspensão bacteriana a 20 mL de meio de cultura BDA fundente, que foi em seguida vertido em uma placa de Petri. Logo depois que o meio de cultura solidificou, foi transferido para o centro de cada placa um disco de ágar colonizado por micélio de um dos fungos alvo. Todos os testes foram realizados em triplicata. O crescimento das bactérias e dos fungos foi observado diariamente. E, a seleção dos *Bacillus* foi feita de acordo com a formação de um halo transparente e claro em torno das colônias bacterianas, visível sobre o meio de cultivo, e onde os fungos não conseguiram se desenvolver.

3.4. Avaliação *in vitro* do antagonismo com os isolados de *Bacillus* spp.

Na primeira etapa deste trabalho, foram selecionados oito isolados bacterianos com maior atividade antagônica contra os três fungos fitopatogênicos isolados da maçã, e que foram a partir de então avaliados de acordo com a metodologia de Hang *et al.* (2005), modificada. Os isolados bacterianos foram cultivados em 25 mL de caldo nutriente e incubados por 24 horas a 30°C em agitação constante. Após esse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada por 15 minutos a 10.000 g, sendo o precipitado celular reservado e o sobrenadante descartado. Em uma placa de Petri contendo meio BDA, discos de ágar colonizados por micélio fúngico com crescimento de sete dias, foram semeados no centro da placa com o auxílio de um tubo de Zeni. Em seguida, a 1,5 cm de distância do bordo da placa foram feitas duas estrias de células bacterianas provenientes da centrifugação. As placas foram incubadas a 28 °C e o crescimento dos fungos, avaliado aos 7 e 14 dias, pela medida do diâmetro da colônia, com auxílio de um paquímetro digital. Os testes foram realizados em triplicata.

3.5. Avaliação da estabilidade térmica dos metabólitos produzidos por *Bacillus* spp.

(Kupper *et al.* 2003).

Os isolados bacterianos com maior atividade antagônica foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo nutriente. Após a incubação em incubador orbital por 24 horas a 30°C, a cultura de cada isolado bacteriano foi filtrada em membrana de poro 0,22 µm para a separação das células e do caldo de cultura. Logo após, uma alíquota de 10 mL do caldo de cultura filtrado foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL de volume contendo 90 mL de caldo BD e 2 g de Agar, constituindo o meio BDA+caldo filtrado, que em seguida foi autoclavado por 20 minutos a 1 atm. O meio ainda líquido foi vertido em placas de Petri e depois da sua solidificação, um disco de ágar colonizado por micélio de cada fungo alvo, retirado do bordo de uma colônia com sete dias de idade, foi transferido para o centro da placa. Para cada fungo alvo e isolado

de *Bacillus* foram realizados experimentos em triplicata. As colônias dos fungos desenvolvidas no meio BDA+caldo filtrado e as colônias controles foram avaliadas pela medida do diâmetro aos sete e ao décimo quarto dias com um paquímetro.

3.6 Testes *in vivo* de antagonismo na fruta

As frutas utilizadas para os experimentos estavam sadias e a colheita tinha sido recente. Inicialmente, as frutas das cv. Fuji e Gala foram lavadas com detergente e enxaguadas com água corrente, com posterior mergulho das mesmas em solução de hipoclorito de sódio (0,5 % v/v) por 5 minutos. Em seguida, as frutas foram depositadas sobre papel toalha para secar e em seguida esterilizadas em luz ultravioleta em capela de fluxo laminar. Conforme metodologia descrita por Sholberg *et al.* (1995), foram feitos quatro ferimentos de mais ou menos 1 mm de diâmetro na casca e na parte superior de cada fruta desinfestada. Em seguida, uma alíquota de 20 µL do caldo da cultura de cada um dos isolados bacterianos, previamente crescidos em caldo nutriente, foi transferida para cada um dos quatro ferimentos de cada uma das maçãs. Foram avaliadas nesta etapa duas bactérias (F6II e FR2B2), sendo utilizadas para cada uma, cinco maçãs por fungo desafiado. Duas horas depois, foi inoculado nos ferimentos de cada maçã 20 µL de uma suspensão de conídios na concentração 1×10^4 conídios.mL⁻¹ em Tween 20, de cada um dos fungos. Depois, as frutas foram colocadas em sacos plásticos, e armazenadas em temperatura ambiente e em câmara fria a 0°C. A incidência das lesões foi observada diariamente, e nos casos positivos, as lesões foram medidas nos primeiros sete dias após a inoculação, e assim por diante, até completo apodrecimento dos frutos. Em todos os casos foram utilizadas cinco frutas por tratamento, assim como nos controles contendo somente o fungo.

3.7 Estimativa da massa molecular de proteínas por SDS-PAGE

A eletroforese para a estimativa da massa molecular das proteínas dos isolados selecionados foi realizada em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), segundo a metodologia descrita por Lecadet *et al.* (1992) e modificada por Kavitha *et al.* (2005).

Os isolados bacterianos com melhor atividade antagonista foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 125 mL de volume, contendo 25 mL de caldo de cultura (água destilada; 0,375 g de dextrose e 0,125 g de peptona). Os frascos cultivados foram colocados em incubador com agitação orbital por 48 horas a 30°C.

Três amostras de cada isolado bacteriano foram analisadas, sendo a cultura bacteriana, o filtrado bacteriano e o filtrado bacteriano autoclavado. Inicialmente, as amostras foram preparadas com um tampão, contendo a seguinte composição: 2,5 mL de glicerol; 2 mL de solução SDS 10%; 0,2 mL de solução azul-de-bromofenol 0,2% e 3,5 mL de água destilada; 1,25 mL de tampão para gel empilhador Tris-HCl 0,6173 M; pH 6,8; sendo que para cada 950 µL desta solução foram adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol. A biomassa presente em 500 µL da cultura foi centrifugada a 8000 g por 10 minutos e ressuspensa em solução 0,9 % de cloreto de sódio, novamente centrifugada e ressuspensa em solução 0,9% de cloreto de sódio. Desta suspensão foi retirado 30 µL de amostra, que foi centrifugada e ao precipitado celular foi adicionado 25 µL do tampão de amostra. Para as amostras preparadas com o filtrado, inicialmente a cultura microbiana foi centrifugada a 4000 g por 20 minutos e filtrada em membrana de 0,22 µm. Em seguida uma alíquota foi autoclavada a 1 atm de pressão por 15 min. As proteínas contidas nos filtrados, autoclavado e não autoclavado, foram precipitadas com solução cetônica com 0,07% (v/v) de 2-mercaptoetanol e mantidas a -20°C por 15 min.

Logo depois, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g e o sobrenadante descartado. O tubo Eppendorf, com o precipitado celular foi mantido em dessecador a vácuo (Blum *et al.*, 1987). Em seguida, o precipitado foi solubilizado em 250 µl de tampão da amostra e mantido a

100 °C durante 10 minutos. As amostras foram então, aplicadas na canaleta do gel, e a eletroforese realizada em aparelho Hoefer miniVE vertical Amersham Pharmacia, em voltagem constante de 150 V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Para a corrida eletroforética, foi utilizado tampão Tris-glicina pH 8,9, composto de 4,54 g de Tris base; 10 g de glicina e 1 g de SDS, sendo o volume completado para 400 mL com H₂O destilado (Laemmli, 1970).

A revelação do gel foi realizada com solução formulada com 10% de ácido acético, 50% de etanol e 0,2% de Comassie Brilliant Blue G-250. O volume de 100 mL desta solução foi adicionado sobre o gel, que foi então incubado com suave agitação recíproca por 20 min. Em seguida o gel foi lavado com solução 10% de ácido acético e 50% de etanol, sucessivas vezes até a revelação das bandas.

3.8 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

O reagente de Bradford (0,01% de Coomassie Brilliant Blue G250, 4,7% de etanol e 8,5% de ácido fosfórico, sendo o volume completado com água destilada) foi preparado 24 horas antes do uso e mantido sob refrigeração por no máximo dois meses, no escuro, conforme Bradford (1976)

Foi construída uma curva de calibração, a partir de soluções-padrões de albumina bovina (fração V) com concentrações entre 2 e 30 µg/mL. Para a determinação das proteínas das amostras, a reação foi realizada pela mistura de 0,1 mL das amostras (cultura celular, filtrado e filtrado autoclavado) e 0,2 mL do reagente de Bradford. Depois de transcorridos 10 minutos, o complexo foi quantificado em espectrofotômetro SpectraMax® 190 a 595 nm.

3.9 Análises Estatísticas

Os dados obtidos neste trabalho foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, realizados com o auxílio do software GraphPad Prism 4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação dos isolados de *Bacillus* spp.

Foram isolados 250 microrganismos do solo e identificados 60 isolados com características morfológicas que indicam pertencerem ao gênero *Bacillus*. As características morfológicas e os resultados dos testes bioquímicos realizados com dois isolados – F62 e FR2B2, com melhor atividade antagonista estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Características bioquímicas e morfológicas dos isolados F62 e FR2B2.

<i>Método</i>	<i>Isolado</i> <i>F62</i>	<i>Isolado</i> <i>FR2B2</i>
Forma	bastonetes	bastonetes
Esporo	central	central
Gram	+	+
Catalase	+	+++*
Voges-Proskauer	+	+
pH no meio Voges-Proskauer	5,6	5,9
Crescimento a 50 °C em estufa	-	+
Vermelho de metila	-	+
Crescimento em 7% de NaCl	+	+
Crescimento em meio BSD em pH 5,7	+	+++
Crescimento em caldo BSD em pH 5,7	+	+
Hidrólise do amido	-	+
Decomposição da caseína	+	+
Crescimento a 60 ° em estufa	-	-
Prováveis Espécies	<i>B. polymyxa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. pumilis</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>

* +++ positivo (forte); + positivo; - negativo.

De acordo com os resultados dos testes bioquímicos analisados pela chave dicotômica da bibliografia de Gordon (1973), o isolado F62 pode pertencer às espécies *B. polymyxa*, *B. cereus* ou *B. pumilus*, e o isolado FR2B2 às espécies *B. subtilis* ou *B. licheniformis*.

4.2 Seleção *in vitro* dos isolados de *Bacillus* spp. com atividade antagonista

Sessenta isolados de *Bacillus* spp., provenientes do solo das regiões da Serra Gaúcha e Catarinense, foram desafiados contra os três fitopatógenos isolados da maçã: *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp., para ser escolhido entre eles os melhores antagonistas. Para obter este dado foram aplicadas três metodologias, sendo que a inoculação simultânea de 15 isolados bacterianos por placa mostrou ser a mais eficiente e mais rápida em selecionar os possíveis isolados antagonistas. Pela observação dos halos de inibição formados em torno das colônias dos *Bacillus* foi possível identificar que alguns isolados não apresentam especificidade para determinado fungo, como demonstrado na Figura 17. Na Figura 17B, dois isolados (FIII3 e FRIIF8) inibiram o desenvolvimento de *Alternaria* sp., enquanto que, para *Botrytis* sp. (Figura 17C), apenas um isolado (FIII3) demonstrou antagonismo. Já para *Penicillium* sp. (Figura 17D), dois isolados (FIII3 e BG1) de *Bacillus* spp., demonstraram antagonismo contra este fungo.

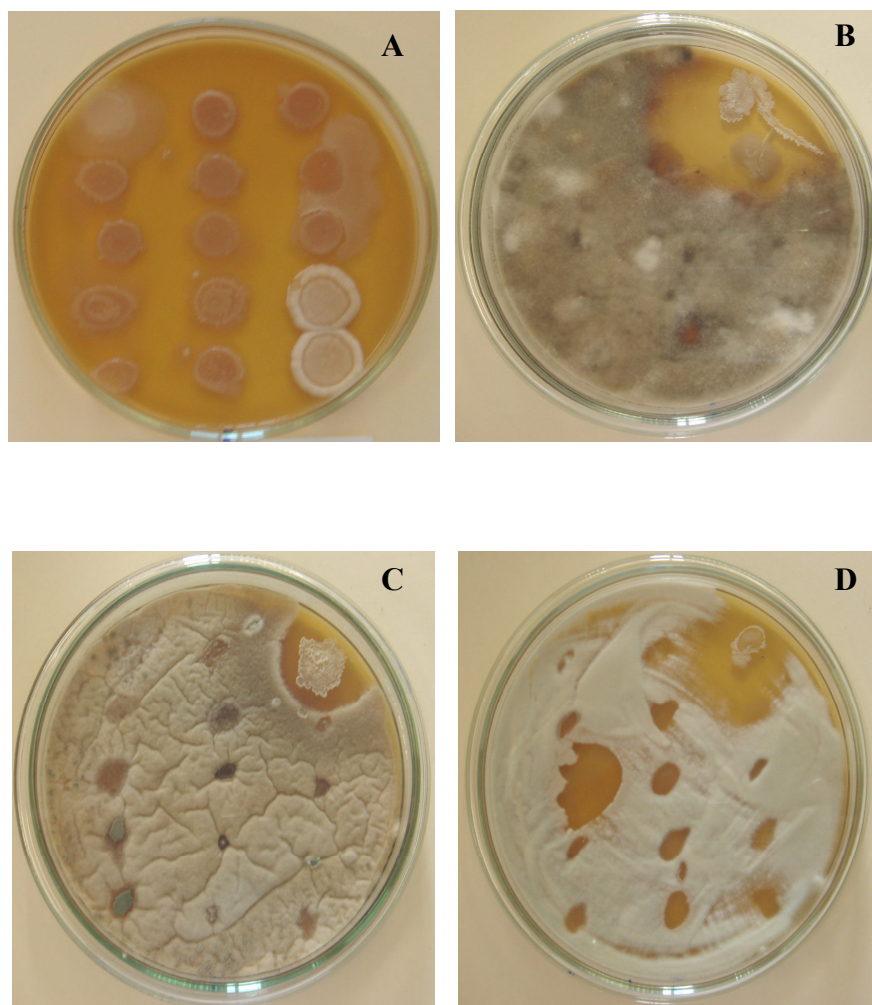


Figura 17. Halos de inibição produzidos pela cultura de isolados de *Bacillus* spp. contra fungos fitopatogênicos isolados da maçã. A) Placa mestra; B) *Alternaria* sp. versus isolados de *Bacillus* spp.; C) *Botrytis* sp. versus isolados de *Bacillus* spp. ; D) *Penicillium* sp. versus isolados de *Bacillus* spp..

Dos 60 isolados de *Bacillus* confrontados com os fungos *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp., oito isolados mostraram maior atividade antagônica de acordo com o diâmetro do halo visível formado no meio de cultura, entre eles, FR2B2, FR2B6, FR2B8, F62, JC5, JC8, FIII3 e FR2F8. No Quadro 5, é apresentada a origem destes isolados.

Quadro 5. Isolados de *Bacillus* spp. e as suas origens.

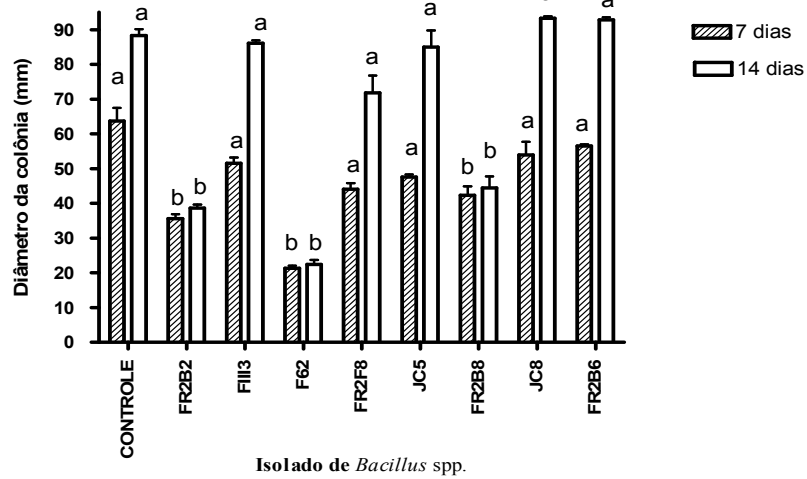
<i>Isolado</i>	<i>Local da coleta</i>
FR2B2	Farroupilha- RS
FR2B6	Farroupilha-RS
FR2B8	Farroupilha-RS
F62	Caxias do Sul-RS
JC5	Santa Catarina
JC8	Santa Catarina
FIII3	Farroupilha-RS
FR2F8	Farroupilha-RS

A maioria dos isolados com melhor atividade antagonista tem como origem solos do Rio Grande do Sul, com destaque para a cidade de Farroupilha.

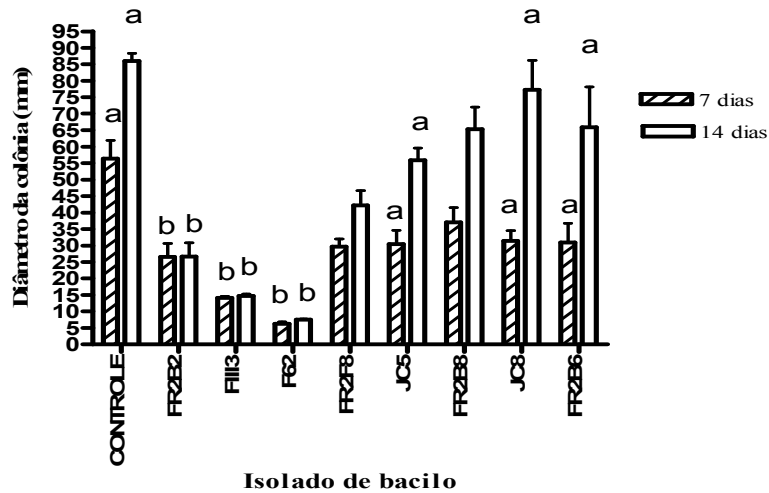
4.3 Avaliação *in vitro* do antagonismo dos isolados de *Bacillus* spp.

Oito isolados de *Bacillus* foram submetidos a testes de antagonismo isoladamente, contra os três fungos fitopatogênicos: *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp., semelhantemente a metodologia de Hang *et al.*, (2005), modificada. Os isolados F62 e FR2B2 foram os únicos que inibiram os três fungos (Figuras 18 e 19).

A



B



C

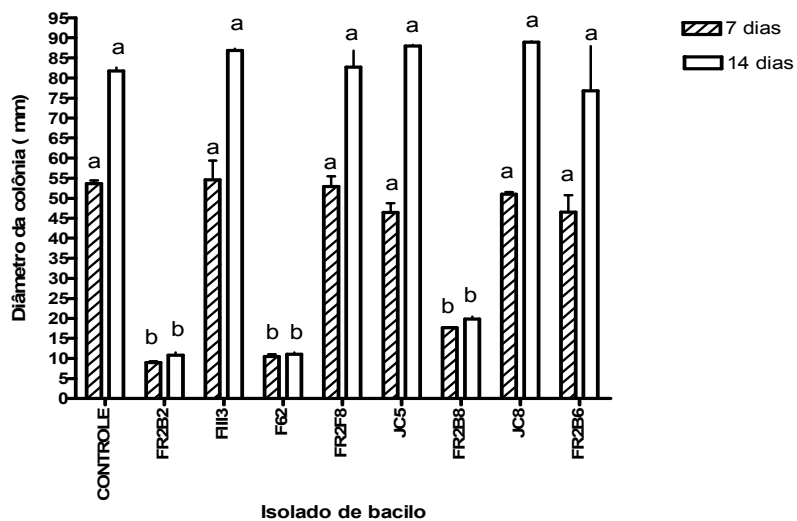


Figura 18. Efeito de oito isolados de *Bacillus* spp. sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos: A) *Alternaria* sp.; B) *Botrytis* sp.; C) *Penicillium* sp. A análise dos dados e a comparação das médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$) foi feita aos sete e 14 dias.

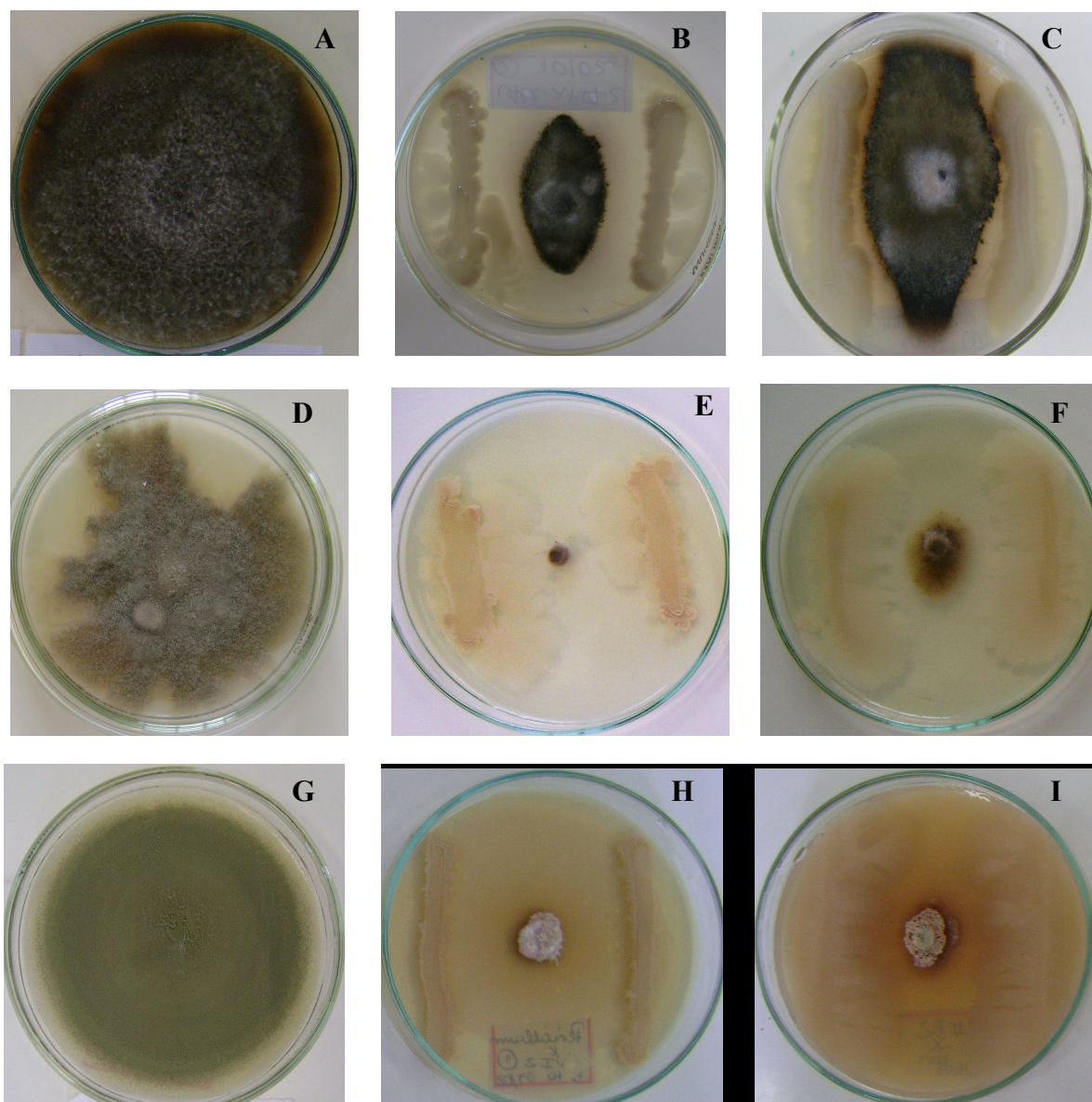


Figura 19. Desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos desafiados por dois isolados de *Bacillus*, em meio BDA. A) *Alternaria* sp. controle; B) *Alternaria* sp. X *Bacillus* spp. F62; C) *Alternaria* sp. X *Bacillus* spp. FR2B2; D) *Botrytis* sp. controle; E) *Botrytis* sp. X *Bacillus* spp. F62; F) *Botrytis* sp. X *Bacillus* spp. FR2B2; G) *Penicillium* sp. controle; H) *Penicillium* sp. X *Bacillus* spp. F62; I) *Penicillium* sp. X *Bacillus* spp. FR2B2.

Os isolados F62, FR2B2 e FR2B8 inibiram o desenvolvimento de *Alternaria* sp., com diferenças significativas em relação ao controle, mas não entre eles (Figura 18A). Outro dado significativo é a manutenção da inibição por 14 dias pelos três isolados, diferentemente de todos os outros isolados.

Na Figura 18B, pode ser verificado que, além dos isolados F62 e FR2B2, o isolado FIII3 também inibiu o desenvolvimento de *B. cinerea* em meio BDA, apresentando diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,01$). Pode ser observado também que houve persistência do efeito inibitório por estes isolados durante 14 dias, diferentemente dos outros isolados. Outros autores também obtiveram resultados semelhantes, como Hang *et al.* (2005), que relataram que *B. subtilis* (S1-0210) inibiu o crescimento de *B. cinerea*.

Na Figura 18C, estão apresentados os dados obtidos da avaliação da interação entre os isolados de *Bacillus* spp. e o isolado de *Penicillium* sp., podendo ser verificado que novamente os isolados F62 e FR2B2 de *Bacillus* spp., mas também o isolado FR2B8, que também causou um efeito inibitório sobre *Alternaria* sp., apresentaram diferenças significativas em relação aos outros isolados. Da mesma forma como para os outros fungos desafiados, os *Bacillus* que demonstraram capacidade de inibir o desenvolvimento micelial de *Penicillium* sp., o fizeram por todo o tempo do experimento, isto é, 14 dias. Na análise dos dados (Figura 18 A, B e C), pode ser verificado que os isolados F62 e FR2B2 de *Bacillus* spp. foram eficientes em inibir *in vitro* os três fitopatógenos alvo, o que permite sugerir que são eficientes mas não específicos, enquanto que o isolado FIII3 foi eficiente e específico para *Botrytis* sp., e o isolado FR2B8 para *Alternaria* sp. e *Penicillium* sp. Pela observação dos dados apresentados nas Figuras 18 e 19, pode ser sugerido que houve inibição do desenvolvimento das colônias dos fungos fitopatogênicos por produção de metabólitos antifúngicos por parte dos isolados F62 e FR2B2, que se difundiram no meio de cultura. Hang *et al.* (2005), também relataram que a atividade antifúngica não é mediada pelo contato célula-célula, e sim pela

produção de uma substância que, difusível no ágar, causa o crescimento anormal do micélio de *B. cinerea*, como também foi observado neste trabalho, sobre os três fungos alvo.

No presente trabalho, dos 60 isolados de *Bacillus* spp. desafiados, apenas quatro demonstraram capacidade de inibir *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp.. A mesma quantidade de isolados de *Bacillus* spp. com atividade antagonista foi encontrada por Walker *et al.* (1998), que testaram 92 isolados contra *B. cinerea* e *Pythium mamillatum*. Hang *et al.* (2005) desafiaram oitenta isolados de *Bacillus* spp. contra quinze fungos fitopatogênicos e, onze isolados inibiram o crescimento micelial de *B. cinerea* em porcentagem maior que 60%. Os resultados alcançados no presente trabalho corroboram os resultados obtidos por esses autores, desde que foi encontrada variabilidade entre os isolados. Shiomi *et al.* (2008) testaram 95 isolados de bactérias endofíticas do milho com ação antagônica a fitopatógenos. Entre elas, seis foram as mais promissoras, incluindo *B. subtilis*, *B. lentimorbus* e *B. agaradhaerens*. Segundo os autores, a produção de compostos tóxicos, de sideróforos e de enzimas extracelulares foi responsável pelo antagonismo. Em outro estudo realizado por Touré *et al.* (2004), *B. subtilis* GA1 inibiu *in vitro*, o crescimento micelial em até 70% de *B. cinerea*, responsável por danos pós-colheita na maçã. Segundo esses autores, houve a produção de compostos tóxicos por parte da linhagem GA1 responsável pela inibição.

O isolado F62 de *Bacillus* spp. demonstrou maior efeito inibitório contra os três gêneros fúngicos submetidos, o que pode indicar alta capacidade antifúngica, porém, baixa ou nenhuma especificidade pelo hospedeiro. Este dado é de grande importância, pois tanto para as biofábricas como para o próprio agricultor, agentes de controle biológico com largo espectro de atuação podem ser mais interessantes. Kavitha *et al.* (2005) avaliou o efeito inibitório de *Bacillus polymyxa* VLB16 contra quatro fungos e cinco bactérias fitopatogênicas, concluindo que não houve especificidade do isolado VLB16 contra um determinado alvo. Foldes *et al.* (2000) realizaram testes de antagonismo *in vitro* de *Bacillus* sp. IFS-01 contra vários fungos fitopatogênicos, leveduras e bactérias. Dos 25

micro-organismos submetidos, 19 foram inibidos. Este fato indicou o amplo espectro de hospedeiros sensíveis aos efeitos dos compostos produzidos por esse isolado de *Bacillus* spp.. Os dados obtidos no presente trabalho, corroborados pelos dados da literatura permitem concluir que os isolados F62 e FR2B2 possuem amplo espectro de ação.

No presente trabalho foi observado que um dia de incubação dos isolados de *Bacillus* em meio líquido sob agitação constante foi suficiente para a produção de metabólitos com capacidade de inibir o crescimento fúngico. Segundo Kupper e colaboradores (2003), Bettioli & Kimati (1990) ao estudarem o efeito de *B. subtilis* sobre *Pyricularia oryzae*, verificaram que durante a multiplicação da bactéria em meio líquido, com ou sem agitação constante, foram liberados metabólitos em concentrações suficientes para inibir completamente o crescimento micelial do fungo, após um dia de incubação.

4.4 Avaliação da estabilidade térmica dos metabólitos produzidos por *Bacillus* spp..

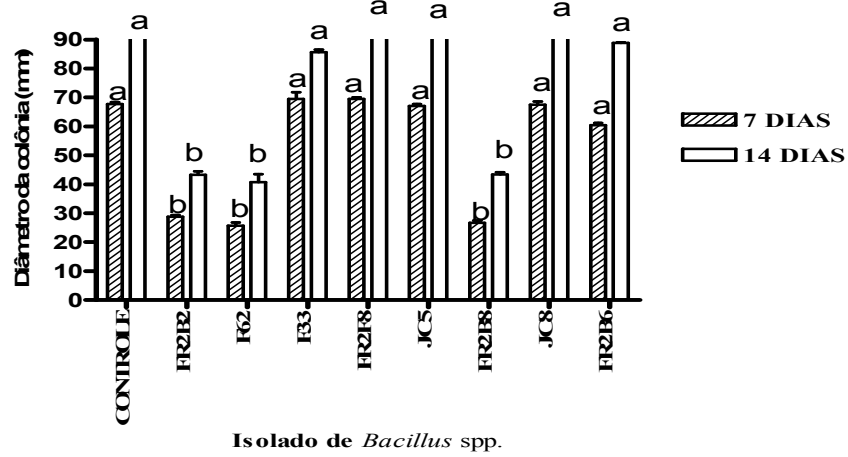
A estabilidade dos metabólitos produzidos pelos oito isolados de *Bacillus* spp. selecionados, foi avaliada e entre todos, o isolado F62 destacou-se, pois manteve o mais alto índice de inibição do crescimento micelial (Figuras 20 e 21). Na avaliação contra *Alternaria* sp., os três isolados – F62, FR2B2 e FR2B8 (Figura 20A) inibiram o crescimento micelial do fungo com diferenças significativas ($P \leq 0,001$), em relação ao controle. Já o desenvolvimento das colônias de *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp., foi inibido somente pelo isolado F62 (Figuras 20B e 20C).

Os resultados relatados acima sugerem que houve a produção de um ou mais metabólitos antifúngicos pelos isolados F62, FR2B2 e FR2B8, resistentes ao processo de autoclavagem. O(s) metabólito(s) produzido(s) pelo isolado F62 reduziram o crescimento micelial dos três fungos – *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp.. Este resultado foi semelhante ao encontrado quando foram empregadas as células deste isolado de *Bacillus* spp. não havendo especificidade para um determinado fungo. O filtrado autoclavado do caldo de cultura do isolado FR2B8 também reduziu o

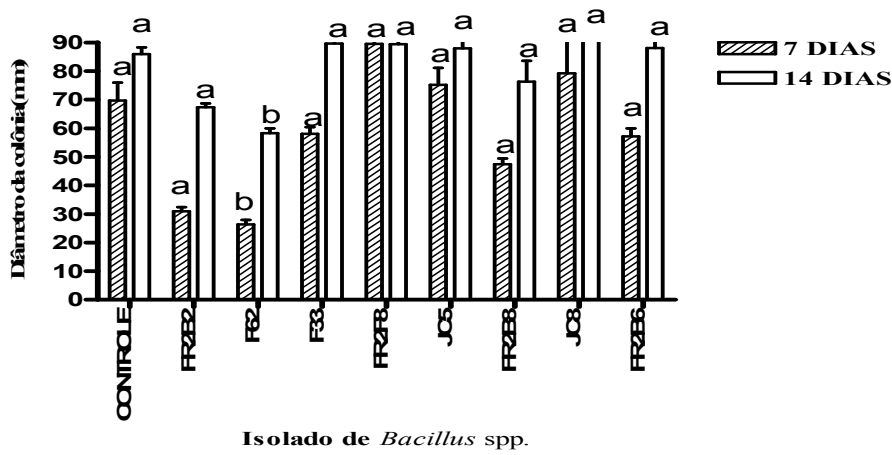
crescimento micelial de *Alternaria* sp., da mesma forma como o que ocorreu quando foram empregadas as suas células, podendo ser concluído novamente sobre a especificidade deste isolado para este fungo.

Na literatura, podem ser encontradas muitas referências que apontam para a resistência dos metabólitos produzidos por várias espécies de *Bacillus* spp. ao calor. Kavitha e colaboradores (2005) verificaram que *B. polymyxa* VLB16 produz uma proteína antifúngica (AFP) termoestável, que apresentou alteração do efeito inibitório *in vitro* contra os fungos *Rhizoctonia solani* e *Pyricularia grisea*, após exposição a 121°C. Munimbazi & Bullerman (1997) concluíram que os metabólitos produzidos por *B. pumilus* foram resistentes a autoclavagem, pois a atividade inibitória contra *Aspergillus parasiticus* permaneceu, mantendo a inibição do crescimento micelial e da produção de aflatoxina. Walker *et al.* (1998) relataram que isolados de *Bacillus* spp. que mostraram antagonismo em cultura pareada também reduziram a germinação de conídios de *B. cinerea*, bem como o seu caldo de cultura autoclavado. Kupper *et al.* (2003) testaram o caldo de cultura de 64 isolados de *Bacillus* spp. contra *Colletotrichum acutatum*, e constataram que com exceção de dois isolados, todos os demais resistiram à temperatura de autoclavagem, mantendo o efeito inibitório contra o fungo alvo.

A



B



C

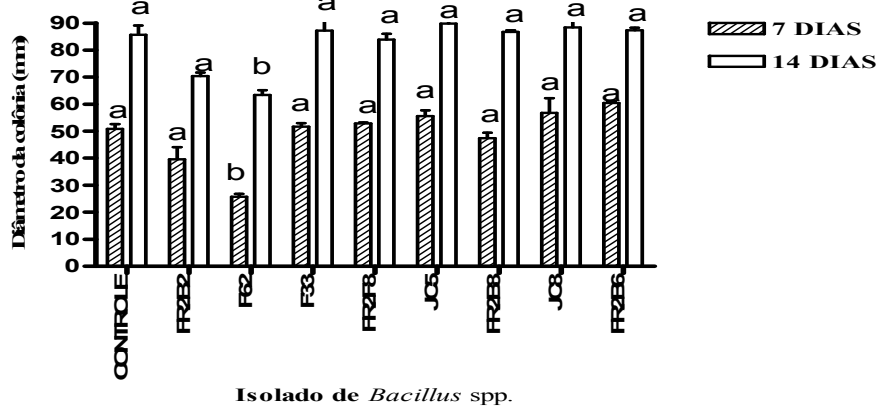


Figura 20. Efeito do caldo de cultura autoclavado dos isolados de *Bacillus* spp., sobre o crescimento fúngico de: A) *Alternaria* sp.; B) *Botrytis* sp.; C) *Penicillium* sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,001$.

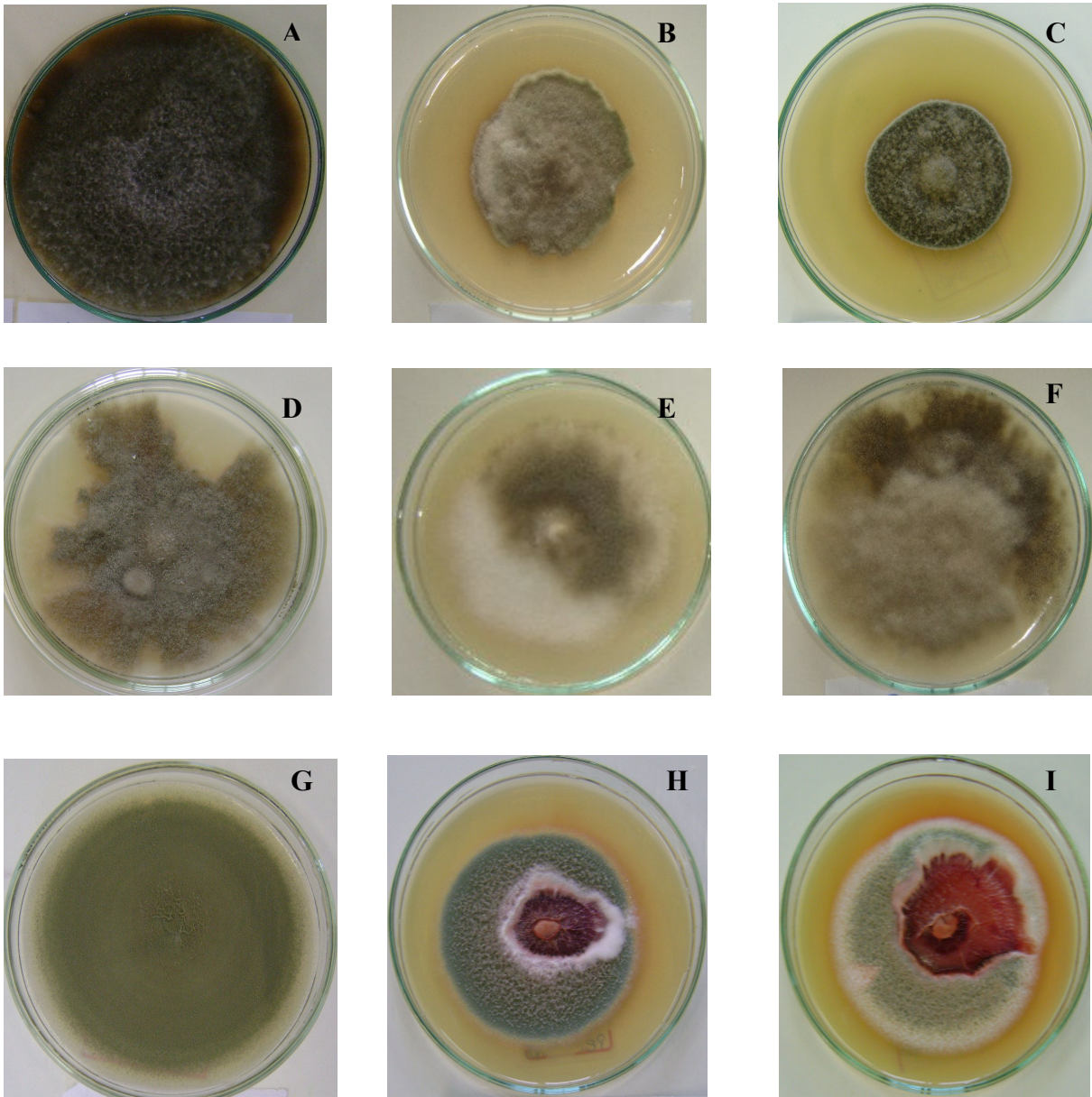


Figura 21. Desenvolvimento dos fitopatógenos em meio ágar batata dextrose enriquecido com o filtrado autoclavado dos isolados F62 e FR2B2; A) controle *Alternaria* sp.; B) *Alternaria* sp. X isolado F62; C) *Alternaria* sp. X isolado FR2B2; D) *Botrytis* sp.; E) *Botrytis* sp. X F62, F) *Botrytis* sp. X isolado FR2B2, G) controle *Penicillium* sp.; H) *Penicillium* sp. X isolado F62; I) *Penicillium* sp. X isolado FR2B2.

4.5 Antagonismo *in vivo*

Os testes nas frutas foram realizados com os dois isolados bacterianos mais representativos da capacidade antagonista – F62 e FR2B2. Os dados obtidos com as culturas bacterianas inoculadas em maçãs armazenadas em temperatura ambiente estão demonstrados na Figura 22.

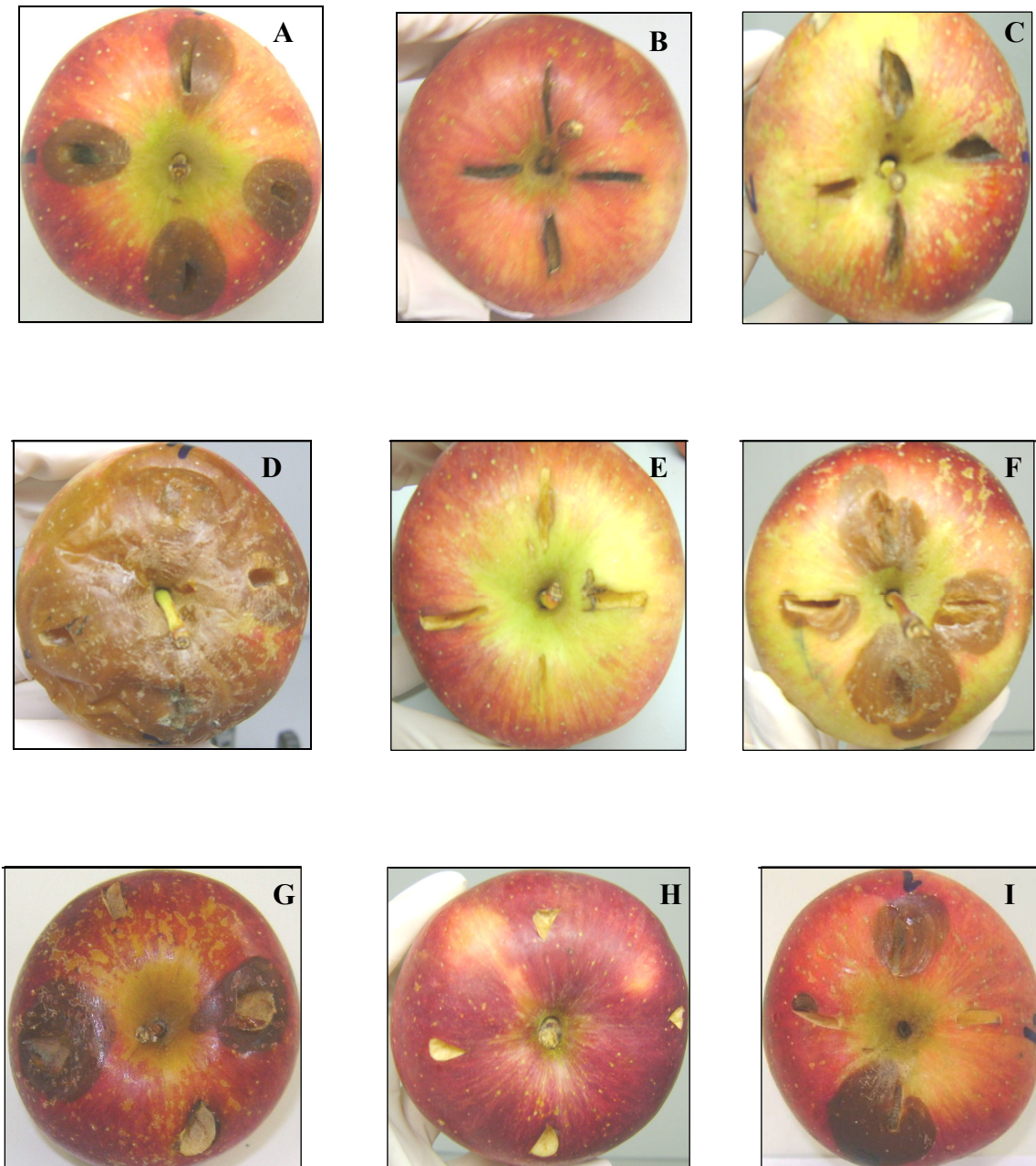


Figura 22. Antagonismo *in vivo* na maçã. A) controle - *Alternaria* sp.; B) *Alternaria* sp. X *Bacillus* spp. F62; C) *Alternaria* sp. X *Bacillus* spp. FR2B2; D) controle - *Botrytis* sp.; E) *Botrytis* sp. X *Bacillus* spp. F62; F) *Botrytis* sp. X *Bacillus* spp. FR2B2; G) controle - *Penicillium* sp.; H) *Penicillium* sp. X *Bacillus* spp. F62; I) *Penicillium* sp. X *Bacillus* spp. FR2B2.

A Figura 22 (A, B, C, D, E e F) demonstra o efeito antagônico dos isolados F62 e FR2B2 de *Bacillus* spp. contra os fungos *Alternaria* sp. e *Botrytis* sp. e foram registrados 14 dias após o início do desafio. Na Figura 22 (G, H e I) verificou-se o antagonismo contra *Penicillium* sp., obtidos somente depois de 28 dias de observação. Neste caso, foi observado que o isolado de *Penicillium* sp. apresentou um desenvolvimento muito lento, demorando em se estabelecer e causar sintomas da podridão, mesmo no tratamento controle, diferentemente dos isolados de *Alternaria* sp. e *Botrytis* sp. desafiados. Este fato sugere a possível presença de algum fungicida químico utilizado nas macieiras, ainda no campo, que estivesse interferindo no desenvolvimento de *Penicillium* sp. ou, alguma característica própria do isolado, como velocidade lenta de crescimento sobre o tecido do hospedeiro. Para melhor entender o que estava ocorrendo, foi repetido o experimento com maçãs orgânicas, livres de agrotóxicos. No entanto, o desenvolvimento do fungo foi novamente muito lento, sendo descartada a possibilidade da influência de efeito residual de algum defensivo químico. Assim sendo, este resultado poderia ser atribuído a características do próprio isolado. Em estudo realizado por Ross *et al.* (1998) para verificar a produção de patulina em maçãs cv. Gala e Fuji houve deterioração perceptível dos frutos pela linhagem de *P. expansum* NRRL 1172 somente 15 dias após a inoculação, verificando-se para *P. variable* deterioração após 30 dias a 25° C. Os autores concluíram que diferenças entre isolados de *Penicillium* spp. podem interferir no resultado do experimento, devido à sua adaptação às condições impostas, o que vem ao encontro dos resultados alcançados neste trabalho.

Os resultados dos testes de antagonismo *in vivo* (Figura 23), indicam que, para *Alternaria* sp., o isolado FR2B2 foi mais eficiente em inibir o crescimento fúngico quando comparado com F62. Este dado difere do obtido “*in vitro*” (Figura 18A), que demonstra que o isolado F62 foi mais eficiente na inibição do fitopatógeno na condição daquele experimento. Já para *Botrytis* sp. (Figura 23B), o isolado F62 apresentou maior capacidade de inibição, sendo significativamente diferente ($p \leq 0,05$) do isolado FR2B2, que não diferiu do controle. Os resultados do experimento de

antagonismo com *Penicillium* sp. não foram apresentados, uma vez que não houve crescimento do fungo nas maçãs em todos os tratamentos.

Os testes *in vivo* foram realizados com o caldo de cultura dos isolados F62 e FR2B2. O isolado FR2B2 inibiu o crescimento de *Alternaria* sp., até os 28 dias após a inóculoção, sendo este resultado significativamente diferente daqueles encontrados nos outros tratamentos (Figura 23A). Já para *Botrytis* sp, o isolado F62 foi eficaz no sétimo e no décimo quarto após a inoculação (Figura 23B). Touré e colaboradores (2004) verificaram que *Bacillus subtilis* GA1 foi mais eficaz em reduzir a incidência da doença nos primeiros cinco dias após a inoculação, mantendo 80% do nível de proteção após 10 dias, e reduzindo para 40% após 21 dias.

Para avaliação do controle dos isolados F62 e FR2B2 em frutas mantidas em baixas temperaturas, as mesmas receberam os tratamentos e foram mantidas em câmara fria durante trinta dias, sendo observadas semanalmente. Durante o armazenamento a 0°C não foi constatado crescimento fúngico, indicando que este tipo de controle é eficiente em proteger a fruta até o momento da sua comercialização. Após a retirada da câmara fria, foi observado que *Botrytis* sp. cresceu rapidamente desenvolvendo um micélio vigoroso, o que demonstrou a sua agressividade. Na Figura 24 são apresentados os dados que demonstram o antagonismo dos isolados F62 e FR2B2, depois das frutas terem sido retiradas da câmara fria. Pela comparação dos dados obtidos no experimento com frutos mantidos a temperatura ambiente (Figura 23) e neste, em que os frutos permaneceram por 30 dias armazenados sob baixa temperatura, pode ser observado que o momento em que as lesões surgiram foi diferente para cada fungo desafiado. O desenvolvimento de *Botrytis* sp., foi muito rápido apodrecendo todos frutos, independente do tratamento, após 14 dias. No experimento com *Alternaria* sp., foi verificado que o tempo necessário para que os sintomas de lesão surgissem nos frutos tratados foi maior, na comparação com os tratamentos realizados em maçãs não armazenadas a 0°C. Estes dados permitem sugerir que o frio exerce uma inibição tão forte sobre o fungo *Alternaria* sp., que o mesmo precisa de um maior período de tempo para iniciar o processo de

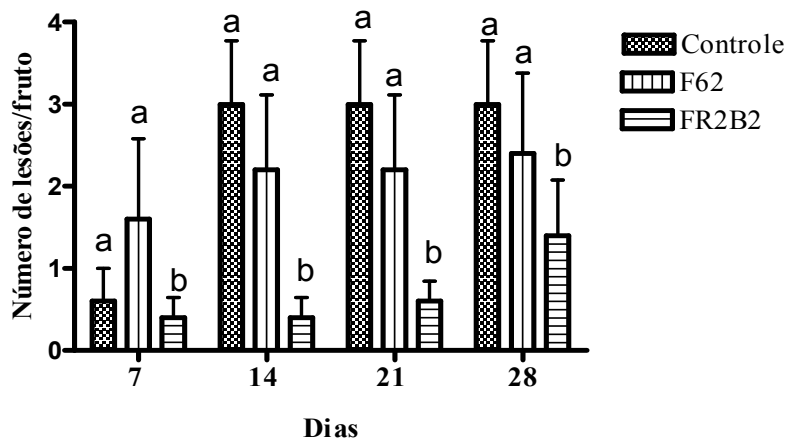
infecção das frutas, mesmo no tratamento controle, após a retirada da temperatura de 0°C. Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Brackmann *et al.* (2008), os quais avaliaram o controle de podridões em maçãs Fuji frigoconservadas com a aplicação de fosfitos e cloreto de benzalcônio em pré e pós-colheita. Nenhum dos produtos aplicados em pré-colheita permitiu um controle eficiente das podridões após seis meses de armazenamento a 0,5°C e durante o período de exposição a 20°C. O inverso ocorreu com os frutos tratados em pós-colheita que, ao serem retirados da câmara fria, apresentaram a menor porcentagem de frutos com lesões podres até o oitavo dia a 20°C. Estes dados permitem sugerir que o tratamento com o isolado F62 de *Bacillus* spp. é relativamente igual ou superior em inibir o aparecimento de lesões nas maçãs tratadas com *Alternaria* sp., quando comparado com tratamentos químicos no período de pós-colheita.

O efeito inibitório do isolado F62 de *Bacillus* spp. sobre o desenvolvimento de *Alternaria* sp., em frutas conservadas em câmara fria, foi maior e significativamente diferente na comparação com os outros tratamentos (Figura 24A). Este resultado concorda com os dados apresentados na Figura 18, sobre o desenvolvimento *in vitro* dos fungos desafiados contra os isolados antagônicos de *Bacillus* spp.. Em relação ao isolado FR2B2, os resultados demonstram que não houve proteção. Este resultado difere do encontrado nos testes *in vivo* com armazenamento a temperatura ambiente (Figura 23A), no qual o isolado FR2B2 inibiu o crescimento de *Alternaria* sp., ao contrário do que ocorreu nas maçãs após a retirada da câmara fria. Sholberg *et al.* (1995) encontraram, em seus experimentos, quinze isolados de *Bacillus* spp. capazes de reduzir as podridões causadas por *Penicillium expansum* em maçãs. Algumas de suas linhagens, como EN 71-1, reduziram significativamente as podridões nas três temperaturas testadas, 5°C, 10°C e 20°C, porém outras linhagens, como EN 62-5 e EN 63-1, impediram a expansão das podridões apenas nas temperaturas 5-10°C e 10-20°C, respectivamente. Os autores observaram também, que doze isolados reduziram os sintomas de podridão em temperaturas de armazenagem. Os isolados EN 63-1, EN 71-1 e EN 76-1 demonstraram eficácia em controlar *P. expansum* e *Botrytis cinerea*, em frutas estocadas a 5°C.

Portanto, é possível que o isolado FR2B2 seja eficiente em inibir o crescimento de *Alternaria* sp. apenas na temperatura de 20°C, sendo incapaz de antagonizar este fungo a 0°C ou, que esta baixa temperatura tenha afetado as células deste isolado.

Na Figura 24B, os dados demonstram que o isolado F62 de *Bacillus* spp. inibiu o desenvolvimento inicial das lesões, assim até o sétimo dia de tratamento, houve uma diferença significativa entre o tratamento com este isolado e os outros. Porém, aos 14 dias de experimento o número de lesões em todos os tratamentos era máximo. Este resultado concorda com o observado na Figura 23B, no qual o isolado F62 inibiu o crescimento de *Botrytis* sp. também em temperatura ambiente.

A



B

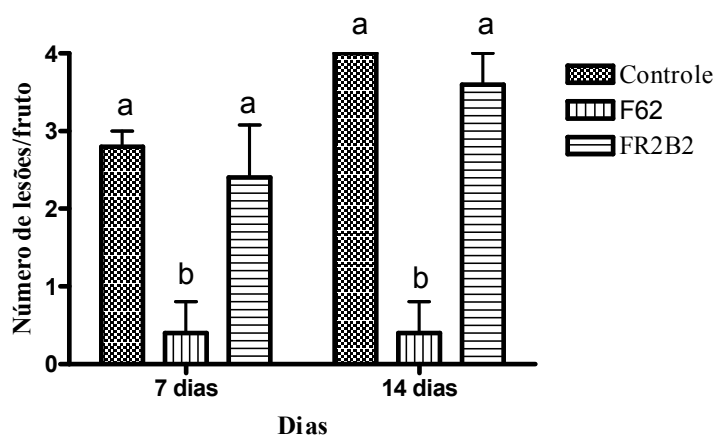
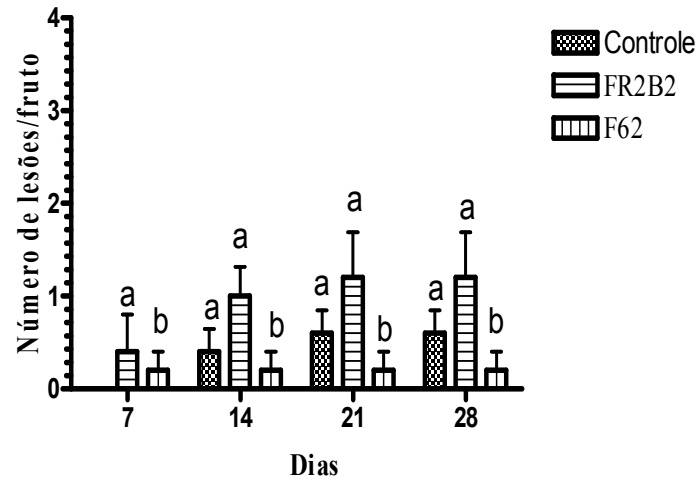


Figura 23. Incidência de lesões desenvolvidas pelos fitopatógenos em frutas tratadas com as culturas de *Bacillus* spp. e armazenadas em temperatura ambiente: A) *Alternaria* sp.; B) *Botrytis* sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

A



B

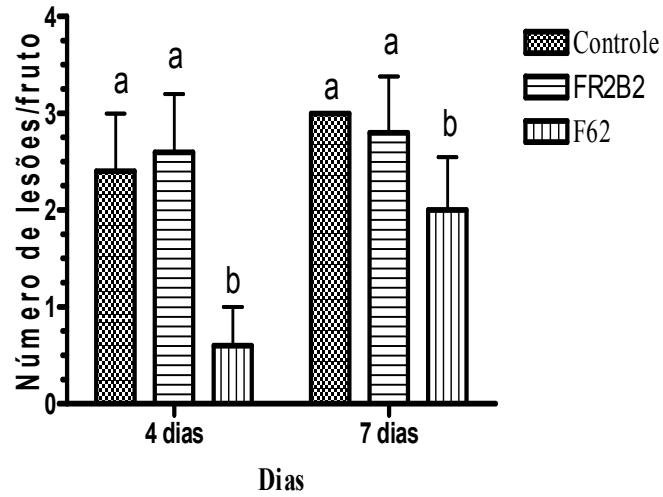
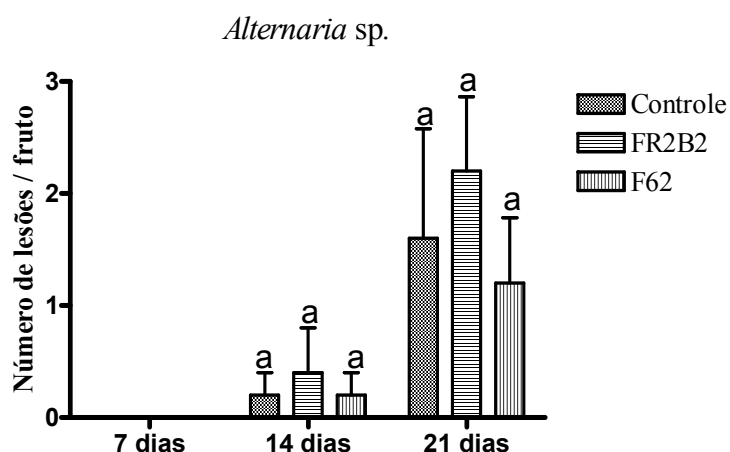


Figura 24. Desenvolvimento de lesões em frutas tratadas após o período de refrigeração: A) *Alternaria* sp.; B) *Botrytis* sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

4.5.1 Avaliação *in vivo* do filtrado da cultura dos isolados F62 e FR2B2.

As maçãs foram tratadas com o caldo de cultura filtrado dos dois isolados bacterianos F62 e FR2B2, juntamente com a inoculação dos fungos *Alternaria* sp. e *Botrytis* sp. Não houve diferença significativa entre o efeito dos caldos de culturas filtrados dos isolados F62 e FR2B2 contra os fungos *Alternaria* sp. e *Botrytis* sp., armazenados a temperatura ambiente (Figura 25).

A



B

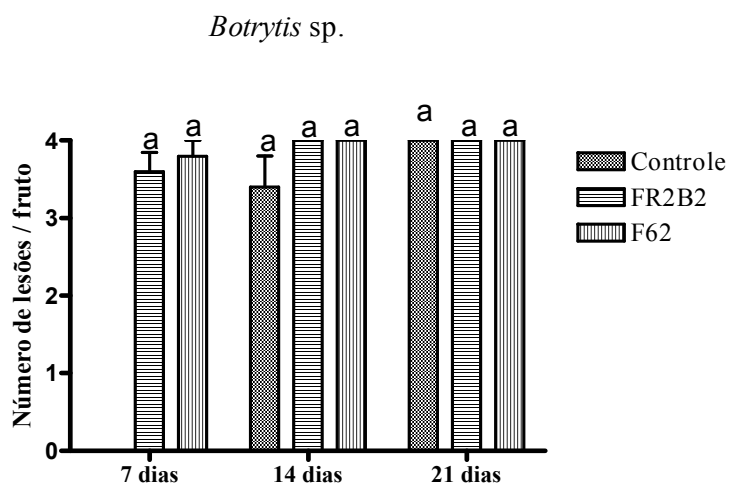


Figura 25. Número de lesões desenvolvidas pelos fitopatógenos em frutas tratadas com o filtrado dos isolados F62 e FR2B2 armazenadas em temperatura ambiente: A) *Alternaria* sp.; B) *Botrytis* sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

As lesões nas frutas tratadas com *Alternaria* sp., demoraram mais para se estabelecer quando comparado com as maçãs tratadas com *Botrytis* sp.. Para *Alternaria* sp. (Figura 25A), as lesões foram percebidas aos 14 dias, enquanto que para *Botrytis* sp., aos sete dias após o tratamento as lesões já estavam presentes em praticamente todas as frutas. Este dado demonstra a agressividade deste fungo e ao mesmo tempo indica que, assim como a doença, o controle biológico depende de vários fatores, que interagem no sítio de infecção, como as características biológicas dos hospedeiros e dos agentes de controle biológico, bem como dos fatores abióticos.

Nas maçãs tratadas com o filtrado, mas mantidas sob refrigeração a 0°C também não houve efeito inibitório por parte dos isolados F62 e FR2B2, após a retirada da câmara fria e exposição a temperatura ambiente (Figura 26).

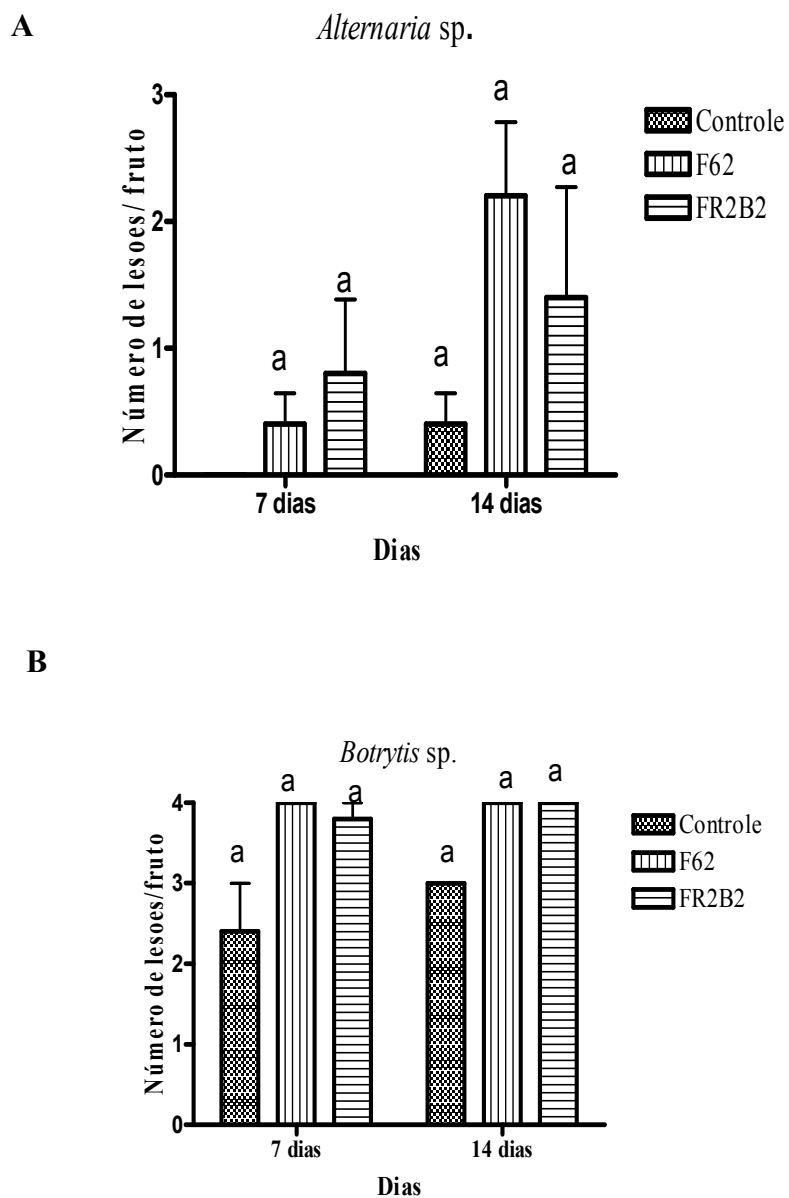


Figura 26. Número de lesões desenvolvidas pelos fitopatógenos em frutas tratadas com o filtrado dos isolados F62 e FR2B2 após a retirada da câmara fria. A) *Alternaria* sp.; B) *Botrytis* sp.. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

4.6 Análise protéica

As frações protéicas encontradas na análise por SDS-PAGE do caldo de cultura dos isolados F62 e FR2B2, do filtrado e do filtrado autoclavado estão apresentadas na Figura 27.

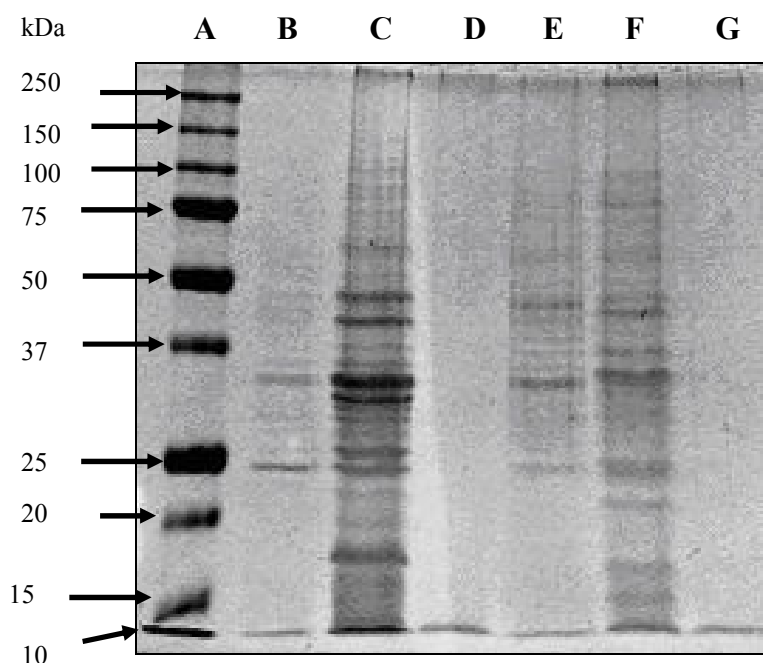


Figura 27. Eletroforese em gel de poliacrilamida. A) marcador molecular; B) células de cultura do isolado F62; C) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm do isolado F62; D) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do isolado F62; E) células de cultura do isolado FR2B2; F) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm do isolado FR2B2; G) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do isolado FR2B2.

A caracterização por eletroforese das proteínas mostrou a presença de dois polipeptídeos de aproximadamente 25 e 35 kDa para as células da cultura do isolado F62 (Figura 27B) e para o isolado FR2B2 uma banda de aproximadamente 49 kDa (Figura 27E). A eletroforese do sobrenadante filtrado revelou a presença de peptídeos de vários tamanhos para o isolado F62, sendo o maior de aproximadamente 50 kDa (Figura 27C). Para o sobrenadante filtrado e autoclavado dos dois isolados, a eletroforese revelou a ausência de proteína (Figuras 27D e 27G).

Dessa maneira, os dados obtidos com os testes *in vitro* para a avaliação da estabilidade térmica, apresentados na seção 5.3, estes sugerem a presença de uma ou mais moléculas não polipeptídicas responsáveis por causar inibição do crescimento micelial dos fungos alvo. Mas estes dados não determinam que não exista uma ou mais proteínas no caldo de cultura, uma vez que o caldo de cultura filtrado também provocou inibição do desenvolvimento micelial. Schulz *et al.* (2005), ao avaliar um isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* identificou, por eletroforese do extrato bruto, seis bandas com peso molecular aparente de 14,8; 20; 29; 30; 34 e 56,2KDa, não diferindo muito dos pesos moleculares encontrados na eletroforese dos extratos brutos dos isolados F62 e FR2B2 identificados no presente trabalho. Segundo o mesmo autor, cepas geneticamente modificadas de *B. subtilis* produziram subtilisina com peso molecular de 28,5 KDa. A segunda maior protease extracelular isolada de *B. subtilis* é a protease neutra (30 KDa) ou metaloprotease (40 KDa). Segundo Jack *et al.* (1995) as bacteriocinas termolábeis de alto peso molecular (>30 KDa) incluem muitas enzimas extracelulares bacteriolíticas que podem mimetizar as atividades fisiológicas das bacteriocinas.

4.7 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

As concentrações de proteínas analisadas pelo método de Bradford do caldo de cultura, filtrado e filtrado autoclavado são mostradas na Figura 28. Verifica-se que a concentração de proteínas entre as células do caldo de cultura do isolado F62 e do isolado FR2B2 foram diferentes. Também houve diferença entre o caldo de cultura do isolado F62 e do caldo filtrado autoclavado de FR2B2. Quanto ao filtrado, houve diferença entre os dois isolados.

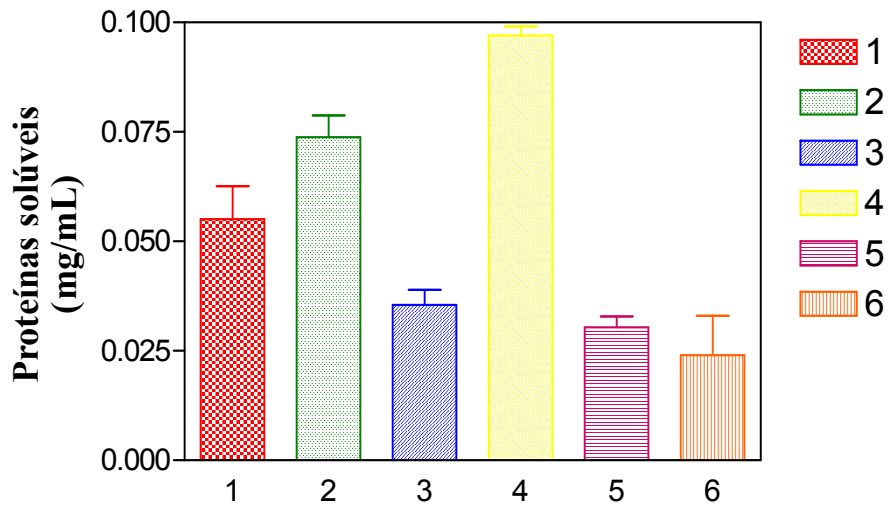


Figura 28. Concentrações médias de proteínas obtidas pelo método de Bradford. 1) células de cultura do isolado F62; 2) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm do isolado F62; 3) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do isolado F62; 4) células de cultura do isolado FR2B2; 5) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm do isolado FR2B2; 6) sobrenadante filtrado em membrana de poro 22 μm e autoclavado do isolado FR2B2.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados do presente trabalho permitiram observar e concluir que:

- . dos 60 isolados de *Bacillus* spp., oito mostraram-se eficazes em inibir o desenvolvimento *in vitro* dos fungos *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. e *Penicillium* sp.;
- . os isolados FR2B2, F62 e FR2B8 suprimiram o desenvolvimento dos fungos fitopatógenos *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp., *in vitro*;
- . há ocorrência de controle do fungo *Botrytis* sp. pelos isolados FR2B2, F62 e FIII3;
- . os metabólitos dos isolados FR2B2 e F62 possuem estabilidade térmica a 120°C e são eficazes em inibir o desenvolvimento micelial dos três fitopatógenos testados *in vitro*;
- . o isolado FR2B8 controlou *in vitro* o crescimento apenas de *Alternaria* sp., após seus metabólitos serem submetidos a altas temperaturas;
- . *Botrytis* sp. teve sua infecção dificultada pelo isolado de *Bacillus* F62 nas duas temperaturas testados em maçãs sadias;
- . *Alternaria* sp. foi controlado pelo isolado F62 na temperatura de 0°C e pelo isolado FR2B2 na temperatura de 20°C;
- . o filtrado bacteriano dos isolados de *Bacillus* spp. testados não foi capaz de interromper as infecções causadas pelos fitopatógenos quando submetido a testes em maçãs sadias;
- . A análise protéica por SDS-PAGE revelou a presença de bandas protéicas com possível atividade inibitória no caldo da cultura, porém foi demonstrado que o caldo de cultura autoclavado foi capaz de inibir o desenvolvimento dos fungos *in vitro*, portanto este dado pode sugerir a existência de outros compostos não protéicos, com atividade inibitória.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas, A.C. (1998). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV. 574p.

Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã (2009). Produção de maçãs no RS por município na safra 2008/09. **Disponível (online)** <http://www.agapomi.com.br/dadosestatisticos.php> (14 de julho de 2009).

Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã (2009). Exportações por país no município de Vacaria em 2008. **Disponível (online)** <http://www.agapomi.com.br/dadosestatisticos.php> (14 de julho de 2009).

Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul – Economia. Produção de maçã no RS. **Disponível (online)** <http://www.seplag.rs.gov.br/atlas/atlas.asp> (13 de julho de 2009).

Barry, T.; Colleran, G.; Glennon, M.; Dunican, L.K.; Gannon, F. (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **Genome Res.** 1: 51-56.

Bassanezi, R.C.; Júnior, G.P. (2005). Um estudo de modelagens alternativas: podridão da maçã. **Biomatemática.** 15: 97-118.

Batista Junior, C. B.; Albino, U. B.; Martines, A. M., Saridakis, D. P.; Matsumoto, L. S.; Avanzi, M. A.; Andrade, G. (2002). Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesq. Agropec. Bras.** 37:1189-1194.

Bertoni, R.B.; Azevedo, C.A.; Silva, P.G.S. (2006). **Indicadores de Produtividade das Empresas Produtoras de Maçãs nos Municípios da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul.** Vacaria: UCS. 120p.

Bettiol, W.; Kimati, H.; (1990). Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae*, agente causal da brusone do arroz. **Pesq. Agrop. Bras.** 25: 1165-1174.

Bittencourt, C.C.; Mattei, L.F. (2008). Panorama da cadeia da maçã no Estado de Santa Catarina: algumas evidências no segmento da produção. In: II Encontro de Economia Catarinense. **Artigo científico.** Pp.87-100 .Chapecó, 2008.

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** 8: 93-99.

Blum, L.E.B.; Amarante, C.V.T.; Valdebenito-Sanhueza, R.M.; Guimarães, L.S.; Dezanet, A.; Neto, P.H. (2004). *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatol. Bras.** 29: 433-436.

Boneti, J.I.; Katsurayama, Y. (1998). **Doenças da macieira.** Epagri – Estação Experimental de São Joaquim.85p.

Bottone, E.J.; Peluso, R.W. (2003). Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. **J.Med.Microbiol.** 52: 69-74.

Brackmann, A.; Giehl, R.F.H.; Sestari, I.; Weber, A.; Pinto, J.A.V.; Eisermann, A.C. (2008). Controle de podridões em maçãs Fuji frigoconservadas com a aplicação de fosfitos e cloretos de benzalcônio em pré e pós-colheita. **Revista da FZVA**. 15: 35-43.

Brackmann, A.; Saquet, A.A.; Veiga, V.V.; Bortoluz, L. (1996). Efeito das concentrações de CO₂ e O₂ no crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* (Link.), Thom, *in vitro*. **Rev.Bras. de Agrociência**. 2: 147-150.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.

Cavaglieri, L.; Orlando, J.; Rodríguez, M. I.; Chulze, S.; Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. **Res. Microbiol.** 156:748-754.

Cesa, L.P.; Junior, W.C.J.; Bogo, A.; Lazaroto, A.; Silva, A.; Amarante, C.V.T. (2006). Análise temporal da sarna da macieira nas cultivares Royal Gala e Fuji sob os sistemas convencional e orgânico de produção. **Fitopatol. Bras.** 31: 585-591.

Chiarini, L.; Bevivino, A.; Dalmastrì, C.; Nacamulli, C.; Tabacchioni, S. (1998). Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Appl. Soil. Ecol.** 8:11-18.

Coelho, A.R., Hoffmann, F.L., Hirooka, E.Y. (2003). Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. In: Seminário Ciências Agrárias. **Revisão**. pp. 337-358. Londrina, 2003.

Coelho, L.F.; Freitas, S.S.; Melo, A.M.T.; Ambrosano, G.M.B. (2007). Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **R.Bras.Ci.Solo**. 31: 1413- 1420.

Collins, D. P.; Jacobsen, B. J. (2003). Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. **Biological Control**. 26:153-161.

Daffonchio, D.; Cherif, A.; Brusetti, L.; Rizzi, A.; Mora, D.; Boudabous, A.; Borin, S. (2003). Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. **Appl. Environ. Microbiol**. 69: 5128-5137.

Denardi, F.; Berton, O.; Spengler, M.M. (2003). Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos. **Rev.Bras.Frutic**. 25: 494-497.

Drancourt, M.; Bollet, C.; Carlouz, A.; Martelin, R.; Gayral, J.P.; Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **J.Clin. Microbiol**. 3623-3630.

Driks, A. (2004). The *Bacillus* spore coat. **The American Phytopathological Society**. 94: 1249-1251.

Edwards, S. G.; Seddon, B. (2001). Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* *in vitro*. **J. Appl. Microbiol.** 91:652-659.

Embrapa Meio Ambiente. (2009). Avaliação de risco de agentes de controle biológico. Disponível (online) <http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=224&func=pesq>. (12 de outubro de 2009).

Feio, S.S.; Cabrita, A.B.M.; Nunes, L.; Esteves, A.; Roseiro, J.C.; Curto, M.J.M. (2004). Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31: 199-203.

Fioravanço, J.C. (2009). Maçã Brasileira: da importação à auto-suficiência e exportação – a tecnologia como fator determinante. **Informações Econômicas.** 39: 1-12.

Foldes, T.; Bánhegyi, I.; Herpai, Z.; Varga, L.; Szigeti, J. (2000). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. **J. Appl. Microbiol.** 89: 840-846.

Garbeva, P.; van Veen, J.A.; van Elsas, J.D. (2004). Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annu.Rev.Phytopathol.** 42: 243-270.

Gardener, B.B.M.; Fravel, D.R. (2002). Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. **Plant Health Progress.** 10:1094.

Girardi, C.L.; Sanhueza, R.M.V.; Bonder, R.J. (2002). Manejo pós-colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs. **Circular técnica-** Embrapa.

Gomes, N.S.B.; Junior, A.G.; Auer, C.G.; Santos, A.F. (2000). Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Bol. Pesq. Fl.** 43: 123-138.

Gordon, R.E. (1973). **The Genus Bacillus**. Agriculture Research Service. 283p.

Goto, K.; Omura, T.; Hara, Y.; Sadaie, H. (1999). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. **J.Gen. Appl.Microbiol.** 46: 1-8.

Govrin, E.M.; Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Curr. Biol.** 10: 751-757.

Hang, N.T.T.; Oh, S.; Kim, G.H.; Hur, J.S.; Koh, Y.J. (2005). *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. **Plant. Pathol. J.** 21: 59-63.

Jack, R. W.; Tagg, J. R.; Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.** 39: 171-200.

Janisiewicz W. (1999). Blue mold – fruit disease focus. **Disponível (online)** http://www.caf.wvu.edu/KEARNEYSVILLE/disease_month/bluemold0199.html (20 de setembro de 2009).

Jones, A.L.; Aldwinckle, H.S. (1997). **Compendium of apple and pear diseases**. 3 ed. Minnessota: The American Phytopathological Society. 100p.

Júnior, A.G.; Santos, A.F.; Auer, C.G. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**. 30: 155-165.

Kavitha, S.; Senthilkumar, S.; Gnanamanickam, S.; Inayathullah, M.; Jayakumar, R. (2005). Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. **Process Biochemistry**. 40:3236-3243.

Klein, C.; kaletta, C.; Entian, K.D. (1992). Biosynthesis of the Lantibiotic Subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 296-303.

Klein, C.; Entian, K.D. (1994). Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 2793-2801.

Kretschmar, A.A.; Marodin, G.A.B.; Duarte, V.; Valdebenito-Sanhueza, R.M.; Guerra, D.S. (2007). Efeito de fitorreguladores sobre a incidência de podridão carpelar em maçãs “Fuji”. **Rev.Bras.Frútic.** 29: 414-419.

Kupferman, E. (1986). Controlo f major postharvest apple diseases. **Disponível (online)** <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pgDisplay.php?article>. (8 de novembro de 2007).

Kupper, K.C.; Gimenes-Fernandes, N.; Goes, A. (2003). Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatol. Bras.** 28: 251-257.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227:680-685, 1970.

Lecadet, M. M.; Chaufaux, J.; Ribier, J. E.; Lereclus, D. (1992). Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:840-849.

Leclère, V.; Béchet, M.; Adam, A.; Guez, J.S.; Wathelet, B.; Ongena, M.; Thonart, P.; Gancel, F.; Chollet-Imbert, M.; Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 4577-4584.

Leifert, C.; Li, H.; Chidburee, S.; Hampson, S.; Workman, S.; Sigeo, D.; Epton, H.A.S.; Harbour, A. (1995), Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **J. Appl. Bacteriol.** 78: 97-108.

Leibienger W.; Breuker, B.; Hahn M.; Mendgen K. (1997). Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. **Biological control.** 87: 1103-1110.

Maldonado, M.C.; Corona, J.; Gordillo, M. A.; Navarro, A.R. (2009). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites produced by *Bacillus* sp. IBA 33. **Curr. Microbiol.**

Mannanov, R.N.; Sattarova, R.K. (2001). Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. **Chemistry of Natural Compounds.** 37: 117-123.

Medeiros, P.T.; Ferreira, M.N.; Martins, E.S.; Gomes, A.C.M.M.; Falcão, R.; Dias, J.M.C.S.; Monnerat, R.G. (2005). Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesq. Agropec. Bras.** 40:1145-1148.

Melo, F.M.P. (2005). Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil.

Melo, I.S., Azevedo, J.L. (1998). **Controle Biológico**. Vol.1. Jaguariúna: Embrapa, 262 p.

Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **Int.Microbiol.** 6: 245-252.

Munimbazi, C.; Bullerman, L.B. (1997). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. **J. Appl. Microbiol.** 84: 959-968.

Oliveira-Filho, E.C.; Faria, M.R.; Castro, M.L.M.P. (2004). **Regulamentação de produtos biológicos para o controle de pragas agrícolas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 34p.

Pádua, R.A.F.; Junior, M.M. (2005). Aspectos toxicológicos e ocorrência de patulina em suco de maçã. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.** 26: 535-542.

Pal, K.K.; Gardener, B.M. (2006). Biological control of plant pathogens. **The Plant Health**

Instructor. 36: 1117-02.

Paterson, R.R.M. (2006). Some fungicides and growth inhibitor/biocontrol-enhancer 2-deoxy-D-glucose increase patulin from *Penicillium expansum* strains *in vitro*. **Crop Protection.** 26: 543-548.

Pereira, L.B.; Simioni, F.J.; Cario, S.A.F. (2006). Evolução da produção de maçã em Santa Catarina: novas estratégias em busca da competitividade. In: XLIV Congresso da Sober: Questões Agrárias, Educação no Campo e Desenvolvimento. **Anais.** pp.1-21. Fortaleza, 2006.

Pettit, R. E.; Taber, R. A.; Foster, B. G. (1968). Occurrence of *Bacillus subtilis* in peanut kernels. **Phytopathology.** 58:254-255.

Pianzolla, M.J.; Moscatelli, M.; Vero, S. (2004). Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. **Plant. Dis.** 88: 23-28.

Pusey, P. L.; Wilson, C. L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant. Dis.** 68:753-756.

Qi-quin, L.; Xian-ying, M.; Xue, W.; Wei, L.; Cheng-jie, D.; Jia-xun, F.; Jiliang, T. (2006). Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. **Agricultural Sciences in China.** 5: 363-369.

Raaijmakers, J.M.; Vlami, M.; Souza, J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 81: 537-547.

Resolução da Anvisa nº 194, de 08 de julho de 2002. **Disponível (online)** <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>. (05 de agosto de 2009).

Ritchie, L.E.; Steiner, J.M.; Suchodolski, J.S. (2008). Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using by 16S rRNA gene analysis. **FEMS. Microbiol. Ecol.** 66: 590-598.

Rolleberg, C.L. (2008). Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Romeiro, R.S.(2007). **Controle biológico de doenças de plantas - fundamentos**. Viçosa: UFV. 269p.

Romeiro, R.S.(2007). **Controle biológico de doenças de plantas - procedimentos**. Viçosa: UFV. 172p.

Ross, G.U.; Taniwaki, M.H.; Sabino, M.; Vizoni, T.; Hirooka, E.Y. (1998). Produção de patulina em maçã (*Malus domestica* Borkhausen), cultivares Gala e Fuji inoculadas com *Penicillium* spp. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 18: 63-67.

Sacchi, C.T.; Whitney, A.M.; Mayer,L.W.; Morey, R.; Steigerwalt,A.; Boras, A.; Weyant, R.S.; Popovic, T. (2002). Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerg. Infect. Dis.** 8: 1-7.

Sanhueza, R.M.V. (2009). Doenças de maçãs em pós-colheita e uso de desinfetantes para o seu controle. Disponível (online): <http://www.agapomi.com.br/jornal.php> (14 de julho).

Santos, J.P.; Corrent, A.R.; Berton, O.; Schwarz, L.L.; Denardi, F. (2008). Incidência de podridão-branca em frutos da macieira com e sem fermentos. **Rev. Bras.Frusic.** 30: 118-121.

Santos, J.P.; Wanser, A.F. (2006). Efeito do ensacamento de frutos sobre danos causados por fatores bióticos e abióticos em pomar orgânico de macieira. **Rev.Bras.Frusic.** 28: 168-171.

Schulz, D.; Marques, M, R.F.; Muller,I.C.; Batista, C.R.V. (2005). *Bacillus amyloliquefaciens* como potencial bioconservante de alimentos: determinação do perfil de proteínas e aminograma. **Alim. Nutr.** 16: 65-70.

Senhor, R.F.; De Souza, P.A.; Neto, R.C.A.; Maracajá, P.B.; Nascimento, F.J. (2009). Manejo de doenças pós-colheita. **Revista Verde.** 4: 00-13.

Shiomi, H.F.; Melo, I.S.; Minhoni, M.T.A. (2008). Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonica a fitopatógenos. **Scientia Agraria.** 9: 535-538.

Sholberg, P. L.; Marchi, A.; Bechard, J. (1995). Biocontrol of postharvest diseases of apple using *Bacillus* spp. isolated from stored apples. **Can. J. Microbiol.** 41:247-252.

Silo-Suh, L.A.; Lethbridge, B.J.; Raffel, S.J.; He, H.; Clardy, J.; Handelsman, J. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. **Appl. Environ.**

Microbiol. 60: 2023-2030.

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.** 18: 283-299.

Singh,V.; Deverall, B. J. (1984). *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 83:487-490.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Mol. Microbiol.** 56: 845-857.

Szekat, C.; Jack, R.W.; Skutlarek, D.; Farber,H.; Bierbaum, G. (2002). Construction of an expression system for site-directed mutagenesis of the lantibiotic mersacidin. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 3777-3783.

Tamehiro, N.; Okamoto-Hosoya, Y.; Okamoto, S.; Ubukata, M.; Hamada, M.; Naganawa, H.; Ochi, K. (2002). Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 46: 315-320.

Touré, Y.; Ongena, M.; Jacques, P.; Guiro, A.; Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **J.Appl.Microbiol.**96: 1151-1160.

Walker, J.; Rapley, R. (2008). **Molecular Biometods Handbook.** 2 ed. Hertfordshire: Humana Press.1124p.

Walker, R.; Powell, A. A.; Seddon, B. (1998). Bacillus isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. **J. Appl. Microbiol.** 84:791-801.

Welke, J.E.; Hoeltz, M.; Dottori, H.A.; Noll, I.B. (2009). Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. **Cienc. Rural.** 39: 300-308.

Who. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide (1985). Geneva: UNDP/World Bank . 24p. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

Widjoatmodjo M.N.; Fluit, A.D.C.; Verhoef, J. (1995). Molecular identification of bacteria by fluorescence- based –PCR- single strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. **J.Clin. Microbiol.** 33:2601-2606.

Wilson, K.H.; Blitchington, R.B.; Greene, R.C. (1990). Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **J.Clin.Microbiol.** 28: 1942-1946.

Urbanietz, A.; Dunemann, F. (2005). Isolation, identification and molecular characterization of physiological races of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). **Plant Pathology.** 54: 125-133.

Utkhede, R. S.; Sholberg, P. L. (1986). *In vitro* inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and *in vivo* control of two postharvest cherry diseases. **Can. J. Microbiol.** 32:963-967.

Vincelli, P.; Tisserat, N. (2008). Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. **Plant disease.** 92: 660-669.

Xu, X-M. (1999). Modelling and forecasting epidemics of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). **Plant Pathology.** 48: 462-471.

Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.; Lichtig, J. (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova.** 21:6.

Zheng, L.; Campbell, M.; Murphy, J.; Lam, S.; Xu, J.R. (2000). The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Mol. Plant. Microbe. Interact.** 13: 724-732.