

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**FORMULAÇÃO DE *Aureobasidium pullulans* PARA
CONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM
FRUTOS CÍTRICOS**

Vanessa Santos Moura

Engenheira Agrônoma

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**FORMULAÇÃO DE *Aureobasidium pullulans* PARA
CONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM
FRUTOS CÍTRICOS**

Vanessa Santos Moura

Orientadora: Prof. Dra. Katia Cristina Kupper

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2022

M929f Moura, Vanessa Santos
Formulação de *Aureobasidium pullulans* para controle de doenças
de pós-colheita em frutos cítricos / Vanessa Santos Moura. --
Jaboticabal, 2022
85 f. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Katia Cristina Kupper

1. Controle biológico. 2. levedura killer. 3. *Geotrichum*
citri-aurantii. 4. *Penicillium digitatum*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: FORMULAÇÃO DE *Aureobasidium pullulans* PARA CONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM FRUTOS CÍTRICOS

AUTORA: VANESSA SANTOS MOURA

ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

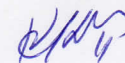
Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER (Participação Virtual)
Centro de Citricultura / IAC Instituto Agronomico de Campinas CordeiropolisSP



Profa. Dra. ELIDA BARBOSA CORRÊA (Participação Virtual)
Universidade Estadual da Paraíba-Campus II - Sítio Imbaúba / Lagoa Seca/PB

P/ 

Profa. Dra. FERNANDA DIAS PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

P/ 

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IBILCE / UNESP - Rio Claro

P/ 

Profa. Dra. MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV / UNESP - Jaboticabal

P/ 

Jaboticabal, 08 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VANESSA SANTOS MOURA – Nascida em 16 de janeiro de 1991 em Manaus, AM. Iniciou sua graduação em Agronomia em março de 2010 na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, na cidade de Manaus, AM, concluindo seu bacharelado em maio de 2015. Durante a graduação, foi bolsista no programa de educação tutorial - PET Agronomia, durante quase toda sua formação acadêmica, sob orientação do Prof. Dr. Ari de Freitas Hidalgo, foi bolsista de iniciação científica do CNPq-PIBIC, no Instituto de Pesquisa do Amazonas – INPA, sob a orientação do Prof. Dr. Hugo Iriarte Martel e bolsista de iniciação científica do FAPEAM-PIBIC, na Universidade Federal do Amazonas atuando na área de Fitopatologia e Controle Biológico, sob a orientação da Profa. Dra. Solange de Mello Vêras. Em agosto de 2015 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Katia Cristina Kupper, como bolsista CNPq, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro Avançado de Pesquisa de Citros “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP. Em agosto de 2017 ingressou no curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, como bolsista Capes, desenvolvendo seu projeto de doutorado no Centro Avançado de Pesquisa de Citros “Sylvio Moreira”/IAC, sob a orientação da profa. Dra. Katia C. Kupper.

Epígrafe

segura as pontas
que você dá conta, mulher

você não cogitou ir tão longe
e mesmo assim conseguiu

é arrebatador
traçar o próprio roteiro

Ryane Leão

Dedicatória

A minha mãe **Maria do Rosário Santos Moura**, que me ensinou tanto e tornou possível a realização deste sonho, e de tantos outros, em minha vida. Obrigada mãe, eu te amo mais do que as palavras podem expressar.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a **Deus**, por ter abençoado e iluminado meu caminho, todos os dias da minha vida, sua presença me dar forças para seguir sempre em frente.

Meu agradecimento amoroso, à minha mãe **Maria do Rosário Santos Moura** e aos meus irmãos **Silvia Santos Moura** e **Wagner Santos Moura** por nunca soltarem a minha mão, por serem minha fortaleza, meu amparo e minha alegria. Muito obrigada pelo amor incondicional, vocês são meu orgulho e minha inspiração. Ao meu pai **Mario Silvio dos Santos Moura** pelo carinho, apoio, incentivo e por acreditar em mim. Vocês vibram comigo, choram comigo e me levantam. Do fundo do meu coração e da minha alma, obrigada.

Ao programa de **Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP/Jaboticabal**, pela oportunidade de participar e desenvolver meu doutorado e a todos os funcionários, principalmente ao pessoal da seção de Pós-graduação, que sempre foram muito gentis e atenciosos.

A minha Orientadora **Katia Cristina Kupper** sou grata por seu encorajamento, pela paciência e por revisar incansavelmente este manuscrito. Eu sei que este fim é na verdade apenas um início, mas não consigo imaginar nada disso sem você.

Gostaria de agradecer, em especial, a professora **Solange de Mello Vêras**, você acreditou e apostou em mim, eu não teria ido tão longe sem seu encorajamento.

Com carinho todo especial aos meus sobrinhos **Elvio Neto** e **Heitor**, meus anjos que alegram meu coração. Amarei vocês para sempre, mesmo quando não puder mais.

Ao **Matheus da Silva Ferreira** obrigada por segurar minha mão em todos os percalços dessa aventura. Seu apoio e amor me ajudam todos os dias.

Aos amigos que conquistei ao longo desta jornada **Luriany, Andreia, Aline, Flávia, Bianca, Deborah, Fernanda, Natalia, Alisson e Lucas** por toda ajuda concedida para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, apoio e afeto que nunca me deixaram faltar, vocês tornaram tudo mais gratificante e feliz.

Guardarei eternamente em meu coração, amo cada um de vocês. Que possamos chegar ainda mais alto.

Às minhas amigas **Nátalia Sarmanho** e **Laiana Lobo**, a vida nos leva por caminhos inesperados, e sou grata que tenhamos caminhado juntas por este trecho. À **Larissa Holanda** sou grata por seu encorajamento e por me ajudar a compreender meu cérebro, sua amizade é um presente. Gostaria de agradecer, também, a **Fernanda Barbosa**, sua amizade foi uma surpresa feliz e sinto que ganhei mais que uma amiga, ganhei uma irmã.

Ao **Centro Avançado de Pesquisa de Citros “Sylvio Moreira” – IAC** por disponibilizar o laboratório e toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho. A todos os funcionários do Centro de Citricultura, em especial à **Maria, Rose, Lordes, Isabel, Nadji, Vivian, Gomes, Nidelce e Valéria**, pelo carinho, simpatia e gentileza.

Ao **Núcleo de Inovação Tecnológica – IAC** por toda ajuda e apoio necessário ao depósito de pedido de patente, em especial a **Janice** e a **Lilian** vocês foram anjos em minha vida.

À **Citrícola Lucato** pela doação dos frutos para os meus experimentos.

À **FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo financiamento da pesquisa (Proc. nº 2019 / 07296-9).

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Importância da Citricultura	3
2.2 Doenças na pós colheita de Citros	5
2.3 Controle	8
2.4 Controle Biológico	9
2.5 Desenvolvimentos de bioprodutos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Microrganismos	14
3.2. Composição do meio de cultura para cultivo da levedura.....	14
3.3. Determinação da viabilidade e biomassa seca de células de <i>Aureobasidium pullulans</i>	15
3.4. Produção de biofilme por <i>Aureobasidium pullulans</i>	16
3.5. Efeito da molaridade do tampão fosfato de sódio e pH em células de <i>Aureobasidium pullulans</i>	17
3.6. Formulações e vida de prateleira	18
3.7. Manutenção da atividade <i>killer</i> de <i>Aureobasidium pullulans</i> -ACBL-77 nas formulações	18
3.8. Detecção e quantificação de sideróforos de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 na formulação	19
3.9. Efeito das formulações à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> e de <i>Penicillium digitatum</i>	20
3.10. Efeito da formulação, à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> , na germinação do fitopatógeno	20
3.11. Controle da podridão azeda e do bolor verde em frutos cítricos utilizando a formulação à base de <i>Aureobasidium pullulans</i>	21
3.12. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> nos parâmetros de qualidade dos frutos cítricos	22
3.12.1 Rendimento de suco	23
3.12.2 Teor de sólidos solúveis totais (SS)	23
3.12.3 Acidez total titulável (ATT)	24

3.12.4 <i>Ratio</i>	24
3.13. Análise estatística	25
4. RESULTADOS	25
4.1. Determinação da viabilidade e biomassa seca de células de <i>Aureobasidium pullulans</i>	25
4.2. Produção de biofilme por <i>Aureobasidium pullulans</i>	27
4.3. Efeito da molaridade do tampão fosfato de potássio e do pH na produção de células de <i>Aureobasidium pullulans</i>	28
4.4. Formulações e vida de prateleira.....	29
4.5. Manutenção da atividade killer de <i>Aureobasidium pullulans</i> -ACBL-77 nas formulações.....	32
4.6. Detecção e quantificação de sideróforos de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 na formulação	34
4.7. Efeito das formulações à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> e de <i>Penicillium digitatum</i>	34
4.8. Efeito da formulação à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> sobre a germinação dos fitopatógenos	39
4.9. Formulação à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> no controle da podridão azeda e do bolor verde em frutos cítricos	41
4.9.1. Podridão Azeda.....	41
4.9.1.1 Lima ácida Tahiti.....	41
4.9.1.2 Laranja Pêra	48
4.9.1.3 Tangerina Murcott.....	51
4.9.2. Bolor Verde	52
4.9.2.1 Lima ácida Tahiti.....	52
4.9.2.2 Laranja Pêra	57
4.9.2.3 Tangerina Murcott.....	62
4.10. Efeito da aplicação do produto à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> nos parâmetros de qualidade dos frutos cítricos	65
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS	77

FORMULAÇÃO DE *Aureobasidium pullulans* PARA CONTROLE DE DOENÇAS DE PÓS-COLHEITA EM FRUTOS CÍTRICOS

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de citros, tanto para o consumo *in natura* como na forma industrializada de sucos concentrados. No entanto, o setor citrícola sofre com as doenças que ocorrem na fase de pós-colheita, as quais são iniciadas no campo e se desenvolvem durante o beneficiamento dos frutos em *packing houses*. A podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*) e o bolor verde (*Penicillium digitatum*) se destacam, em termos de importância econômica, dentre as doenças que ocorrem na pós-colheita de citros, as quais são responsáveis pela diminuição da qualidade e quantidade de frutos. A utilização de microrganismos antagonistas no desenvolvimento de formulações e o aumento do número de pesquisas na área podem contribuir para a utilização de uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos. O processo de formulação deve atingir, principalmente, quatro objetivos básicos: i) estabilizar o antagonista durante a produção, distribuição e armazenamento do bioproduto; ii) facilitar o manuseio e aplicação pelo agricultor; iii) proteger o agente de fatores ambientais nocivos e, finalmente, iv) manter a atividade do organismo no local de uso. Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Citricultura Sylvio Moreira/IAC mostraram o potencial da levedura *Aureobasidium pullulans*–ACBL-77 no controle destas doenças. Diante deste contexto, este trabalho visou investigar uma formulação à base da levedura *A. pullulans* buscando desenvolver uma tecnologia de manejo de controle na fase de pós-colheita, a fim de encontrar uma alternativa para o controle dessas doenças. Para tal foram avaliados: (i) a viabilidade e a biomassa de *A. pullulans*-ACBL-77 em diferentes meios de cultivo; (ii) a produção de biofilme por *A. pullulans* nos diferentes meios de cultura; (iii) o efeito da molaridade do tampão fosfato de potássio e pH em células da levedura; (iv) o melhor agente de preservação da levedura no processo de formulação e a vida-de-prateleira do produto; (v) a atividade *killer* de *A. pullulans* ACBL-77 após formulação; (vi) a detecção e quantificação de sideróforos produzidos por *A. pullulans*-ACBL-77 na formulação; (vii) o efeito das formulações à base de *A. pullulans* na inibição do crescimento micelial de *G. citri-*

aurantii e de *P. digitatum*; (viii) o efeito da formulação à base de *A. pullulans* na germinação de *G. citri-aurantii* e de *P. digitatum*; (ix) a eficiência da formulação à base de *A. pullulans* no controle *in vivo* da podridão azeda e do bolor verde em frutos cítricos e, finalmente, (x) verificar o efeito da aplicação do produto formulado quanto aos parâmetros de qualidade dos frutos cítricos. Os resultados deste estudo mostraram que o produto formulado à base de *A. pullulans* ACBL-77 proporcionou a viabilidade da levedura por seis meses de armazenamento a 4°C, manteve as suas atividades de antagonismo (*killer* e produção de sideróforos) e inibiu a germinação dos conídios dos fitopatógenos. Além disso, o bioproduto independente da concentração testada, controlou, preventiva e curativamente, a podridão azeda em frutos de lima ácida Tahiti e de laranja Pêra. No entanto, para o bolor verde o produto formulado controlou de forma preventiva a doença em os frutos de laranja Pêra e, a sua eficiência de controle foi maior quando os frutos foram armazenados em câmara fria (10°C). O produto formulado não afetou os parâmetros de qualidade dos frutos cítricos. Com base nesses resultados, a formulação à base da levedura tem grandes possibilidades de ser comercializada para o biocontrole na pós-colheita de citros.

Palavras-chave: Controle biológico, levedura *killer*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Penicillium digitatum*,

FORMULATION OF *Aureobasidium pullulans* FOR POSTHARVEST DISEASE CONTROL IN CITRUS FRUITS

ABSTRACT

Brazil is one of the largest citrus producers, both for fresh consumption and in the industrialized form of concentrated juices. However, the citrus industry suffers from diseases that occur in the post-harvest phase, which start in the field and develop during fruit processing in packing houses. The Sour rot (*Geotrichum citri-aurantii*) and the green mold (*Penicillium digitatum*) stand out, in terms of economic importance, among the diseases that occur in the postharvest of citrus, they are responsible for the decrease in the quality and quantity of fruits. The use of antagonistic microorganisms in the development of formulations and the increase in the number of researches in this area can contribute to the use of an alternative to synthetic fungicides. The formulation process must achieve, mainly, four basic objectives: i) stabilize the antagonist during production, distribution and storage of the bioproduct; ii) facilitate handling and application by the farmer; iii) protect the agent from harmful environmental factors and, finally, iv) maintain the activity of the organism at the place of use. Works developed at the Laboratory of Phytopathology and Biological Control of the Advanced Center for Research and Development of Citriculture Sylvio Moreira/IAC showed the potential of the yeast *Aureobasidium pullulans*–ACBL-77 to control these diseases. The present study aimed to develop a formulation based on the yeast *A. pullulans* ACBL-77 as an alternative control. To this end, the following were evaluated: (i) the viability and biomass of *A. pullulans*-ACBL-77 in different culture media; (ii) biofilm production by *A. pullulans* in different culture media; (iii) the effect of potassium phosphate buffer molarity and pH on yeast cells; (iv) the best yeast preservation agent in the formulation process and product shelf life; (v) the killer activity of *A. pullulans* ACBL-77 after formulation; (vi) detection and quantification of siderophores produced by *A. pullulans*-ACBL-77 in the formulation; (vii) the effect of formulations based on *A. pullulans* in inhibiting the mycelial growth of *G. citri-aurantii* and *P. digitatum*; (viii) the effect of the formulation based on *A. pullulans* on the germination of *G. citri-aurantii* and *P. digitatum*; (ix) the efficiency of the formulation based on *A. pullulans* in vivo control of sour rot and green mold in citrus fruits and, finally, (x) verify the effect of the application of the formulated

product on the quality parameters of citrus fruits. The results of this study showed that the product formulated based on *A. pullulans* ACBL-77 provided yeast viability for six months of storage at 4°C, maintained its antagonism activities (killer and siderophore production), and affected the conidial germination of the phytopathogens. Furthermore, the bioproduct, regardless of the concentration tested, controlled, preventively and curatively, the sour rot in Tahiti lime and Pêra orange fruits. However, for green mold, the formulated product preventively controlled the disease in Pêra orange fruits, and its control efficiency was greater when the fruits were stored in a cold chamber (10 °C). The formulated product did not affect the quality parameters of the citrus fruits. Based on these results, the yeast-based formulation has great possibilities of being commercialized for the biocontrol of citrus post-harvest.

Keywords: Biological control, killer yeast, *Geotrichum citri-aurantii*, *Penicillium digitatum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produtos comerciais à base de levedura antagônicos desenvolvidos para o manejo de patógenos pós-colheita	12
Tabela 2. Valores de referência da porcentagem de suco dos cultivares (Pio et al., 2005)	23
Tabela 3. Valores de referência de sólido solúveis totais (°Brix) suco dos cultivares (Pio et al., 2005)	23
Tabela 4. Valores de referência da porcentagem de acidez titulável dos cultivares (Pio et al., 2005)	24
Tabela 5. Produção média de biomassa de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77, após cultivo em diferentes meios de cultura	26
Tabela 6. Atividade <i>killer</i> de <i>A. pullulans</i> ACBL-77, a partir do produto formulado e armazenado por três meses, sob diferentes temperaturas, contra a levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006, <i>Geotrichum citri-aurantii</i> e <i>Penicillium digitatum</i>	32
Tabela 7. Atividade <i>killer</i> de <i>A. pullulans</i> ACBL-77, a partir do produto formulado e armazenado por seis meses, sob diferentes temperaturas, contra a levedura sensível <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006, <i>Geotrichum citri-aurantii</i> e <i>Penicillium digitatum</i>	33
Tabela 8. Quantificação de sideróforos de <i>A. pullulans</i> ACBL-77 na formulação após três e seis meses de armazenamento	34
Tabela 9. Análise de Variância para efeito das formulações à base de <i>A. pullulans</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> e suas interações	35
Tabela 10. Efeito da concentração de glicerol na formulação à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> , na inibição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias	35
Tabela 11. Efeito da concentração de Goma Xantana na formulação à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> , na inibição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias	36
Tabela 12. Efeito da temperatura de armazenamento da formulação à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias	36
Tabela 13. Efeito da interação dos fatores (Glicerol x Goma Xantana) na formulação à base de <i>Aureobasidium pullulans</i> na inibição do	36

crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias

Tabela 14. Análise de Variância para efeito das formulações à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* e suas interações **37**

Tabela 15. Efeito da concentração de glicerol, na formulação à base de *Aureobasidium pullulans*, na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias **38**

Tabela 16. Efeito da concentração de Goma Xantana na formulação à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias **38**

Tabela 17. Efeito da temperatura de armazenamento da formulação à base de *Aureobasidium pullulans*, na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias **38**

Tabela 18. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* na porcentagem de rendimento médio de suco de lima ácida Tahiti **65**

Tabela 19. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* no teor de sólidos solúveis totais (°Brix) em lima ácida Tahiti... **65**

Tabela 20. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* no do teor de sólidos solúveis totais (°Brix), após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos **66**

Tabela 21. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100mL de amostra) em frutos de lima ácida Tahiti **66**

Tabela 22. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de acidez total titulável (ATT) de lima ácida Tahiti, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos **66**

Tabela 23. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável) em frutos de lima ácida Tahiti **67**

Tabela 24. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* na porcentagem de rendimento médio de suco de laranja Pêra **67**

Tabela 25. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* no teor de sólidos solúveis totais (°Brix) em laranja Pêra **67**

Tabela 26. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100mL de amostra) em frutos de lima ácida Tahiti	68
Tabela 27. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> nos valores médios de acidez total titulável (ATT) de lima ácida Tahiti, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos	68
Tabela 28. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> nos valores médios de “Ratio” em frutos de laranja Pêra	68
Tabela 29. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> nos valores médios de “Ratio” de laranja Pêra, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos	69
Tabela 30. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> na porcentagem de rendimento médio de suco de tangerina Murcott	69
Tabela 31. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> no teor de sólidos solúveis totais (°Brix) de tangerina Murcott.	69
Tabela 32. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100mL de amostra) em frutos de tangerina Murcott	70
Tabela 33. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> nos valores médios de acidez total titulável (ATT) de tangerina Murcott, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos	70
Tabela 34. Efeito da aplicação do produto formulado à base de <i>A. pullulans</i> nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável) em frutos tangerina Murcott	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A – colônia do isolado *Geotrichum citri-aurantii*, após 7 dias de crescimento, em placa contendo meio BDA; B – Fruto de laranja Pêra com sintomas de podridão azeda, após sete dias de inoculação. Arquivo pessoal 6
- Figura 2.** Sintomas da podridão azeda em limão-galego na pré-colheita. Fonte: Gusella et al., 2021 6
- Figura 3.** Desenvolvimento do sintoma do bolor verde em fruto cítrico por *P. digitatum* a 25 °C. C: Fruto inoculado com água. Fonte: Qian et al., 2019 7
- Figura 4.** Produção de células viáveis de *Aureobasidium pullulans* (ACBL-77) após cultivo em diferentes meios 26
- Figura 5.** Formação de biofilme por *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, cultivada após 48 horas em diferentes meios de cultura. Os dados representam a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) 27
- Figura 6.** Efeito da molaridade do tampão fosfato de potássio adicionado aos meios de cultura YEPD e Vitamina com sais minerais no crescimento de *A. pullulans* ACBL-77. Dados transformados em log (10+1). TP= tampão fosfato de sódio 28
- Figura 7.** Efeito do pH na viabilidade de células de *A. pullulans*-ACBL-77, cultivada em meio líquido YEPD 29
- Figura 8.** Sobrevivência de *Aureobasidium pullulans*-ACBL-77, em diferentes formulações armazenadas nas temperaturas de 25 ± 2 e 4°C , avaliada através da unidade formadora de colônia da levedura por ml da formulação (UFC/ml), durante seis meses de armazenamento. G = Glicerol; GX = Goma Xantana 31
- Figura 9.** Atividade *killer* de *A. pullulans* ACBL-77, a partir do produto formulado e armazenado por três meses e seis meses. (A) G (20%) + GX (5g) a 4°C contra *Saccharomyces cerevisiae*; (B) G (20%) + GX (4g) a 4°C contra *Geotrichum citri-aurantii*; (C) G (20%) + GX (4g) a 27°C contra *Penicillium digitatum*, após três meses de armazenamento e, (D) G (20%) + GX (5g) a 4°C contra *S. cerevisiae*; (E) G (40%) + GX (5g) a 4°C contra *G. citri-aurantii*; (F) G (40%) + GX (5g) a 4°C contra *P. digitatum*, após seis meses de armazenamento 33
- Figura 10.** Efeito da formulação à base de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*. (A) Tratamento controle; (B) Pareamento com o formulado G (20%) + GX (5g/L) a 4°C contra *Geotrichum citri-aurantii* 37

- Figura 11.** Efeito da formulação à base de *A. pullulans* ACBL-77 na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. (A) Tratamento controle; (B) Pareamento com o formulado G (20%) + GX (3g/L) a 4°C contra *P. digitatum* 39
- Figura 12.** Porcentagem de conídios germinados de *Geotrichum citri-aurantii*, sob ação da levedura *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 e de diferentes concentrações da formulação a base da levedura + Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) 40
- Figura 13.** Porcentagem de conídios germinados de *Penicillium digitatum*, sob ação da levedura *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 e de diferentes concentrações da formulação a base da levedura + Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) 41
- Figura 14.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$) 43
- Figura 15.** Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR 44
- Figura 16.** Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR 44
- Figura 17.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$) 46
- Figura 18.** Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 10°C e 90% de UR 47
- Figura 19.** Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 47

15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 10°C e 90% de UR

Figura 20. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P <0,05) **49**

Figura 21. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 25°C ± 2 e 70% de UR **50**

Figura 22. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 25°C ± 2 e 70% de UR **50**

Figura 23. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P <0,05) **52**

Figura 24. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P <0,05) **54**

Figura 25. Frutos de lima ácida Tahiti inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 25°C ± 2 e 70% de UR **55**

Figura 26. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P <0,05) **56**

- Figura 27.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pêra e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$) **58**
- Figura 28.** Frutos de laranja Pêra inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR **59**
- Figura 29.** Frutos de laranja Pêra inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR **59**
- Figura 30.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pêra e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$) **60**
- Figura 31.** Frutos de laranja Pêra inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 10°C e 90% de UR **61**
- Figura 32.** Frutos de laranja Pêra inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 10°C e 90% de UR **61**
- Figura 33.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de tangor Murcott e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$) **63**
- Figura 34.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de tangor Murcott e a porcentagem de frutos **64**

doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$)

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja doce, seguido da China, União Europeia e Estados Unidos (Feitoza e Gasparotto, 2020). Considerando a importância econômica da citricultura para o país, este setor apresenta inúmeros problemas fitossanitários que limitam sua produção, dentre tais problemas, destacam-se as doenças de pós-colheita, como por exemplo a podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii* Ferraris) e o bolor verde (*Penicillium digitatum* Sacc) (Kupper et al., 2016).

A penetração do patógeno nos frutos se dá por ferimentos ocasionados durante o manuseio, transporte e armazenamento e, a sua colonização no sítio de infecção se dá pela liberação de enzimas que irão atuar na decomposição de substâncias mais complexas do fruto, tornando-as assimiláveis para o fungo, acarretando na podridão do mesmo (Spadaro e Droby, 2016; Bazioli et al., 2019). O fungicida Imazalil (IMZ) é o mais efetivo no controle do bolor verde, no entanto, o uso indiscriminado e excessivo pode deixar resíduo do produto nos frutos, além de contribuir para a proliferação de linhagens resistentes do patógeno ao princípio ativo (Ismail e Zhang, 2004), além de seu uso não ser eficaz para o controle de *G. citri-aurantii*, fungo este que não apresenta um produto registrado para uso no Brasil (Liu et al., 2009). Diante deste contexto, busca-se métodos alternativos que potencializam, sozinhos ou, em combinação, o controle de doenças na pós-colheita de citros (Droby et al., 2009; Moura et al., 2019).

A utilização de microrganismos no controle de patógenos de plantas tem sido considerada a mais natural e, eventualmente, a mais aceita na substituição, parcial ou total, ao uso do tratamento químico (Moretto et al., 2014). Dentre os agentes de biocontrole, as leveduras são potencialmente mais efetivas, pois são fenotipicamente mais adaptadas a esses nichos, além de serem hábeis na colonização e na competição por espaço e nutrientes (Filonow, 1998; Liu et al., 2013), apresentado resultados promissores no controle de doenças de pós-colheita (Spadaro e Droby, 2016).

Dentre as espécies de levedura, *Aureobasidium pullulans* De Bary (Arnaud), particularmente, o isolado ACBL-77, alvo de estudo deste trabalho,

mostrou ser efetivo no controle da podridão azeda (*G. citri-aurantii*) de citros (Ferraz et al., 2016; Klein e Kupper, 2018).

Segundo relatos de literatura, *A. pullulans* vem utilizando vários mecanismos de ação contra fitopatógenos, como a competição por espaço e nutrientes (Bencheqroun et al., 2007); produção de compostos antifúngicos voláteis, termoeestáveis e livres de células (Adikaram et al., 2002; Di Francesco et al., 2015); produção de enzimas hidrolíticas (Zhang et al., 2010; Ferraz et al., 2016; Moura et al., 2021); produção de proteases (Zhang et al., 2012); produção de toxina *killer* (Ferraz et al., 2016; Moura et al., 2021); produção de aureobasidina (AbA), que age como antibiótico (Liu et al., 2007); produção de sideróforos (Ma et al., 2012), além de atuar como agente indutor do mecanismo de defesa da planta (Ippolito et al., 2000).

O conhecimento dos mecanismos de ação do antagonista é fundamental durante o desenvolvimento de um bioproduto, permitindo a possibilidade de aumento de viabilidade, potencial de controle, registro para uso comercial e elaboração de protocolos adequados de aplicação do produto (Chanchaichaovivat et al., 2008; Di Francesco et al., 2016).

O processo para o desenvolvimento de uma formulação é complexo e devem ser observados aspectos como, o tipo e as características do propágulo utilizado como ingrediente ativo; as condições de fermentação; as características químicas e físicas dos inertes; a compatibilidade dos componentes da formulação ao microrganismo; a estabilidade do ingrediente ativo no armazenamento; o efeito no desempenho ou, atividade do formulado; entre outros. Tais conhecimentos são indispensáveis para o sucesso da formulação no campo (Morandi e Bettiol, 2009).

Muitos produtos à base de leveduras já são comercializados, como Shemer[®], produto a base de *Metschnikowia fructicola*, registrado em Israel e, comercialmente usado para doenças pós-colheita de batata-doce, uva, morango, pimenta e cenoura (Kurtzman e Droby, 2001; Droby et al., 2009). Na Bélgica foi registrado o bioproduto Nexy[®] (*Candida oleophila*) desenvolvido pela empresa Bionext, tem sido utilizado comercialmente para controle de doenças de pós-colheita em maçã, banana e citros (Zhang et al., 2020). Duas cepas de *A. pullulans* foram formuladas no mesmo bioproduto, Boni-Protect[®] registrado na Alemanha para controle de patógenos de pós-colheita, sendo eficiente,

principalmente, para *Monilia fructigena*, *P. expansum* e *B. cinerea*, em maçã (Wagner et al., 2013).

Dada a importância da cultura para o país e a necessidade de controle mais eficiente e ambientalmente aceito, este trabalho visou investigar uma formulação à base da levedura *A. pullulans* buscando desenvolver uma tecnologia de manejo de controle na fase de pós-colheita, a fim de encontrar uma alternativa para o controle da podridão azeda e do bolor verde em frutos cítricos. Para tal foram avaliados: (i) a viabilidade e a biomassa de *A. pullulans*-ACBL-77 em diferentes meios de cultivo; (ii) a produção de biofilme por *A. pullulans* nos diferentes meios de cultura; (iii) o efeito da molaridade do tampão fosfato de potássio e pH em células da levedura; (iv) o melhor agente de preservação da levedura no processo de formulação e a vida-de-prateleira do produto; (v) a atividade *killer* de *A. pullulans* ACBL-77 após formulação; (vi) a detecção e quantificação de sideróforos produzidos por *A. pullulans*-ACBL-77 na formulação; (vii) o efeito das formulações à base de *A. pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii* e de *Penicillium digitatum*; (viii) o efeito da formulação à base de *A. pullulans* na germinação de *G. citri-aurantii* e de *P. digitatum*; (ix) a eficiência da formulação à base de *A. pullulans* no controle *in vivo* da podridão azeda e do bolor verde em frutos cítricos e, finalmente, (x) verificar o efeito da aplicação do produto formulado quanto aos parâmetros de qualidade dos frutos cítricos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância da Citricultura

A laranja foi introduzida no Brasil pelos portugueses em meados de 1530, porém, a sua produção, em escala comercial, só ocorreu na década de 1930, uma vez que, o país apresentava condições de clima e de solo que propiciavam a boa adaptação da cultura, contribuindo dessa maneira para a sua expansão em todo território nacional (Neves et al., 2010).

O setor citrícola no Brasil teve seu mercado consolidado após as frentes frias que ocorreram na Flórida entre as décadas de 70 a 90, o que causou perdas significativas na produção norte americana, transformando o país em uma alternativa ao mercado norte-americano e europeu, facilitando a exportação não só da laranja, mas, também, do suco industrializado (Hasse, 1987; Alcântara, 2017).

Atualmente, a produção de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) é uma das mais importantes culturas agrícolas, sendo cultivada em 135 países, com destaque para o Brasil (USDA, 2020), que é considerado o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja (Kalaki e Neves, 2017; USDA, 2020).

O estado de São Paulo possui em sua extensão as três maiores indústrias de suco de laranja, tanto nacional e internacionalmente (Feitoza e Gasparotto, 2020), alcançando na safra de 2019 a produção de 13.650.000 de toneladas, o que corresponde a 79% da produção nacional (CONAB, 2020). Além da alta produtividade, a citricultura registrou crescimento na geração de empregos nos primeiros sete meses da safra 2020/2021, onde no período de julho de 2020 a janeiro de 2021, a atividade gerou um total de 19.560 admissões, sendo 17.050 no Estado de São Paulo, o que representa 11,29% do total de 151.067 vagas criadas pela Agricultura no Estado (CAGED, 2021).

Com relação a outras frutas cítricas, em 2018, o limão e a tangerina ocuparam juntos aproximadamente 106 mil hectares de plantio. Segundo Vidal (2019), o aumento da área de plantio está relacionado à demanda do mercado interno por estas frutas.

O Brasil é o sexto maior produtor de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), alcançando a marca de 1.026.638 toneladas no ano de 2020 (IBGE, 2020). O estado de São Paulo representa 33% da produtividade nacional, com destaques para as variedades cultivadas Ponkan e o Tangor Murcott, os quais compreendem 80% da área plantada (IBGE, 2020).

Dados de literatura relatam que em 2019, o Brasil ocupava a quinta posição na produção mundial de limas ácidas e limões, produzindo aproximadamente 1,5 milhão de toneladas, sendo o país o segundo maior produtor mundial de lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka), perdendo apenas para o México (FAO, 2019).

2.2. Doenças na pós-colheita de Citros

Considerando a importância econômica da citricultura para o país, este setor apresenta problemas com doenças que ocorrem na pós-colheita, que diminuem a quantidade e a qualidade dos frutos, prejudicando, ainda, os valores nutricionais e de mercado. As perdas podem chegar a 25% da produção total em países desenvolvidos e mais de 50% nos países em desenvolvimento (Nunes, 2012).

A colheita, transporte, armazenamento e o manuseio inadequado podem provocar ferimentos superficiais nos frutos, tornando-os susceptíveis à infecção por microrganismos patogênicos e, a sua colonização, no sítio de infecção, se dá pela liberação de enzimas que irão atuar na decomposição de substâncias mais complexas do fruto, tornando-as assimiláveis para os fitopatógenos, acarretando na podridão do mesmo (Spadaro e Droby, 2016; Bazioli et al., 2019).

As podridões constituem-se na principal causa de danos na fase de pós-colheita dos citros, dentre elas podemos citar a podridão azeda e o bolor verde.

A podridão azeda, causada por *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) R. Cif. & F. Cif. (Sinônimo *G. candidum* Link), fungo leveduriforme (Figura 1A) pertencente ao filo Ascomycota e a classe dos Saccharomycetes, ocorre em todos os países produtores de citros e afeta várias variedades cítricas (Ferraz et al., 2016; Klein e Kupper, 2018; Wang et al., 2020), sendo as variedades de tangerina, de um modo geral, as mais suscetíveis (Ferraz et al., 2016). Embora seja uma doença mais da pós-colheita, às vezes pode ocorrer na pré-colheita sob condições de altas temperaturas, após eventos chuvosos. É relatado que *G. citri-aurantii* é encontrado no solo (Yaghmour et al., 2012; Gusella et al., 2021) proveniente de infecções em frutas danificadas, representando uma importante fonte de inóculo no pomar (Yaghmour et al., 2012).

A infecção por *Geotrichum* se dá através de ferimentos no fruto e o desenvolvimento da doença se caracteriza pelo cheiro azedo da podridão. As lesões, inicialmente, se apresentam encharcadas, tornando-se com colorações amarelo-escuras e têm aparência levemente inchadas. O patógeno causa o desbotamento da cor e degrada o fruto em uma massa viscosa e aquosa (Brown, 2003; Liu et al., 2009) (Figura 1B).

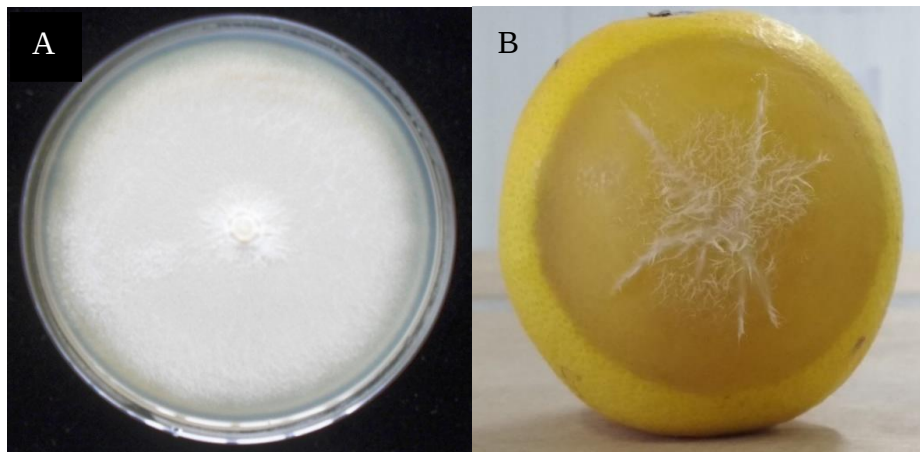


Figura 1. A – colônia do isolado *Geotrichum citri-aurantii*, após 7 dias de crescimento, em placa contendo meio BDA; B – Fruto de laranja Pêra com sintomas de podridão azeda, após sete dias de inoculação. Arquivo pessoal.

Em situações de campo (Figura 2), os autores Gusella et al (2021), relataram dois sintomas diferentes na extremidade do estilete de lima-ácida Tahiti, sob condições de pré-colheita: manchas encharcadas de água cobertas por uma camada de micélio de cor branca e lesões submersas/secas. Após o isolamento na extremidade do estilete, os resultados revelaram uma alta incidência de *G. citri-aurantii*.

Segundo Gusella et al (2021) a idade fisiológica, o tempo de armazenamento e o estado da água do fruto são os principais fatores que influenciam a suscetibilidade à podridão azeda.



Figura 2. Sintomas da podridão azeda em limão-galego na pré-colheita. Fonte: Gusella et al., 2021.

O bolor verde é causado por *Penicillium digitatum* Sacc., patógeno necrotrófico que infecta através de feridas na superfície dos frutos, afetando todas as variedades cítricas. O processo de desenvolvimento do fungo ocorre através da germinação de conídios, alongamento dos tubos germinativos, diferenciação do micélio em conidióforos e formação de fiálides, sendo que a produção de novos conídios se dá em até dois dias (Wang et al., 2015; Qian et al., 2019; Wang et al., 2019).

O fungo secreta primeiro uma série de pectinases para degradar a pectina na camada intercelular do fruto, com o intuito de produzir a fonte de carbono necessária para o seu crescimento, após a invasão dos ferimentos das frutas cítricas (Qian et al., 2019). No entanto, a falta de pectina no local leva ao amolecimento e decomposição dos tecidos. O patógeno secreta ainda uma grande quantidade de celulase para decompor a parede celular, após o amolecimento e relaxamento do tecido (48 h) pela pectinase, obtendo assim um grande número de nutrientes para sua rápida proliferação. Esses fatores levam à rápida expansão de uma podridão aquosa mole, registrando uma taxa de decomposição de 90% dos tecidos dentro do período de 36-48 horas. Após 96-120 h, a superfície dos frutos cítricos fica completamente deteriorada e as feridas formam colônias esverdeadas do fungo maduro no centro e micélio branco na borda externa (Figura 3) (Qian et al., 2019).



Figura 3. Desenvolvimento do sintoma do bolor verde em fruto cítrico por *P. digitatum* a 25 °C. C: Fruto inoculado com água. Fonte: Qian et al., 2019

Contudo, para uma invasão bem-sucedida nos tecidos do hospedeiro, o patógeno requer condições ótimas, como temperatura média de 25°C e umidade elevada para crescer e se reproduzir (Erasmus et al., 2015). A elevada incidência da doença pode ser atribuída à elevada produção de conídios de *Penicillium* na superfície dos frutos, facilmente dispersos pelo ar, sendo muito abundantes nos *packing houses*, principalmente, nos locais de viragem das caixas (Fischer et al, 2007).

2.3. Controle

A forma de disseminação dos patógenos é muito eficiente, podendo os conídios dos fitopatógenos serem levados facilmente pelo ar e água. O manuseio adequado na pós-colheita é essencial para evitar danos mecânicos durante a colheita, transporte e armazenamento, podendo contribuir efetivamente para reduzir a incidência das doenças nesta fase dos citros (Lv et al., 2015). A utilização de práticas sanitárias, com o objetivo de eliminar frutos infectados e outras fontes de inóculo em veículos, equipamentos, materiais de colheita e durante o transporte, é uma medida importante a ser adotada, inclusive, para a diminuição da quantidade de inóculos nas câmaras de armazenamento dos frutos (Cunha, 2013).

Os fungicidas químicos como o tiabendazol e imazalil são amplamente utilizados há muito tempo para minimizar as perdas ocorridas em frutos na pós-colheita (Zhu et al., 2006) contra o bolor verde (Droby et al., 2002; Ismail e Zhang, 2004), porém, não são eficazes contra a podridão azeda (Liu et al., 2009). Na maioria das instalações de embalagem comercial na Turquia, o fungicida guazatine é comumente aplicado nos drenchers, na fase de pós-colheita, para reduzir a incidência de *G. citri-aurantii* em frutas cítricas. No entanto, esse fungicida não é registrado em vários países (Kara e Soyulu, 2020), incluindo o Brasil.

Segundo Ismail e Zhang (2004), o uso indiscriminado e excessivo dos produtos químicos pode deixar resíduo nos frutos, além de contribuir para a proliferação de linhagens resistentes do patógeno ao princípio ativo utilizado,

sendo os primeiros casos de resistência relatados para tiabendazol em 1972; para Imazalil em 1987 e para guazatine em 1983 (Erasmus et al., 2015). Outro dilema se observa nos mercados importadores globalizados que vêm controlando os resíduos em produtos agrícolas e valorizando àqueles livres de agrotóxicos (Véras, 2014). Porém, as técnicas não químicas desenvolvidas, ainda, não alcançaram a eficácia dos fungicidas químicos, além de serem pouco elucidadas (Konstantinos et al., 2019).

2.4. Controle Biológico

O controle biológico é definido como a redução da soma de inóculo ou, de atividades determinantes da doença provocadas por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (Cook e Baker, 1983). A utilização de microrganismos antagonistas tem como princípio básico reduzir e/ou manter a população de um fitopatógeno abaixo dos níveis de dano econômico (Carmona-Hernandez et al., 2019). Os agentes de controle biológico – ACBs é o termo designado aos microrganismos antagônicos e podem ser uma alternativa promissora para substituir o controle químico (Zhimo et al., 2016; Dukare et al., 2018).

A busca por métodos alternativos de controle, direcionados e eficientes, requer uma compreensão dos mecanismos subjacentes, pelos quais os patógenos infectam frutas cítricas. Neste contexto, muitas pesquisas e programas de controle de doenças e pragas vêm sendo priorizados tanto na pré quanto na pós-colheita de frutas cítricas (Medina et al., 2017),

A utilização de microrganismos no biocontrole tem sido considerada a mais natural e, eventualmente, a mais aceita na substituição, parcial ou total, ao uso do tratamento químico (Moretto et al., 2014). Considerando-se um método alternativo que potencializa, sozinho ou em combinação com outras práticas agrícolas, o controle de doenças na pós-colheita de citros (Droby et al., 2009; Moura et al., 2019).

Vários mecanismos são propostos como estratégias de ação dos agentes de controle biológico contra patógenos de pós-colheita, os quais são

empregados, em um sistema de interação hospedeiro-patógeno-antagonista, dentre eles estão: competição por espaço e nutrientes; competição pelo elemento ferro; produção de compostos antifúngicos e compostos voláteis; parasitismo; produção de enzimas hidrolíticas; produção de toxina *killer* e indução de resistência nas plantas (Ferraz et al., 2016; Spadaro e Droby, 2016; Cunha et al., 2018; Cunha et al., 2020).

Dentre os agentes de biocontrole, as leveduras são potencialmente mais efetivas, uma vez que, são hábeis na colonização de fermentos e na competição por espaço e nutrientes, possuem baixa mico-toxicidade, são exclusivamente adaptadas ao microambiente de frutas (alta concentração de açúcar, alta pressão osmótica e baixo pH), além de serem tolerantes aos fungicidas frequentemente utilizados na pós-colheita (Filonow, 1998; Liu et al., 2013; Spadaro e Droby, 2016; Moura et al., 2019).

A levedura *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Dothideales, Família Dothioraceae e ao Gênero *Aureobasidium* é uma espécie polimórfica altamente adaptável, com presença onipresente em muitos habitats diversos. Essa levedura possui grande plasticidade fenotípica e, dependendo do ambiente, pode alterar o crescimento para a forma micelial, bem como a cor e morfologia da colônia (Zajc et al., 2020). Tem sido descrita na literatura como um agente de controle biológico contra vários patógenos da pós-colheita de frutas, dentre esses, *Botrytis cinerea*, *P. expansum*, *Monilinia* spp., e *G. citri-aurantii*, em maçã, cereja, pêssego e laranja (Bencheqroun et al., 2007; Ippolito et al., 2000; Ferraz et al., 2016; Di Francesco et al., 2017, Klein e Kupper, 2018).

O isolado *A. pullulans*-ACBL-77, em estudos anteriores, mostrou alta eficiência no controle da podridão azeda em frutos de laranja Pêra, tendo como modo de ação a competição por espaço e nutrientes, a atividade *killer*, a produção de enzimas hidrolíticas, a produção de biofilme e sideróforos (Ferraz et al., 2016; Klein e Kupper, 2018; de Castro, 2020; Moura et al., 2021). Compreender esses mecanismos é fundamental quando se busca a confecção de um bioproduto à base do antagonista, ou seja, é um pré-requisito para se obter isolados antagônicos mais efetivos, além de contribuir para a elaboração de protocolos mais adequados para aplicação e para o registro comercial do

produto (Chanchaichaovivat et al., 2008; Di Francesco et al., 2016; Ferraz et al., 2016).

2.5. Desenvolvimento de bioprodutos

A utilização de microrganismos antagônicos no desenvolvimento de formulações e o aumento no número de pesquisas podem ajudar a disseminar o uso de agentes de controle biológico, como alternativa real aos fungicidas sintéticos.

O desenvolvimento de uma formulação é complexo e, devem ser observados aspectos como, a biologia específica de cada microrganismo, a capacidade do isolado de sobreviver durante o processo de formulação e sua estabilização (Abadias et al., 2003) e o aumento do número de células e sua eficácia através da adição de alguns revestimentos e adjuvantes (Carbó et al., 2017). As formulações podem ser confeccionadas através de diferentes métodos como sólidas ou líquidas (Aguirre-Güitrón et al., 2019).

Em relação à temperatura de armazenamento, formulações, em estado desidratado ou liofilizado, podem ser armazenadas em temperaturas ambiente, enquanto que, as formulações líquidas precisam ser mantidas sob refrigeração (Droby et al., 2016). Os produtos de formulação sólida são obtidos a partir de processos de secagem, dentre eles a secagem por spray, considerada a mais viável pelo baixo custo, possibilidade de armazenamento e produção em grande quantidade, além da facilidade de transporte (Aguirre-Güitrón et al., 2019). A formulação líquida é a maneira mais simples de se estabilizar a viabilidade das células microbianas. Normalmente, para a conservação, células do microrganismo são adicionados em solução à base de água ou óleo, com diferentes protetores e aditivos e, geralmente, são armazenadas em baixas temperaturas. Para Melin et al. (2007), a baixa sobrevivência das células de antagonistas em temperaturas elevadas resulta em desvantagens na confecção de uma formulação líquida.

O processo de formulação pode envolver várias etapas, como secagem, adição de materiais volumosos (ingredientes inertes), adesivos, emulsificantes e

adjuvantes. Todas essas ações podem afetar adversamente as propriedades do agente de controle biológico selecionado (Droby et al., 2009). Portanto, um processo de formulação deve atingir, principalmente, quatro objetivos básicos: i) estabilizar o organismo durante a produção, distribuição e armazenamento; ii) auxiliar no manuseio e aplicação do produto; iii) proteger o agente de fatores ambientais nocivos e, finalmente iv) aumentar a atividade do organismo no local de uso (Carbó et al., 2017).

A manutenção da viabilidade celular é fundamental para as formulações comerciais de agentes de controle biológico e sua eficácia depende do grau de sucesso da formulação, por isso, é necessário avaliar cuidadosamente todos os detalhes do processo de formulação para obter altas taxas de sobrevivência dos microrganismos e para alcançar uma eficácia igual ou superior a células frescas (Carbó et al., 2017). A última fase do processo de desenvolvimento de um bioproduto comercial são os testes *in vivo* usando métodos de aplicação específicos. A formulação deve manter sua pureza de espécie (não está contaminada) e as células microbianas devem reter sua estabilidade genética, viabilidade celular, atributos como colonizadores na superfície dos frutos, entre outros aspectos de seu mecanismo de ação (Droby et al., 2009).

De acordo com Zhang et al. (2020) a comercialização de uma levedura antagonista é um processo longo e caro que requer testes extensivos de toxicologia e eficácia de biocontrole, sob condições comerciais. Verificou-se, nas últimas décadas, algumas leveduras antagônicas que foram desenvolvidas e comercializadas (Tabela 1).

Tabela 1. Produtos comerciais à base de levedura antagônicos desenvolvidos para o manejo de patógenos pós-colheita

Produto	Levedura antagonista	Fruto	Patógenos Alvo	Empresa	Em uso
Aspire	<i>Candida oleophila</i>	Fruta de caroço, maçã, citros, morango	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Monilinia</i>	Ecogen, USA	Não

Blossom Protect	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Maçã	<i>Penicillium, Botrytis, Monilinia</i>	Bio-ferm, Austria	Sim
Botector	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva, morango, tomate	<i>Botrytis cinerea</i>	Bio-ferm, Austria	Sim
Candifruit	<i>Candida sake</i>	Maçã	<i>Penicillium, Botrytis, Rhizopus</i>	IRTA/Sipcam-Inagra, Spain	Não
Nexy	<i>Candida oleophila</i>	Maçã, banana, citros	<i>Botrytis, Penicillium</i>	Lesaffre, Belgium	Sim
Noli	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Morango, mirtilo, uva, fruta de caroço	<i>Botrytis, Monilinia</i>	Koppert, The Netherlands	Sim
Remeo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva	<i>Botrytis, Erysiphe, Plasmopara</i>	BASF/Agrauxine, France	Sim
Shemer	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Maçã, morango, uva, fruta de caroço	<i>Botrytis, Penicillium, Rhizopus, Aspergillus</i>	Bayer/Koppert, The Netherlands	Sim
YieldPlus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Maça, citros	<i>Botrytis, Penicillium, Mucor</i>	Lallem, South Africa	Não

Fonte: Zhang et al., 2020.

Segundo dados publicados pelo MAPA (2020), 95 produtos de baixo impacto foram registrados no Brasil, representado o maior número de registro em um mesmo ano, superando o ano de 2018 com 52 produtos registrados. Atualmente, são encontrados 411 produtos de baixo impacto disponível para os produtores, os quais possuem ingredientes ativos biológicos, microbiológicos, semioquímicos, bioquímicos, extratos vegetais e reguladores de crescimento, podendo ser autorizados em vários casos na agricultura orgânica. Esses produtos são importantes para agricultura, não apenas pelo baixo impacto

toxicológico e ambiental, mas também, por beneficiar as culturas que apresentam suporte fitossanitário insuficiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

O isolado da levedura *Aureobasidium pullulans*-ACBL-77, a levedura sensível ao fator *killer* (*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006) e os fitopatógenos *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum*, utilizados neste estudo, registrado no SISGEN A03215C, pertencem à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP.

3.2. Composição do meio de cultura para cultivo da levedura

Foram avaliados os seguintes meios de produção: **BD** (Batata-200 g.L⁻¹, dextrose -20,0g.L⁻¹); **BD + sulfato de amônio 0,1%** (Batata -200 g.L⁻¹, dextrose -20,0g.L⁻¹, (NH₄)₂HPO₄ -0,1 g.L⁻¹) **YEPD** (Peptona -20,0g.L⁻¹, extrato de levedura-10,0g.L⁻¹, dextrose -20,0g.L⁻¹); **Peptona** (dextrose-30,0g.L⁻¹, bactopectona-3,5g.L⁻¹, KH₂PO₄ -2,0g.L⁻¹, MgSO₄·7H₂O -3,0g.L⁻¹, CaCl₂·2H₂O-0,13g.L⁻¹); **Mineral** (dextrose-34,4g.L⁻¹, (NH₄)₂HPO₄ -7,4g.L⁻¹, KH₂PO₄-2,787g.L⁻¹, MgSO₄·7H₂O -2,05g.L⁻¹, NaCl-0,1g.L⁻¹, FeSO₄·7H₂O - 0,009g.L⁻¹, CaCl₂ - 0,055g.L⁻¹, CuSO₄·7H₂O - 0,01g.L⁻¹ e MnSO₄·H₂O - 0,0076g.L⁻¹); **Fécula de batata** (Fécula de batata solúvel -4,0g.L⁻¹, dextrose -20,0g.L⁻¹ e extrato de levedura -5g.L⁻¹); **Vitamina com sais minerais** (5,0mL.L⁻¹ solução concentrada de sais minerais (0,32g.L⁻¹ MnCl₂·4H₂O + 0,49g.L⁻¹ CuSO₄·5H₂O + 5,75g.L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O + 0,48g.L⁻¹ CoCl₂·6H₂O + 0,49g.L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O + 15,0g.L⁻¹

EDTA + 2,94g.L⁻¹ CaCl₂·2H₂O + 2,78g.L⁻¹ FeSO₄·7H₂O), 30g de extrato de levedura, 30g peptona de soja, 0,37g Na₂SO₄, 4,5g K₂SO₄, 6g KH₂PO₄, 3g MgSO₄·7H₂O, 110g glicose e 5 mL.L⁻¹ solução concentrada de vitaminas (1,0g.L⁻¹ tiamina HCl + 1,0g.L⁻¹ piroxidina HCl + 1,0g.L⁻¹ ácido nicotínico + 1,0g.L⁻¹ D-biotina, 1,0g.L⁻¹ pantotenato de cálcio + 0,2g.L⁻¹ ácido p-aminobenzóico + 5,0g.L⁻¹ inositol). Glicose e vitaminas foram esterilizadas separadamente. Todos os meios avaliados foram ajustados, com NaOH 1M, até atingir o mesmo pH de 6,9.

3.3. Determinação da viabilidade e biomassa seca de células de *Aureobasidium pullulans*

Foram avaliados sete meios de cultura (item 3.2) com a finalidade de identificar qual deles proporcionaria melhores condições de viabilidade e biomassa de células de *A. pullulans*-ACBL-77, seguindo as metodologias descritas por Mounir et al. (2007) e Patiño-Vera et al. (2005).

Colônias de *A. pullulans* foram repicadas para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e, as culturas foram incubadas a 27°C, durante 48 horas. As concentrações de células da levedura foram ajustadas a 1 x 10⁷ células/ml, com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Alíquotas de 1 ml foram adicionadas em diferentes meios de produção. As culturas foram incubadas a 27°C, sob agitação constante a 150 rpm, por 48 horas para determinação da viabilidade e determinação da biomassa seca.

Para avaliação da viabilidade das células da levedura foi realizado o plaqueamento de diluições seriadas. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram transferidas para placa de Petri contendo meio BDA e espalhadas com ajuda de uma alça de Drigalski, em seguida, as culturas foram incubadas em estufa para BOD, com fotoperíodo de 12/12h, a 27°C por 48 horas. Após o período de incubação, determinou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml), sendo expressa em log₁₀. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por cinco repetições.

Para a determinação da biomassa seca, as culturas, dependendo de cada tratamento, foram transferidas para tubos Falcon e submetidas à centrifugação

(8.000xg por 10 minutos, a 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi seca estufa a 60°C, até a obtenção de massa constante, através da avaliação de pesagem diária (Simmons et al., 1995). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos e três repetições.

3.4. Produção de biofilme por *Aureobasidium pullulans*

O efeito dos diferentes meios líquidos para a produção de biofilme pela levedura foi determinado utilizando a metodologia de cristal violeta (CV) (O'toole e Kolter, 1998).

Para a obtenção do inóculo inicial da levedura, 1 ml de suspensão de *A. pullulans*, na concentração de 1×10^7 células/ml, foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 99 ml dos diferentes meios de cultivo. Em seguida, as culturas foram incubadas a 27°C, sob agitação constante a 150 rpm, por 48 horas.

Após o período de incubação, alíquotas de 100 µl do inóculo inicial foram transferidas para tubos Falcon de 50 ml, contendo 10 ml de cada meio de cultivo a ser avaliado. Como controle (branco) foi utilizado os meios sem a levedura. As culturas foram incubadas nas mesmas condições descritas para o preparo do inóculo inicial. Para a quantificação do biofilme, os meios foram removidos suavemente, os tubos foram lavados com uma solução salina (0,9% de NaCl) e corados com uma solução de 0,1% de CV por 30 minutos. O CV não ligado foi removido e os frascos foram lavados suavemente com água destilada, repetindo o processo três vezes. A solubilização do CV foi realizada através da adição de 10 ml de álcool 70% e submetido a leitura de sua absorbância a 590nm (UV / Vis Spectrometer Lambda Bio; Perkin Elmer). Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com cada tratamento contendo três repetições.

3.5. Efeito da molaridade do tampão fosfato de sódio e pH em células de *Aureobasidium pullulans*

Primeiramente foi avaliado o efeito da molaridade do tampão fosfato de potássio na viabilidade da célula em dois diferentes meios de cultura.

Uma alíquota de 1 ml de suspensão de células da levedura (1×10^7 células/ml) foi transferida para frascos contendo meio líquido YEPD ou meio concentrado de sais minerais com vitaminas tamponados com fosfato de potássio nas concentrações de 0,2; 0,1; 0,05 e 0,02M. As culturas foram incubadas a 27°C, sob agitação constante a 150 rpm por 48h. A avaliação foi realizada através do plaqueamento de diluições seriadas, transferindo-se 100 µL de cada diluição, referente a cada tratamento, para placas de Petri contendo meio BDA e, espalhadas com ajuda de uma alça de Drigalski. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, com fotoperíodo de 12/12h, a 27°C por 48 horas. Após o período fez-se a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/ml).

A partir da escolha do meio em função da molaridade, fez-se o ensaio para avaliar o efeito do pH sobre *A. pullulans*. Para tal, foi utilizado o meio líquido YEDP tamponado com fosfato de potássio (0,02M) e ajustado com NaOH ou HCl até atingir os diferentes pHs: 4; 4,6; 5,0; 6,5; 6,9; 8,0 e 8,5. Uma alíquota de 1 ml de suspensão de *A. pullulans* (1×10^7 células/ml) foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 99 ml do meio tamponado, de acordo com os diferentes pHs. Em seguida, as culturas foram incubadas a 27°C, sob agitação constante a 150 rpm, por 48 horas. A avaliação seguiu o mesmo procedimento do ensaio da molaridade.

Para ambos os ensaios, utilizou-se de um delineamento inteiramente casualizado, contendo 5 repetições por tratamento.

3.6. Formulações e vida de prateleira

Os produtos foram compostos de meio líquido YEPD tamponado com fosfato de potássio (K_2HPO_4) a 0,02M e ajustados a pH 6,9, com adição de: glicerol em diferentes concentrações (20, 40 e 60% v/v), como agente de preservação; goma xantana (3, 4 e 5g/L), como agente intensificador da viscosidade e levedura (1×10^8 células/ml) a 10%.

Inicialmente, os frascos de plástico contendo os diferentes componentes e concentrações foram esterilizadas a 121°C, durante 20 minutos e, após o resfriamento dos produtos, foi acrescentada a suspensão da levedura. Os formulados foram armazenados em duas temperaturas diferentes a 4°C e 25±2°C para avaliação mensal da vida-de-prateleira.

Para avaliação da sobrevivência de *A. pullulans*, alíquotas de 1 ml de cada formulação foram diluídas em solução salina (0,9g de NaCl/L de água destilada) estéril e, submetidas às diluições seriadas (até 10^{-6}). Cem microlitros de cada diluição foram espalhados em placas de Petri contendo BDA. As culturas foram incubadas em estufa para BOD, com fotoperíodo 12/12h a 27°C por 48 horas e, após foi determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

3.7. Manutenção da atividade *killer* de *Aureobasidium pullulans*-ACBL-77 nas formulações

Esse ensaio teve por objetivo verificar se *A. pullulans*-ACBL-77 manteria a sua atividade *killer* nas formulações durante a vida de prateleira.

O fator *killer* foi testado contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 (sensível ao fator *killer*), os fitopatógenos *G. citri-aurantii* e *P. digitatum* seguindo a metodologia descrita por Ferraz et al. (2016). Para tal, uma alíquota de 200 µL de suspensão (1×10^6 células ou conídios/ml) de cada microrganismo foi transferida para meio YEPD-azul de metileno (Extrato de levedura 1%; Glicose 2%; Peptona 2%, Ágar 2% e Azul de metileno 0,002%,

tamponado com citrato-fosfato 0,1 M pH 4,6) contido em placas de Petri, pela técnica de espalhamento. Em seguida, células da levedura provenientes de três e seis meses de vida-de-prateleira (item 3.6) foram transferidas, simultaneamente, para as placas contendo cada um dos microrganismos e, incubadas em estufa para BOD, com fotoperíodo 12/12h a 27°C por 48 horas. A atividade *killer* foi constatada pela formação de uma zona clara que representa a ausência ou inibição de crescimento do microrganismo sensível e linha azul que caracteriza a morte celular do mesmo (Ferraz et al., 2016).

3.8. Detecção e quantificação de sideróforos de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 na formulação

Este ensaio teve por objetivo detectar e quantificar a produção de sideróforos de *A. pullulans*-ACBL-77, durante a vida-de-prateleira dos formulados.

Células de levedura, provenientes de unidades formadoras de colônias, correspondentes a três e seis meses de tempo de vida-de-prateleira (item 3.6) foram cultivadas em 5 ml de meio contendo 2,5% de sacarose; 0,4% (NH₄)₂SO₄; 0,3% K₂HPO₄; 0,1% ácido cítrico; 0,008% MgSO₄; 0,0002% ZnSO₄ a 27°C e 200 rpm por 24 horas. Esse inóculo foi transferido para um frasco contendo 50 ml do mesmo meio e incubado nas mesmas condições por 72 horas. Posteriormente, a cultura foi submetida à centrifugação a 9.000xg e a 4°C, durante cinco minutos (Wang et al., 2009).

O sobrenadante obtido foi usado para a determinação da quantificação de sideróforos, conforme metodologia descrita por (Calvente et al., 2001). A quantidade de sideróforos no sobrenadante foi avaliada quantitativamente a 440nm pelo uso de espectrofotômetro e o mesilato de deferoxamina (Sigma-Aldrich) serviu como padrão. A quantidade de sideróforos no sobrenadante foi extrapolada a partir da curva padrão de mesilato de deferoxamina.

3.9. Efeito das formulações à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii* e de *Penicillium digitatum*

Para estudar o efeito antagônico da formulação no crescimento micelial dos fitopatógenos, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri (Dennis e Webster, 1971). Discos (0,7 cm) de culturas ativas de cada patógeno foram colocados em placas de Petri contendo BDA a uma distância de 03 cm de uma alçada (10 µl) de cada produto formulado. As testemunhas foram representadas pelos fitopatógenos sem a presença dos produtos. As culturas foram incubadas em estufa para BOD com fotoperíodo de 12/12 horas, a 27°C, por 7 dias. A avaliação foi feita pela medição do diâmetro médio da colônia do fitopatógeno, em dois sentidos perpendiculares. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (9 formulados x 2 temperaturas de armazenamento), com cinco repetições.

3.10. Efeito da formulação, à base de *Aureobasidium pullulans*, na germinação dos fitopatógenos

O efeito da formulação líquida, contendo Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L) + 10% de células da levedura, sobre a germinação de conídios dos fitopatógenos *G. citri-aurantii* e *P. digitatum* foi avaliado pela técnica ágar-água em lâminas de microscopia. Para tal, foram testadas diferentes concentrações da formulação (0; 5; 10; 15 e 20%). Alíquotas de 10 µl, de cada concentração do formulado, e 10 µl da suspensão de conídios de cada patógeno (1×10^4 conídios. mL⁻¹) foram depositadas, simultaneamente, em áreas demarcadas das lâminas, previamente preparadas com ágar-água. O tratamento controle, correspondente a cada patógeno, foi representado pela adição de água destilada estéril no lugar do formulado e um tratamento contendo apenas a levedura. As lâminas foram colocadas em caixas Gerbox contendo algodão embebido em água destilada estéril para manutenção da umidade.

As culturas foram incubadas em estufa para BOD, fotoperíodo de 12/12h, a 27°C, durante 16 horas (*G. citri-aurantii*) e 18 horas (*P. digitatum*). Após o período de incubação, 100 conídios, do fitopatógeno, foram selecionados ao acaso e observados ao microscópio óptico, calculando-se a porcentagem de conídios germinados e não germinados. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e seis repetições.

3.11. Controle da podridão azeda e do bolor verde em frutos cítricos utilizando a formulação à base de *Aureobasidium pullulans*

Os frutos de lima ácida Tahiti, laranja Pêra e tangor Murcott foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio (2%) por dois minutos e, feridos em dois pontos equidistantes, na região equatorial dos frutos, com agulhas esterilizadas a uma profundidade de três milímetros. Os frutos foram inoculados na região do ferimento com 20 µl de uma suspensão (1×10^3 conídios/ml) de cada um dos fitopatógenos, 24h antes (tratamento preventivo) e 24h após (tratamento curativo) a realização dos tratamentos. Os tratamentos corresponderam às diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20%) do formulado (Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L) + 10% de células da levedura). Foram utilizados como tratamentos controle: 1) frutos tratados com água; 2) frutos tratados com a suspensão da célula *A. pullulans* (1×10^7 células/ml) e, 3) frutos tratados com o fungicida Imazalil (2ml/L), para o controle do bolor verde.

Os frutos foram armazenados em caixas de propileno com tampa (40x30x15 cm), em duas condições: ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 2$ e com 70% de UR) e câmara fria (10°C e 90% de UR).

A severidade da doença foi avaliada diariamente, dois dias após a inoculação do patógeno, por meio da medição do diâmetro das lesões formadas. As medidas obtidas foram usadas para determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a equação proposta por Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum [(y_i + y_{i+1}) / 2 \times (t_{i+1} - t_i)]$$

onde, y_i é o diâmetro de uma lesão no tempo t_i , em dias, e y_{i+1} é o diâmetro da lesão no tempo $t_i + 1$.

A incidência foi determinada pela porcentagem de frutos doentes. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 6 e 7 tratamentos para podridão azeda e bolor verde, respectivamente e três repetições, sendo 20 frutos por repetição.

3.12. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *Aureobasidium pullulans* nos parâmetros de qualidade dos frutos cítricos

Este ensaio teve por objetivo verificar o efeito da aplicação do produto formulado à base da levedura nos parâmetros de qualidade dos frutos de lima ácida Tahiti, laranja Pêra e tangor Murcott. Para tal, os frutos foram imersos nas diferentes concentrações (5; 10; 15 e 20%) do bioproduto por dois minutos tendo como o controle negativo os frutos tratados apenas com água. Após os tratamentos, os frutos foram subdivididos em grupos de cinco repetições, embalados em caixas de prolipopileno com tampa, armazenados a $10^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ e $90 \pm 3\%$ UR, por um período de 04 semanas.

As avaliações dos parâmetros de qualidade deram início logo após a aplicação do formulado e seguiram, semanalmente, até o final do experimento. Foram retiradas amostras de cinco frutos em triplicatas para cada parâmetro a ser avaliado, em um delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas as análises físicoquímicas, como rendimento de suco, acidez titulável (AT), “ratio” e °Brix, utilizando como valores de referência, os descritos por Pio et al. (2005).

3.12.1. Rendimento de suco

Cada repetição foi pesada para a obtenção do valor da massa total em quilograma e, em seguida, os frutos foram processados na extratora, para a coleta da massa de suco. A porcentagem de suco foi determinada através do cálculo da fórmula: % rendimento de suco = $(MS / MF) \times 100$, onde MS = massa do suco e MF = massa dos frutos.

Tabela 2. Valores de referência da porcentagem de suco dos cultivares (Pio et al., 2005).

Cultivares	Média da % de suco
Laranjas	40-60%
Tangerinas e tangor	35-55%
Limões e limas ácidas	35-55%
Pomelo	35-45%

3.12.2. Teor de sólidos solúveis totais (SS)

O teor de sólidos solúveis foi determinado em refratômetro digital, com os resultados expressos em °Brix. Os valores de leitura de °Brix corresponderam diretamente à porcentagem de sólidos solúveis do suco cítrico, com base em massa (Reed et al., 1986).

Tabela 3. Valores de referência de sólido solúveis totais (°Brix) suco dos cultivares (Pio et al., 2005).

Cultivares	Média de ° Brix
Laranjas com baixa acidez, laranjas, tangerinas e tangor	8-16 °Brix
Limões e limas ácidas	6-12 °Brix
Pomelo	8-10 °Brix

3.12.3. Acidez total titulável (ATT)

Em um Becker graduado (250 ml) foram adicionados 100-150 ml de água destilada e pipetados 25 ml da amostra de suco. Sendo adicionados ao Becker, cerca de 5 gotas do indicador fenolftaleína em solução alcoólica 1%. A solução foi misturada através de um agitador. Posteriormente, o eletrodo do pHmetro foi mergulhado na solução padronizada, contida no Becker, e uma solução de NaOH 0,3125 M foi gotejada, sob agitação constante, com monitoramento do pH até 8,2, utilizando titulador automático. Os resultados foram expressos em % (g de ácido cítrico/100 ml da amostra) (Reed et al., 1986).

Tabela 4. Valores de referência da porcentagem de acidez titulável dos cultivares (Pio et al., 2005).

Cultivares	Média da % de acidez titulável
Laranjas com baixa acidez	0,1-0,5%
Laranjas, Tangerinas e tangor	0,5-2,0%
Limões e limas ácidas	4,0-7,0%
Pomelo	0,5-1,5%

3.12.4. *Ratio*

Os valores de *ratio* foram calculados pela divisão do teor de sólidos solúveis totais (SST) pela acidez total titulável (ATT), informando o grau de maturação e qualidade do suco.

3.13. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o software estatístico AgroEstat e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da viabilidade e biomassa seca de células de *Aureobasidium pullulans*

Os resultados apresentados na Figura 4 mostraram que os meios líquidos sem adição de tampão: YEPD, Vitamina com sais minerais e meio Mineral proporcionaram maior produção de células viáveis pela levedura ($1,1 \times 10^6$ UFC/ml) após 48 horas de cultivo.

No entanto, o melhor meio para a produção de biomassa foi o meio YEPD, que proporcionou, estatisticamente, maior rendimento (0,45 g/ml), não diferindo do meio com vitamina (0,40g/ml) (Tabela 5).

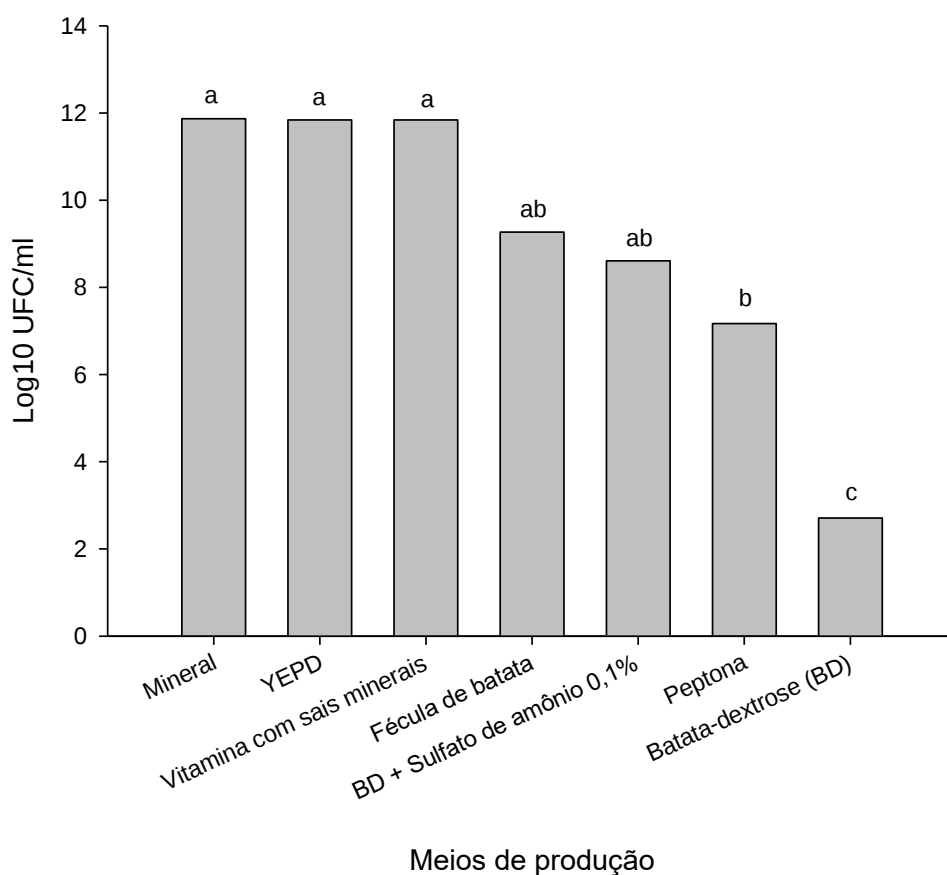


Figura 4. Produção de células viáveis de *Aureobasidium pullulans* (ACBL-77) após cultivo em diferentes meios.

Tabela 5. Produção média de biomassa de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, após cultivo em diferentes meios de cultura.

Tratamentos	Biomassa (g/ml)
YEPD	0,45 a ⁽¹⁾
Vitamina com sais minerais	0,40 ab
BD	0,30 abc
Fécula de Batata	0,28 abc
Mineral	0,28 abc
Peptona	0,19 bc
BD com sulfato de amônio	0,14 c

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Desvio Padrão = 0,062 CV (%)=7,02.

4.2. Produção de biofilme por *Aureobasidium pullulans*

Ao avaliar a formação de biofilme de *A. Pullulans* nos diferentes meios líquidos (sem adição de tampão) testados verifica-se que, os meios de Mineral, BD, YEPD e Vitamina com sais minerais proporcionaram aumento, significativo, na formação de biofilme, quando comparado os demais meios de cultivo da levedura (Figura 5).

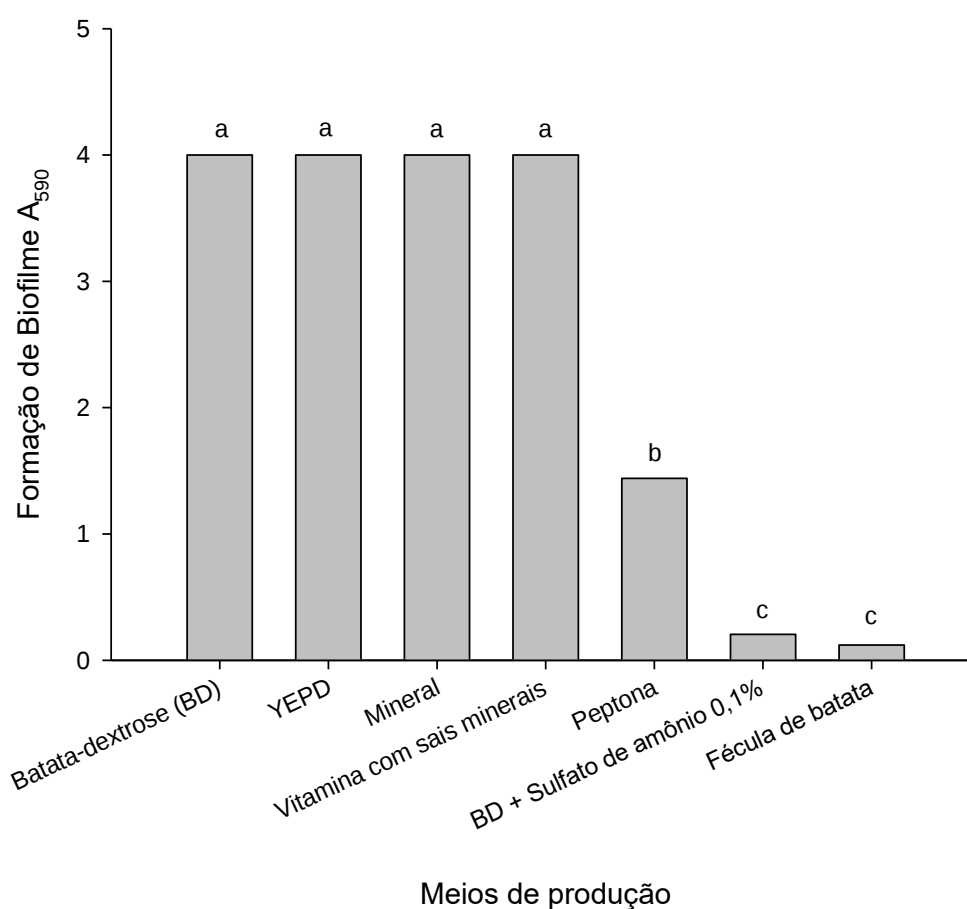


Figura 5. Formação de biofilme por *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, cultivada após 48 horas em diferentes meios de cultura. Os dados representam a média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

4.3. Efeito da molaridade do tampão fosfato de potássio e do pH na produção de células de *Aureobasidium pullulans*

Os meios a base de YEPD sem tampão ou, tamponado com K_2HPO_4 a 0,02 ou 0,05M, para cultivo da levedura, não diferiram, estatisticamente, quanto à produção de células, com uma produção em torno de $5,5$ a $5,7 \times 10^6$ células/ml (Figura 6). O meio de vitamina com sais minerais sem tampão proporcionou uma concentração de células menor ($3,8 \times 10^4$ células/ml) e, a adição do tampão prejudicou, ainda mais, a produção de células viáveis pela levedura.

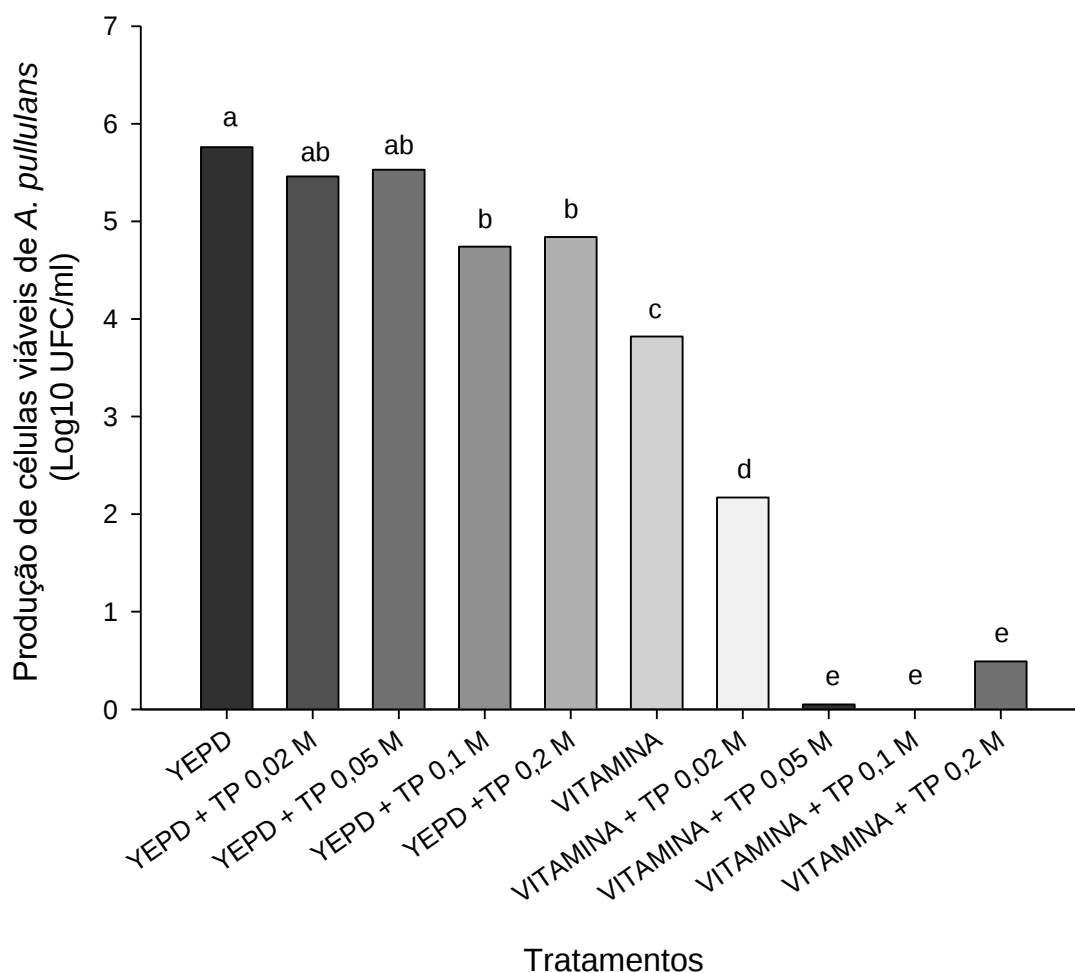


Figura 6. Efeito da molaridade do tampão fosfato de potássio adicionado aos meios de cultura YEPD e Vitamina com sais minerais no crescimento de *A. pullulans* ACBL-77. Dados transformados em log (10+1). TP= tampão fosfato de sódio.

O ajuste do pH do meio YEPD tamponado com K_2HPO_4 (0,02M) para 6,9 favoreceu a produção de células da levedura. Os ajustes de pH para 6,5 e 8,0 no mesmo meio, não diferiram entre si e, nem do meio com o pH 6,9 (Figura 7).

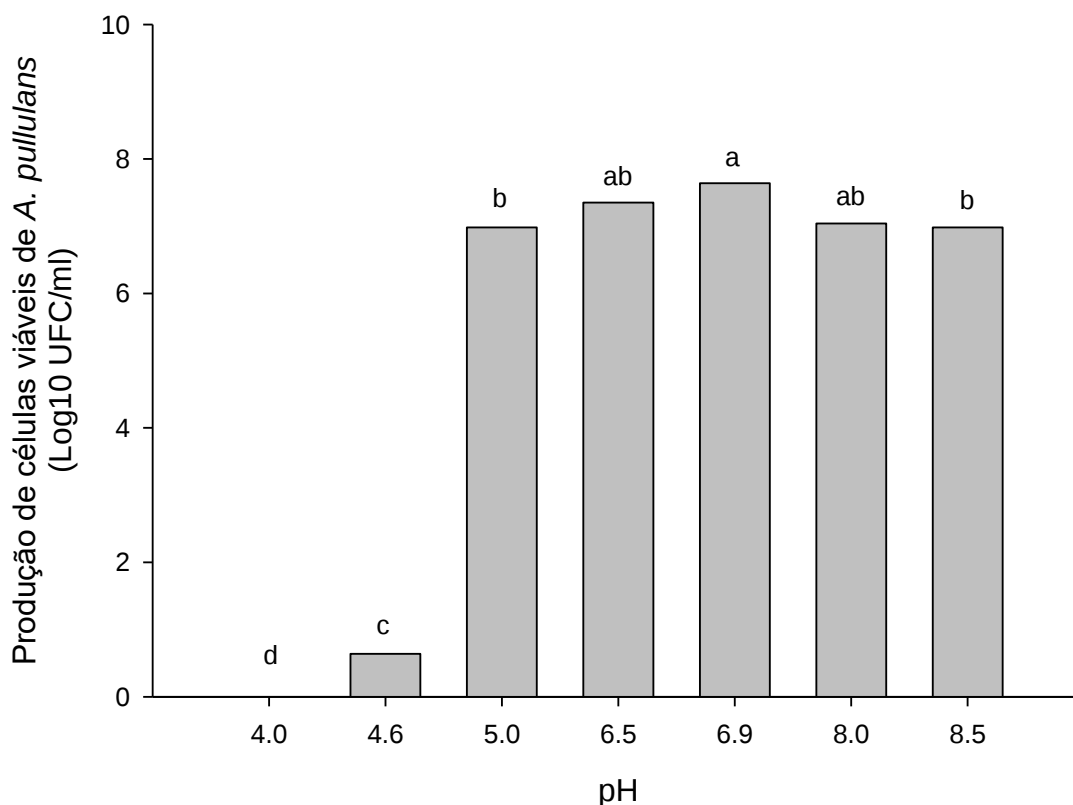


Figura 7. Efeito do pH na viabilidade de células de *A. pullulans*-ACBL-77, cultivada em meio líquido YEPD.

4.4. Formulações e vida de prateleira

Os resultados apresentados na Figura 8 mostram que a formulação contendo Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L) apresentou um aumento de células (10^8 UFC/ml) após dois meses de armazenamento a 4°C e manteve essa concentração até o quarto mês. No quinto mês de armazenamento, a concentração de células reduziu para 10^7 e mantendo até o sexto mês. A mesma formulação a 25°C não manteve a viabilidade das células da levedura, havendo morte das mesmas no decorrer do segundo mês de armazenamento do produto.

No entanto, a formulação contendo Glicerol (20%) + Goma Xantana (3g/L), armazenada a 4°C, manteve a viabilidade das células de levedura até o quarto mês de armazenamento.

As formulações, contendo Glicerol (40%) nas diferentes concentrações de Goma Xantana, quando armazenadas a 25°C, não favoreceram a sobrevivência da levedura. Porém, quando os formulados à base de Glicerol (40%) acrescido de Goma Xantana a 3g/L ou a 5g/L foram armazenados a 4°C, os produtos mantiveram a concentração de células em 10^5 e 10^6 , respectivamente, por apenas três meses de armazenamento. O formulado Glicerol (40%) + Goma Xantana (4g/L) manteve a concentração (10^6 células/ml) da levedura durante dois meses de armazenamento, porém, no período de 6 meses a formulação caiu para 10^4 células/ml.

As formulações a base de Glicerol (60%), independentemente da quantidade de Goma Xantana e da temperatura de armazenamento, não favoreceram a sobrevivência da levedura.

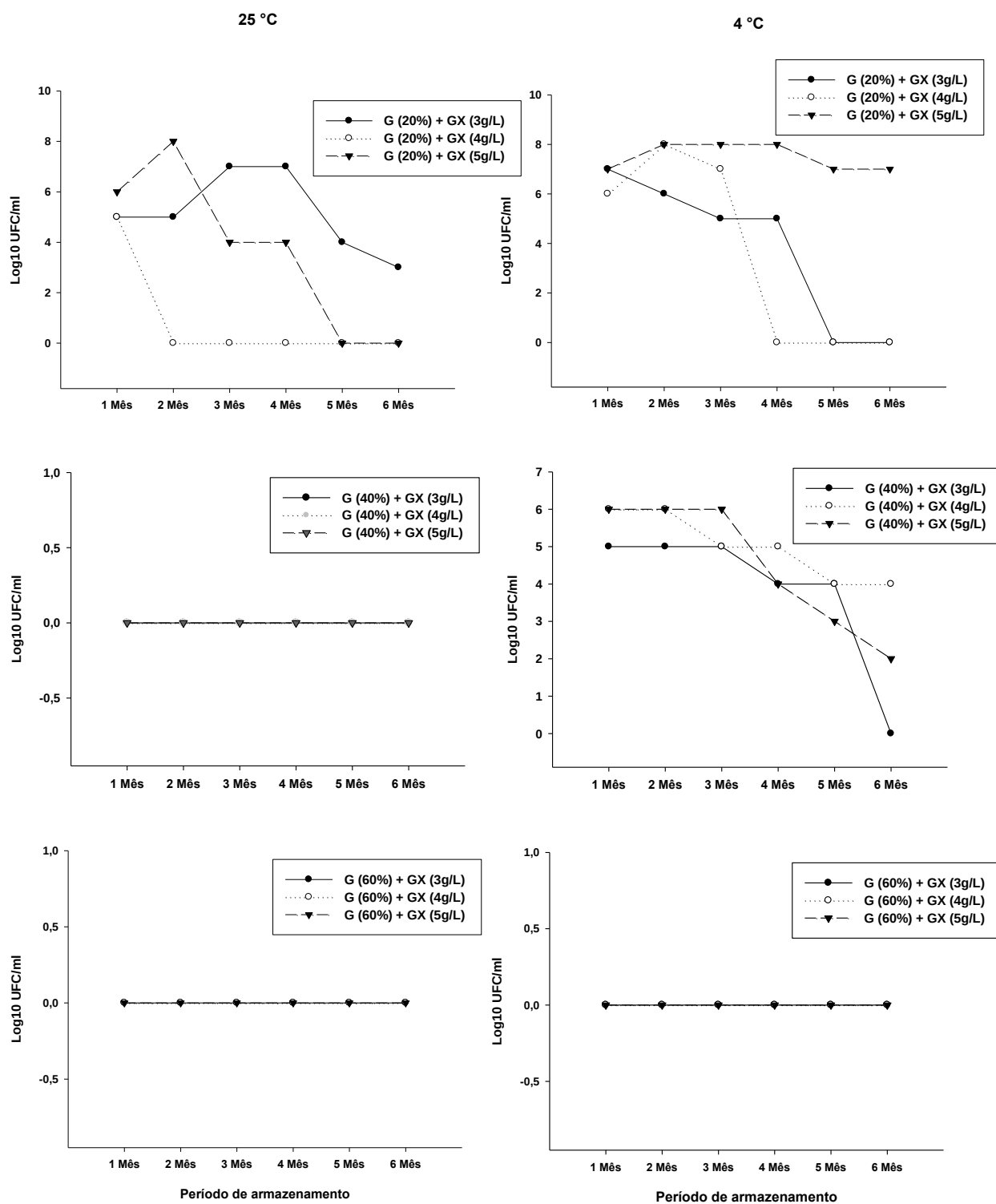


Figura 8. Sobrevivência de *Aureobasidium pullulans*-ACBL-77, em diferentes formulações armazenadas nas temperaturas de 25 ± 2 e 4°C , avaliada através da unidade formadora de colônia da levedura por ml da formulação (UFC/ml), durante seis meses de armazenamento. G = Glicerol; GX = Goma Xantana.

4.5. Manutenção da atividade *killer* de *Aureobasidium pullulans*-ACBL-77 nas formulações

Observou-se que todos os formulados foram capazes de manter a atividade *killer* de *A. pullulans*-ACBL-77 contra a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006, *G. citri-aurantii* e *P. digitatum*, independente do período de armazenamento e das condições de temperatura (Tabelas 6 e 7, ilustrado na Figura 9).

Tabela 6. Atividade *killer* de *A. pullulans* ACBL-77, a partir do produto formulado e armazenado por três meses, sob diferentes temperaturas, contra a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006, *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum*.

Formulados	<i>S. cerevisiae</i>	<i>G. citri-aurantii</i>	<i>P. digitatum</i>
⁽¹⁾ G (40%) + GX (3g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (40%) + GX (4g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (20%) + GX (5g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (20%) + GX (3g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (40%) + GX (5g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (20%) + GX (4g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (20%) + GX (4g) 22°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (20%) + GX (3g) 22°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (20%) + GX (5g) 22°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara

Atividade *killer* do ACBL-77 mostrando a zona clara (inibição dos microrganismos) e linha azul (morte celular dos microrganismos sensíveis YEPD-azul de metileno, a 27°C, pH 4,6. G = Glicerol; GX = Goma Xantana.

Tabela 7. Atividade *killer* de *A. pullulans* ACBL-77, a partir do produto formulado e armazenado por seis meses, sob diferentes temperaturas, contra a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006, *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum*.

Formulado	<i>S. cerevisiae</i>	<i>G. citri-aurantii</i>	<i>P. digitatum</i>
⁽¹⁾ G (20%) + GX (5g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (20%) + GX (3g) 22°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara
G (40%) + GX (5g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Linha azul; Zona clara	Zona clara
G (40%) + GX (4g) 4°C	Linha azul; Zona clara	Zona clara	Zona clara

Atividade *killer* do ACBL-77 mostrando a zona clara (inibição dos microrganismos) e linha azul (morte celular dos microrganismos sensíveis YEPD-azul de metileno, a 27°C, pH 4,6. G = Glicerol; GX = Goma Xantana.

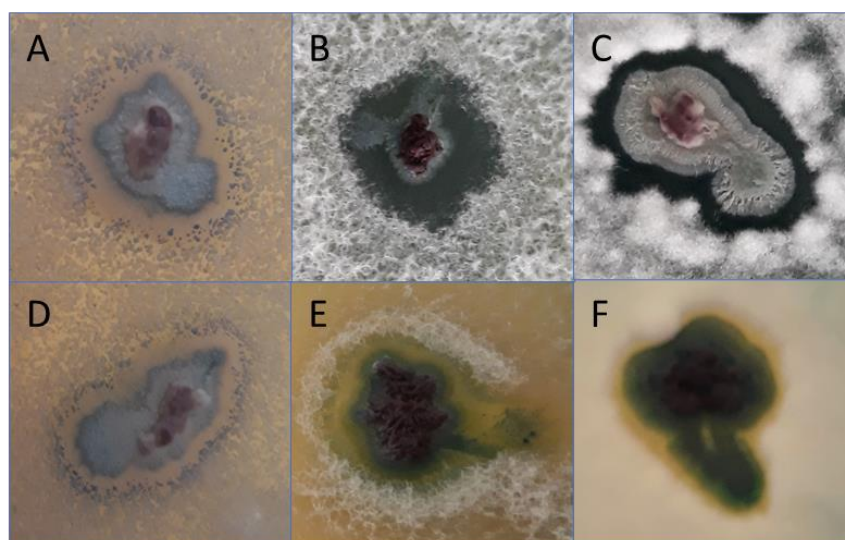


Figura 9. Atividade *killer* de *A. pullulans* ACBL-77, a partir do produto formulado e armazenado por três meses e seis meses. (A) G (20%) + GX (5g) a 4°C contra *Saccharomyces cerevisiae*; (B) G (20%) + GX (4g) a 4°C contra *Geotrichum citri-aurantii*; (C) G (20%) + GX (4g) a 27°C contra *Penicillium digitatum*, após três meses de armazenamento e, (D) G (20%) + GX (5g) a 4°C contra *S. cerevisiae*; (E) G (40%) + GX (5g) a 4°C contra *G. citri-aurantii*; (F) G (40%) + GX (5g) a 4°C contra *P. digitatum*, após seis meses de armazenamento.

4.6. Detecção e quantificação de sideróforos de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 na formulação

Os formulados que mantiveram a sobrevivência da levedura após três e seis meses de armazenamento nas diferentes temperaturas foram submetidos ao teste de detecção e quantificação de sideróforos pela levedura. Os resultados mostraram que todos os formulados avaliados foram capazes de manter a produção de sideróforos pela levedura por um período de três e seis meses de armazenamento, sendo que a produção foi maior neste último período (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação de sideróforos de *A. pullulans* ACBL-77 na formulação após três e seis meses de armazenamento.

Três meses		Seis meses	
Formulado	Sideróforos (g/L)	Formulado	Sideróforos (g/L)
⁽¹⁾ G (40%) + GX (3g/L) 4°C	0,7	G (20%) + GX (5g/L) 4°C	1,28
G (40%) + GX (4g/L) 4°C	0,88	G (20%) + GX (3g/L) 22°C	1,96
G (20%) + GX (5g/L) 4°C	0,66	G (40%) + GX (5g/L) 4°C	1,12
G (20%) + GX (3g/L) 4°C	0,47	G (40%) + GX (4g/L) 4°C	1,58
G (40%) + GX (5g/L) 4°C	1,0		
G (20%) + GX (4g/L) 4°C	0,32		
G (20%) + GX (4g/L) 25°C	0,89		
G (20%) + GX (3g/L) 25°C	0,35		
G (20%) + GX (5g/L) 25°C	0,18		

⁽¹⁾ G = Glicerol; GX = Goma Xantana.

4.7. Efeito das formulações à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii* e de *Penicillium digitatum*

Os formulados contendo Glicerol (G) a 20%, independente da concentração de Goma Xantana (GX), proporcionaram os menores tamanhos da colônia de *G. citri-aurantii*, seguidos dos formulados contendo G (40%) + GX

(4g/L). As maiores inibições do crescimento micelial do fitopatógeno foram obtidas quando as formulações foram armazenadas a 4°C (Tabela 9 a 13).

Tabela 9. Análise de Variância para efeito das formulações à base de *A. pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii* e suas interações.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Fator A (Glicerol)	2	14,985833	7,4929167	55,49**
Fator B (Goma Xantana)	2	1,5502778	0,7751389	5,74**
Fator C (Temperatura)	1	0,9204167	0,9204167	6,82**
Interação AxB	4	2,3455556	0,5863889	4,34**
Interação AxC	2	0,5575000	0,2787500	2,06NS
Interação BxC	2	0,0502778	0,2513889	0,19NS
Interação AxBxC	4	2,3688889	0,5922222	4,39**
(Fatorial)	17	22,778750	1,3399264	9,92**
Adic. vs. Fatorial	1	1,7070394	1,7070394	12,64**
(Tratamentos)	18	24,485789	1,3603216	10,07**
Resíduo	38	5,1316667	0,1350438	-
Total	56	29,617456	-	-

Desvio Padrão = 0,37. CV (%) = 6,52

Tabela 10. Efeito da concentração de glicerol na formulação à base de *Aureobasidium pullulans*, na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias.

Glicerol	Diâmetro médio da colônia (cm)
20%	4,98 a ⁽¹⁾
40%	5,51 b
60%	6,27 c

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 11. Efeito da concentração de Goma Xantana na formulação à base de *Aureobasidium pullulans*, na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias.

Goma Xantana	Diâmetro médio da colônia (cm)
3g/L	5,82 b ⁽¹⁾
4g/L	5,52 a
5g/L	5,43 a

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 12. Efeito da temperatura de armazenamento da formulação à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias.

Temperatura	Diâmetro médio da colônia (cm)
25°C	5,72 b ⁽¹⁾
4°C	5,46 a

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 13. Efeito da interação dos fatores (Glicerol x Goma Xantana) na formulação à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias.

Glicerol	Goma Xantana		
	3g/L	4g/L	5g/L
20%	5,033 aA ⁽¹⁾	5,025 aA	4,908 aA
40%	5,608 aB	5,316 aA	5,616 aB
60%	6,833 bC	6,225 aB	5,758 aB

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

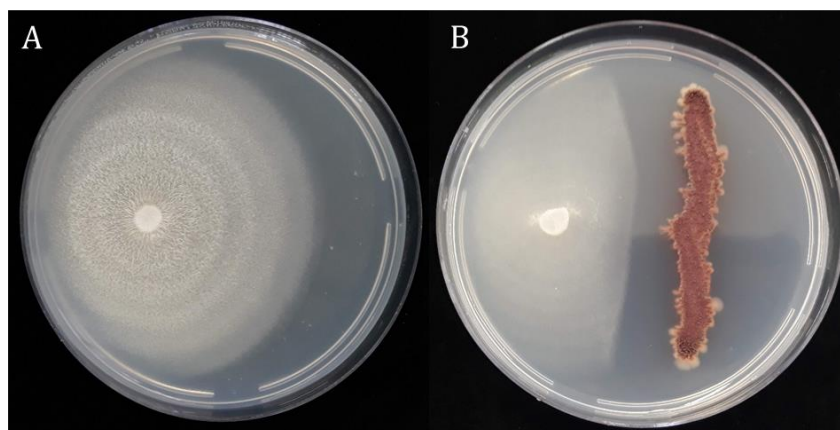


Figura 10. Efeito da formulação à base de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*. (A) Tratamento controle; (B) Pareamento com o formulado G (20%) + GX (5g/L) a 4°C contra *Geotrichum citri-aurantii*.

Os formulados contendo Glicerol (20 e 40%) foram os que proporcionaram os menores tamanhos das colônias de *P. digitatum*. Os demais fatores avaliados e suas interações não diferiram estatisticamente (Tabelas 14 a 17).

Tabela 14. Análise de Variância para efeito das formulações à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* e suas interações.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Fator A (Glicerol)	2	4,579537	2,289768	10,20**
Fator B (Goma Xantana)	2	0,737870	0,368935	1,64NS
Fator C (Temperatura)	1	0,074074	0,074074	0,33NS
Interação AxB	4	1,862962	0,465740	2,08NS
Interação AxC	2	0,226203	0,113101	0,50NS
Interação BxC	2	0,239537	0,119768	0,53NS
Interação AxBxC	4	0,876851	0,219212	0,98NS
(Fatorial)	17	8,597037	0,505708	2,25*
Adic. vs. Fatorial	1	14,697699	14,697699	65,50**
(Tratamentos)	18	23,294736	1,294152	5,77**
Resíduo	38	8,526667	0,224385	-
Total	56	31,821403	-	-

Desvio Padrão = 0,47. CV (%) = 7,88

Tabela 15. Efeito da concentração de glicerol, na formulação à base de *Aureobasidium pullulans*, na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias.

Glicerol	Diâmetro médio da colônia (cm)
20%	5,65 a ⁽¹⁾
40%	5,72 a
60%	6,30 b

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem, significativamente, pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 16. Efeito da concentração de Goma Xantana na formulação à base de *Aureobasidium pullulans* na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias.

Goma Xantana	Diâmetro médio da colônia (cm)
3g/L	5,96 a ⁽¹⁾
4g/L	5,72 a
5g/L	5,98 a

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem, significativamente, pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

Tabela 17. Efeito da temperatura de armazenamento da formulação à base de *Aureobasidium pullulans*, na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após incubação em estufa para BOD com fotoperíodo 12/12h a 27°C, por 7 dias.

Temperatura	Diâmetro médio da colônia (cm)
25°C	5,93 a ⁽¹⁾
4°C	5,85 a

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem, significativamente, pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$).

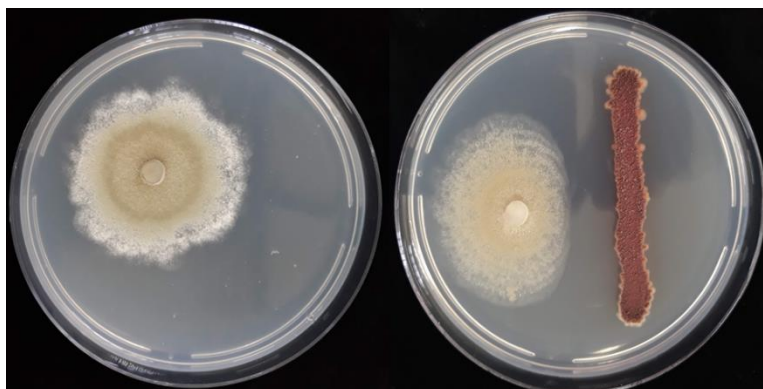


Figura 11. Efeito da formulação à base de *A. pullulans* ACBL-77 na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. (A) Tratamento controle; (B) Pareamento com o formulado G (20%) + GX (3g/L) a 4°C contra *P. digitatum*.

4.8. Efeito da formulação à base de *Aureobasidium pullulans* sobre a germinação dos fitopatógenos

Os dados da Figura 12 mostraram que células da levedura e o produto formulado a base de *A. pullulans*, em diferentes concentrações, inibiram, significativamente, a porcentagem de conídios germinados de *G. citri-aurantii*, em relação à testemunha. Os valores de inibição da germinação de conídios do fitopatógenos variaram de 67 (formulado a 5%) a 93% (ACBL-77).

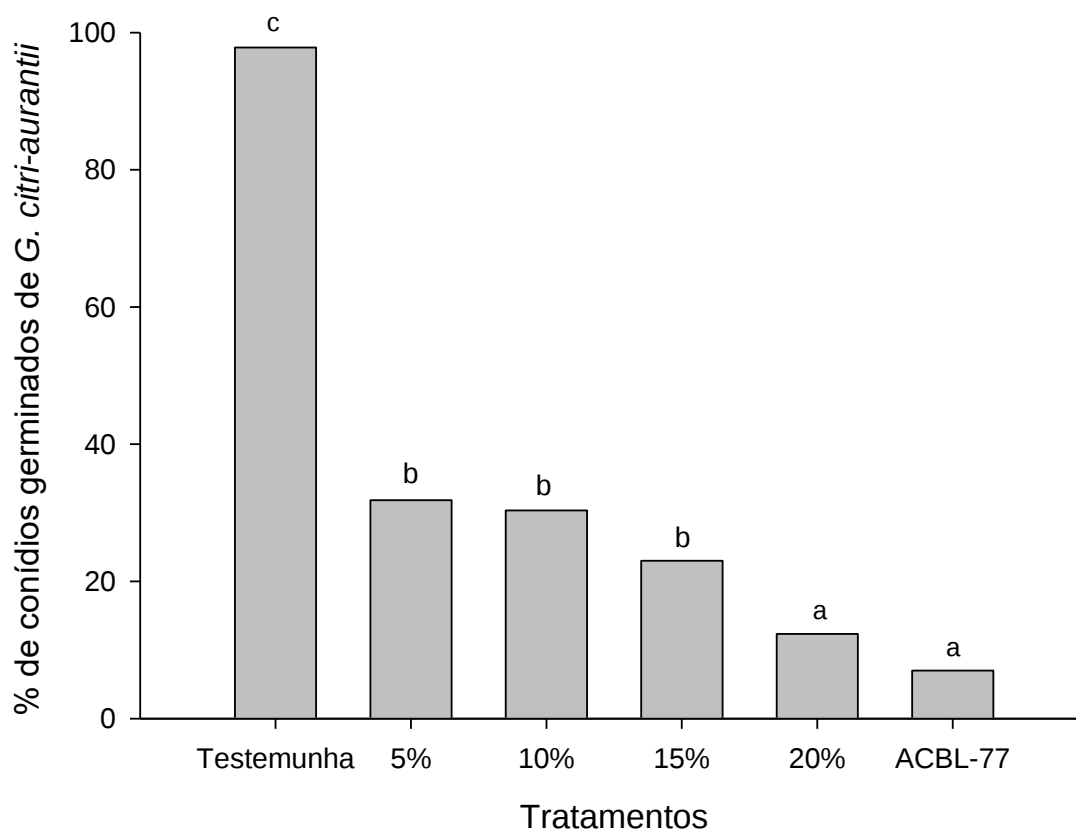


Figura 12. Porcentagem de conídios germinados de *Geotrichum citri-aurantii*, sob ação da levedura *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 e de diferentes concentrações da formulação a base da levedura + Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Com relação aos dados de germinação de *P. digitatum*, verificou-se que, a levedura e o produto formulado a base de *A. pullulans*, em diferentes concentrações, inibiram, significativamente, a porcentagem de conídios germinados do fungo, em relação à testemunha. Os maiores valores de inibição foram obtidos pela levedura (89%) e com o formulado a 20% (84%) (Figura 13).

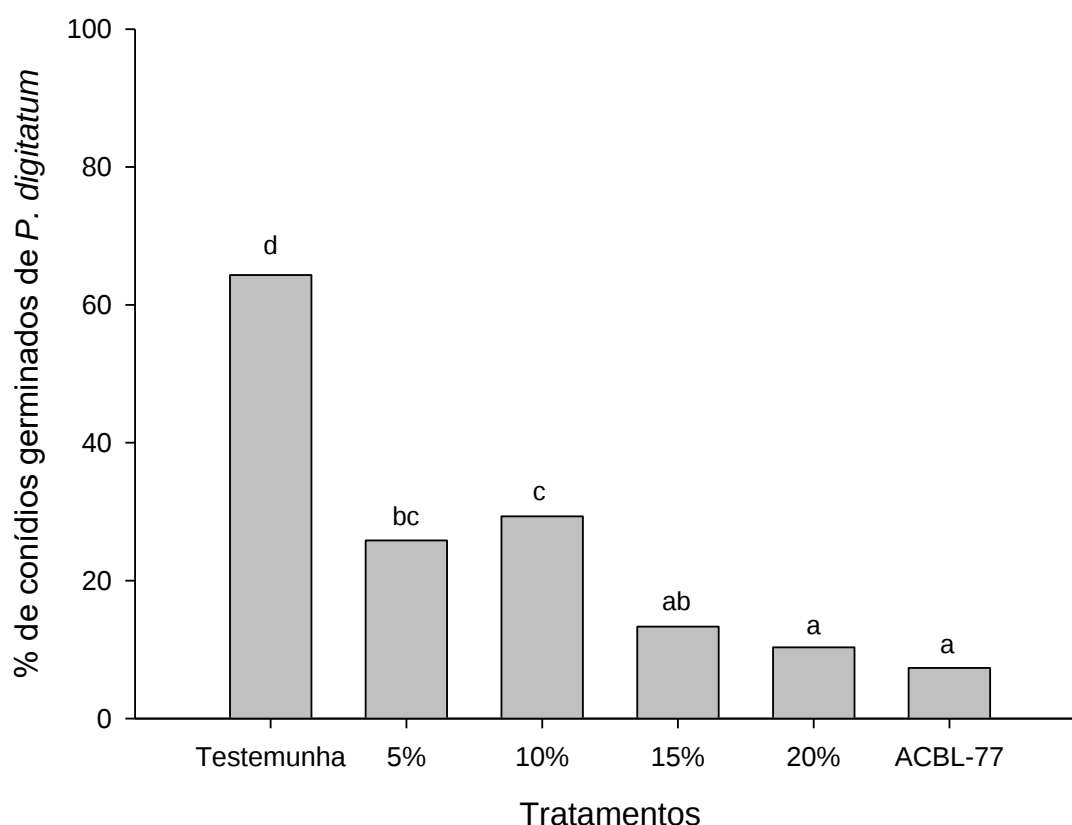


Figura 13. Porcentagem de conídios germinados de *Penicillium digitatum*, sob ação da levedura *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 e de diferentes concentrações da formulação a base da levedura + Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.9. Formulação à base de *Aureobasidium pullulans* no controle da podridão azeda e do bolor verde em frutos cítricos

4.9.1 Podridão Azeda

4.9.1.1 Lima ácida Tahiti

Os resultados apresentados na Figura 14 e 15 mostram que, células de *A. pullulans*-ACBL-77e o formulado à base da levedura, em todas as

concentrações testadas diminuíram, em torno de 83%, o tamanho médio das lesões de podridão azeda, quando os tratamentos foram aplicados de forma preventiva.

No entanto, quando os tratamentos foram aplicados de forma curativa, somente o tratamento com células da levedura diferiu, significativamente, da testemunha, diminuindo em 76% o tamanho médio das lesões da podridão azeda. O produto formulado, nas diferentes concentrações utilizadas, apresentou um comportamento intermediário, não diferindo nem da testemunha e nem do melhor tratamento (ACBL-77).

Ao analisar a incidência da doença, verifica-se que, todos os tratamentos aplicados de forma preventiva reduziram, significativamente, a porcentagem de frutos doentes, em relação ao tratamento testemunha. O produto formulado e aplicado, em diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20%), apresentou um controle médio de 83%, enquanto que, a aplicação de células do isolado ACBL-77 proporcionou 77% de frutos assintomáticos.

Com exceção do formulado a 20%, os demais tratamentos aplicados de forma curativa diferiram estatisticamente da testemunha, reduzindo a porcentagem de frutos doentes. Quando os frutos foram tratados curativamente com a levedura, a eficiência de controle foi de 74%, enquanto que o formulado nas concentrações de 5, 10 e 15%, proporcionou um controle médio de 54% (Figura 16).

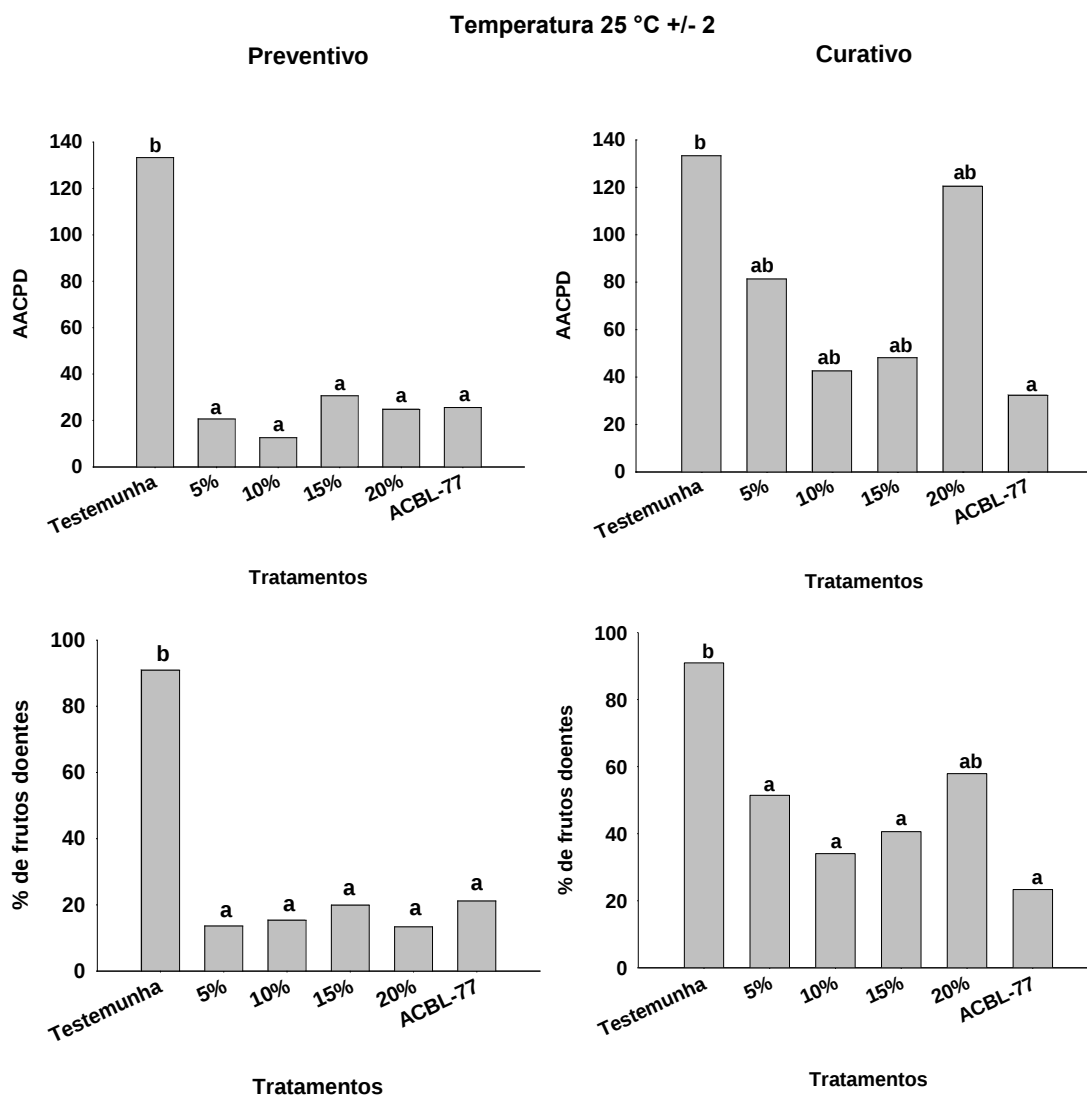


Figura 14. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P < 0,05).



Figura 15. Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR.



Figura 16. Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR.

Ao submeter os frutos ao armazenamento de 10°C e 90% de UR (Figura 17, 18 e 19), após os tratamentos preventivos e curativos, verificou-se que, tanto o formulado a base da levedura, em suas diferentes concentrações, como a levedura sozinha apresentaram diminuições significativas do tamanho médio das lesões de podridão azeda, com porcentagens de reduções médias que variaram de 83 a 94%.

Quando se avalia a incidência da doença, os frutos tratados preventivamente, com as diferentes concentrações do formulado ou, com a suspensão de células do isolado ACBL-77, apresentaram uma porcentagem média de controle da podridão azeda em torno de 71%, em relação ao tratamento testemunha. Na aplicação de forma curativa, os tratamentos correspondentes ao produto formulado (a 20%) e células do isolado ACBL-77, apresentaram controle da doença de 95% e 91%, respectivamente.

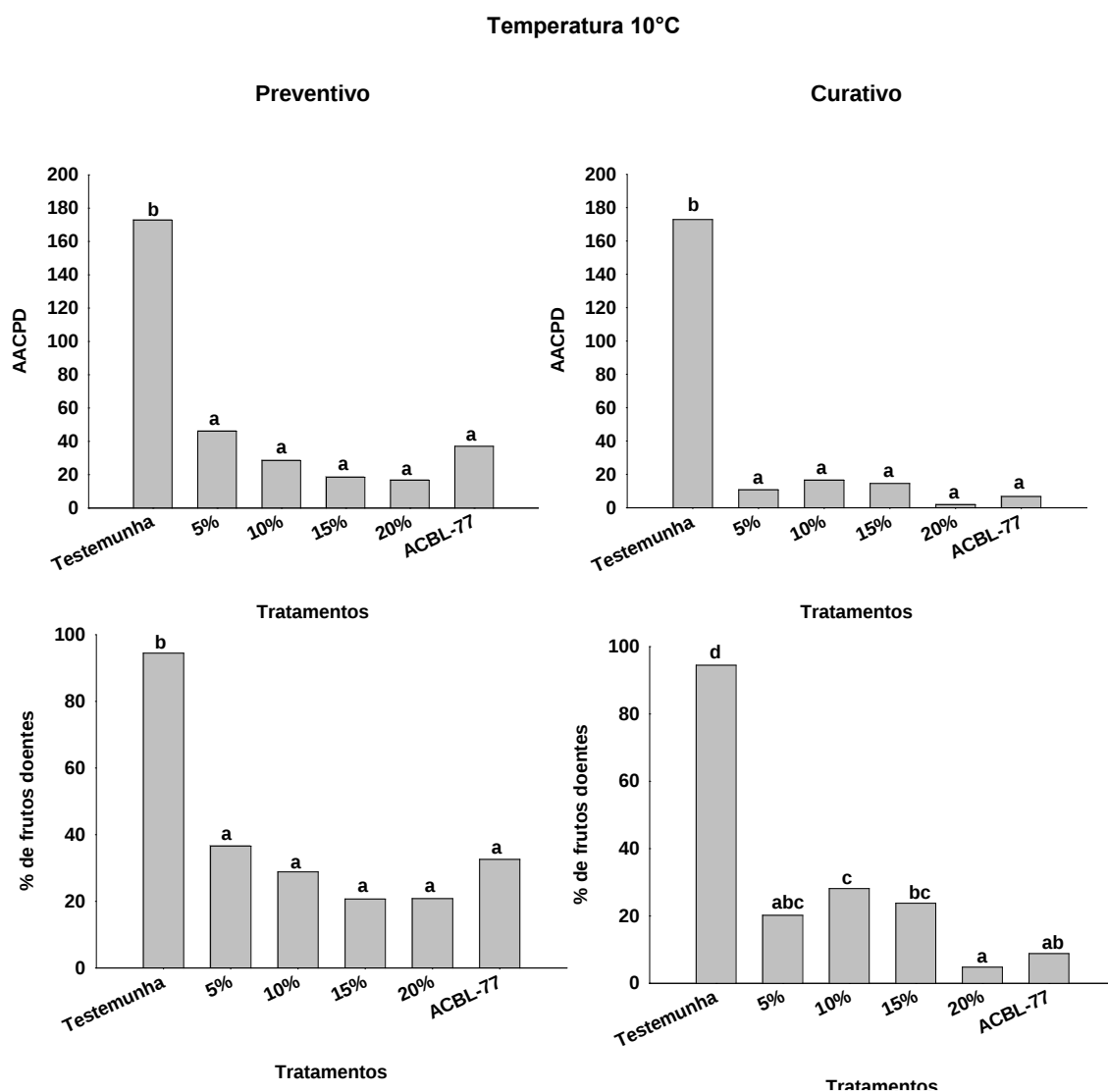


Figura 17. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$).



Figura 18. Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 10°C e 90% de UR.



Figura 19. Frutos de lima ácida Tahiti inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a 10°C e 90% de UR.

4.9.1.2 Laranja Pêra

Os dados referentes aos frutos de laranja Pêra tratados com células de *A. pullulans*-ACBL-77 ou, com o formulado à base do microrganismo, em suas diferentes concentrações e, armazenados sob temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), encontram-se ilustrados na Figura 20, 21 e 22.

Quando os frutos de laranja Pêra foram tratados preventivamente e curativamente com o isolado *A. pullulans*-ACBL-77 e o formulado em todas as concentrações, verifica-se que houve uma redução significativa no tamanho das lesões de podridão azeda, em relação às testemunhas. Ao se avaliar a incidência da doença, as porcentagens médias de frutos assintomáticos, com relação a esses tratamentos, foram de 61% (curativo) a 85% (preventivo), quando comparado com os tratamentos testemunhas.

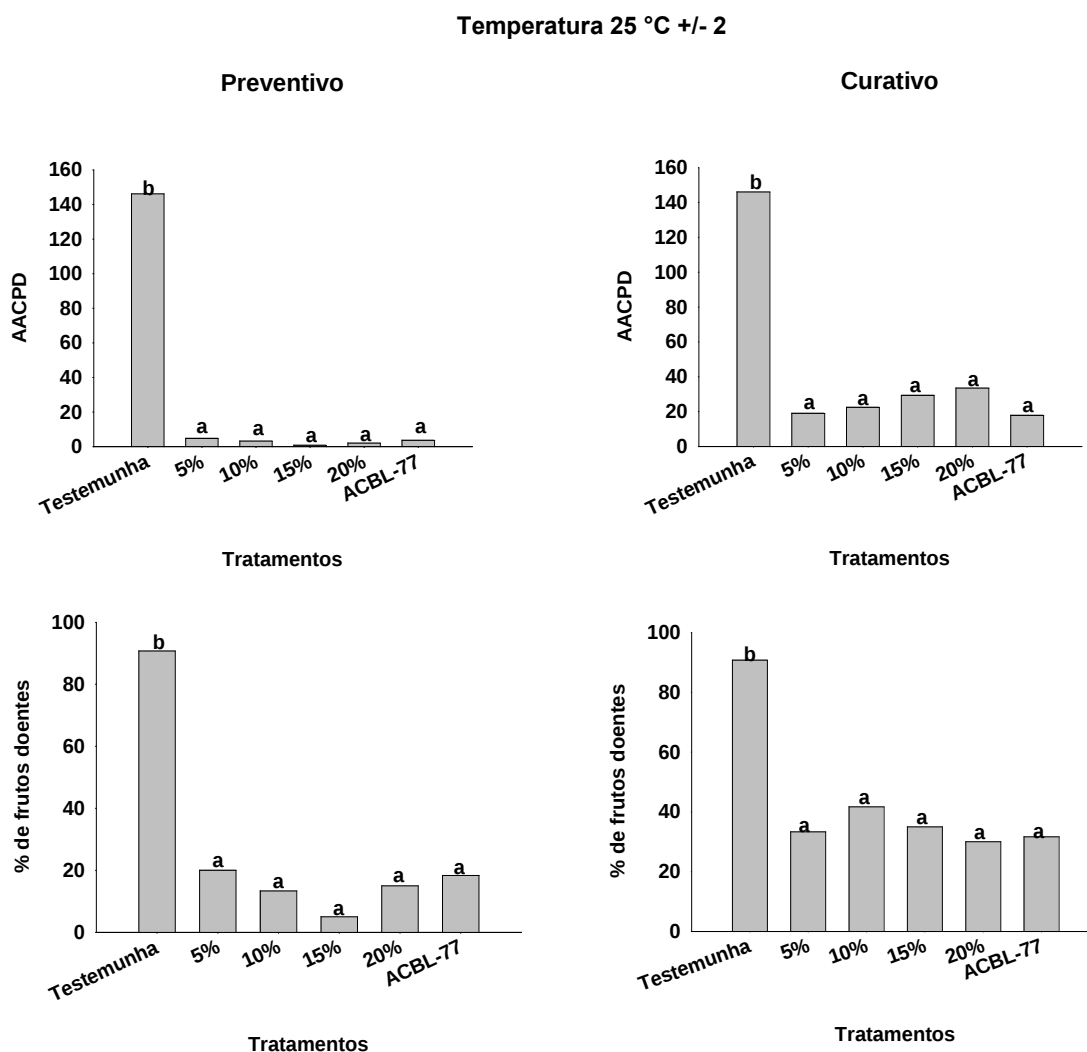


Figura 20. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P < 0,05).



Figura 21. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR.



Figura 22. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Geotrichum citri-aurantii* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR.

4.9.1.3 Tangor Murcott

Os frutos de Tangor Murcott tratados preventivamente com células da levedura e com o formulado, nas diferentes concentrações, armazenados sob temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) reduziu, significativamente, o tamanho médio das lesões de podridão azeda, quando comparado com a testemunha. Frutos tratados com células da levedura ACBL-77 sozinha apresentaram uma redução de 95 e 65% da severidade quando as aplicações forma preventiva e curativa, respectivamente. O formulado à base da levedura, nas concentrações de 5 e 20%, apresentou uma redução do tamanho médio das lesões em torno de 91%, quando os frutos foram tratados preventivamente. No entanto, os frutos tratados curativamente com o formulado na concentração de 5% apresentou uma redução de 68%, não diferindo estatisticamente dos tratamentos de 10 e 15% com média de redução de 59%.

Com relação à incidência da doença, os dados mostraram que os frutos tratados preventivamente com as células de *A. pullulans* ACBL-77 obtiveram um controle de 70% da podridão azeda, não diferindo estatisticamente dos frutos tratados com o formulado à base da levedura nas concentrações de 5 e 20%, com 45% de frutos assintomáticos. Sendo que, os frutos tratados somente com as células da levedura apresentaram 27% de frutos assintomáticos, quando tratados de forma curativa, e o formulado na concentração de 15% apresentou 20% de frutos sadios. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha (Figura 23).

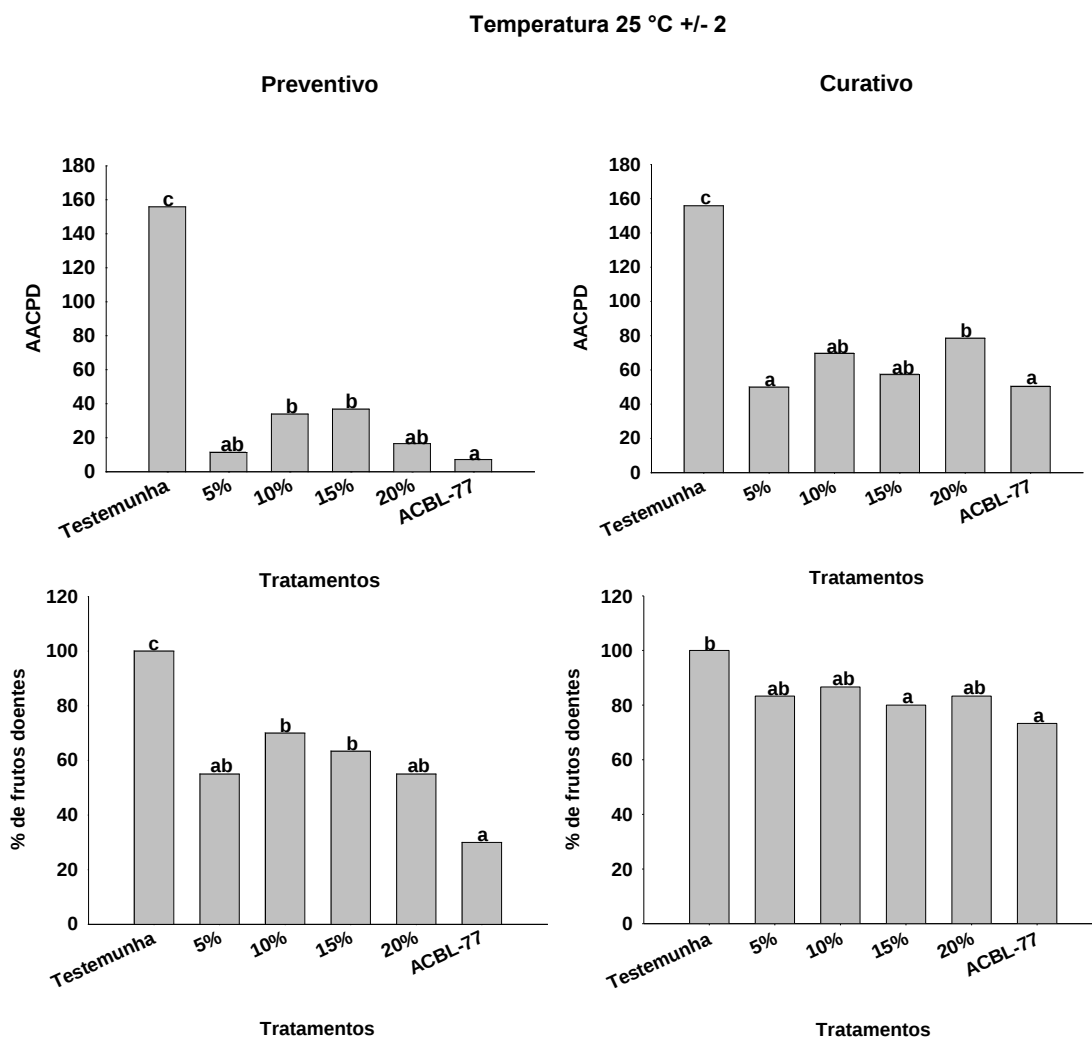


Figura 23. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P < 0,05).

4.9.2 Bolor Verde

4.9.2.1 Lima ácida Tahiti

Os resultados apresentados na Figura 24 e 25 mostraram que o tratamento preventivo dos frutos com células da levedura e com o formulado,

nas diferentes concentrações, armazenados sob temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) reduziu, significativamente, o tamanho das lesões de bolor verde, quando comparado com a testemunha e o tratamento curativo. Frutos tratados com células da levedura sozinha, com o formulado da levedura (20%) e com fungicida proporcionaram 95, 87 e 100 % de controle, respectivamente, não havendo diferença estatística entre si.

Com relação à incidência da doença, os dados mostram que todos os tratamentos, aplicados de forma preventiva, diferiram da testemunha, reduzindo o número de frutos doentes. Os formulados à base da levedura, nas diferentes concentrações, não diferiram, significativamente, entre si, apresentando um controle em torno de 54%. Sendo que, os frutos tratados somente com as células *A. pullulans* ACBL-77 apresentaram 85% de frutos assintomáticos, não diferindo do tratamento químico (100%). Os frutos tratados de forma curativa pelos diferentes tratamentos não apresentaram controle da doença com 100% de frutos sintomáticos.

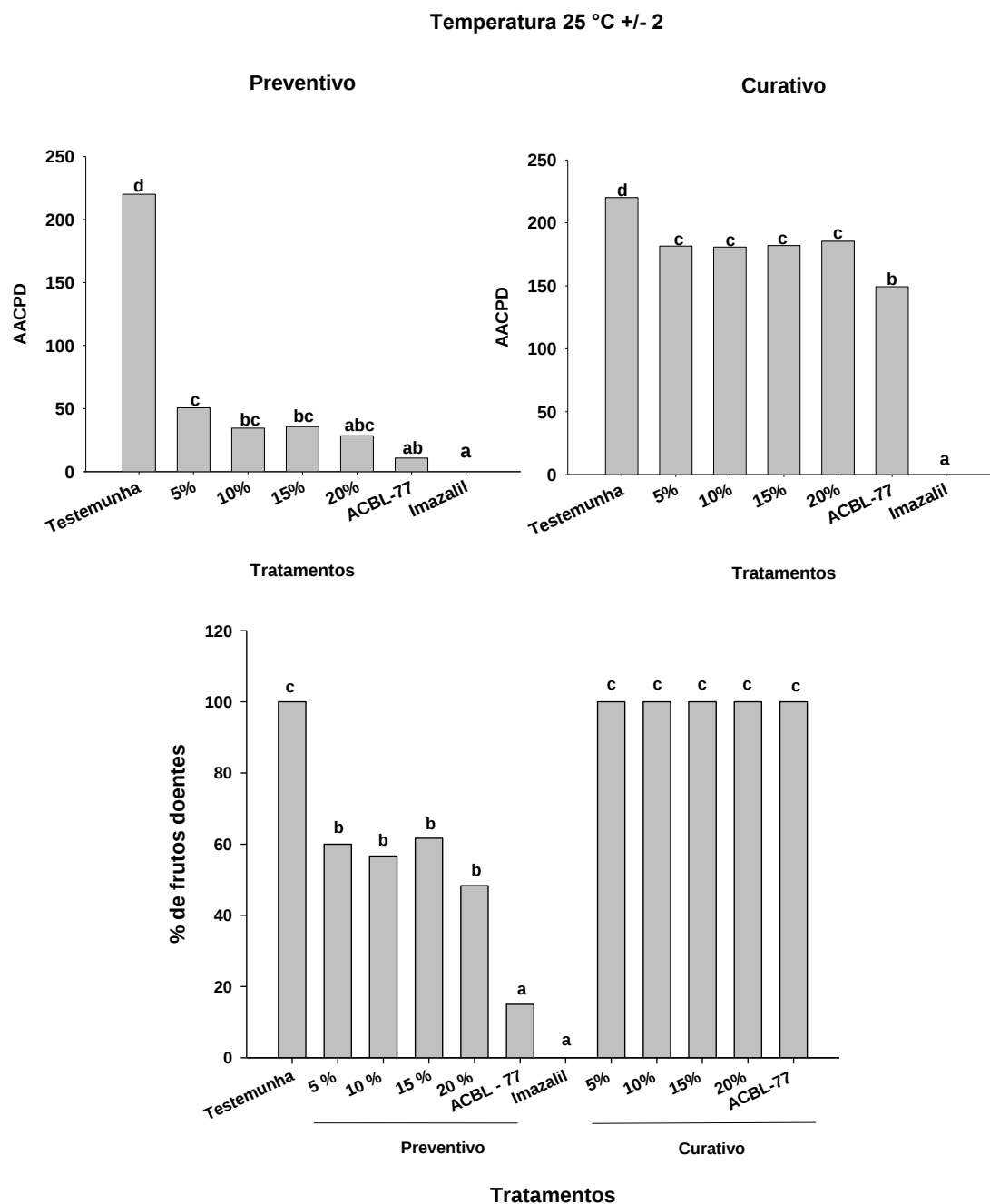


Figura 24. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P < 0,05).



Figura 25. Frutos de lima ácida Tahiti inoculadas com *Penicillium digitatum* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR.

Ao serem avaliados os frutos de lima ácida Tahiti armazenados em temperatura de 10°C e 90% de UR (Figuras 26), verificou-se que, os tratamentos dos frutos com as células da levedura e com o formulado a 20% proporcionaram uma redução no tamanho das lesões de bolor verde de 91,7% e 73,7%, respectivamente, quando os tratamentos ocorreram de forma preventiva. Quando se avaliou a incidência da doença, o formulado a 20%, preventivo, apresentou 36,67% de controle, no entanto os frutos tratados somente com células *A. pullulans* ACBL-77 apresentaram 82 e 42% de frutos assintomáticos, quando os tratamentos foram aplicados de forma preventiva e curativa, respectivamente.

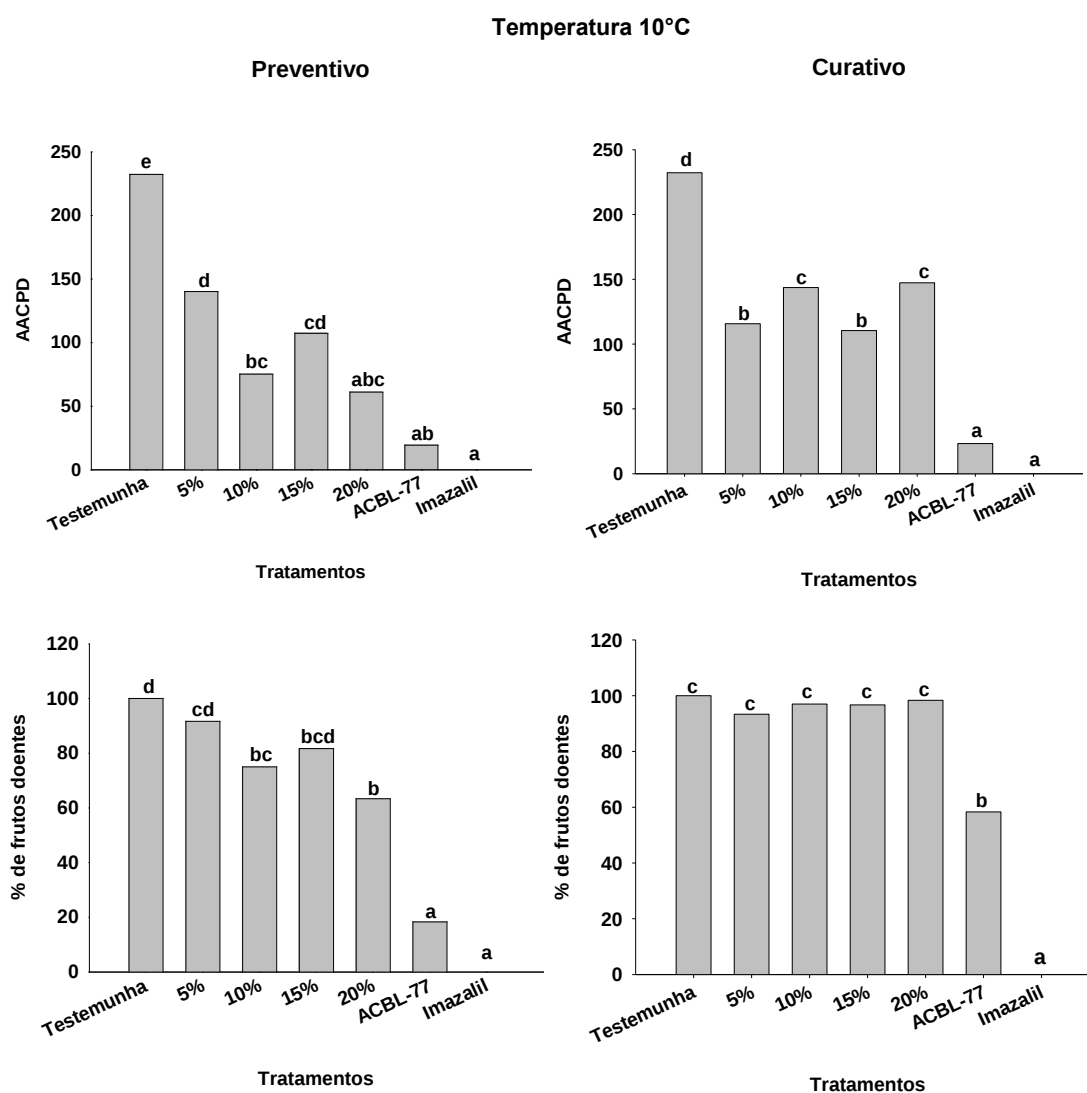


Figura 26. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de lima ácida Tahiti e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

4.9.2.2 Laranja Pêra

Frutos de laranja Pêra tratados preventivamente com células da levedura e com o formulado, nas diferentes concentrações, apresentaram reduções (97 a 99%), significativas, no tamanho das lesões de bolor verde, quando comparado com os frutos não tratados (testemunha). Com relação ao tratamento dos frutos de forma curativa, os resultados foram semelhantes ao tratamento preventivo, sendo que os melhores controle foram obtidos com o formulado (5 e 15%) com reduções médias dos tamanhos das lesões de bolor verde em torno de 94% (Figura 27).

Em relação à avaliação da incidência da doença (Figura 27, 28 e 29), todos os tratamentos aplicados de forma preventiva diferiram, estatisticamente, da testemunha. Frutos tratados com as células da levedura apresentaram 77,8% de controle, enquanto que, o produto formulado, nas diferentes concentrações, apresentou porcentagens de controle que variaram de 78 a 91% (formulado a 10%). Os frutos tratados de forma curativa só apresentaram um bom controle quando os mesmos foram tratados com o formulado nas concentrações de 5 e 15%, com 78% de controle em relação à testemunha.

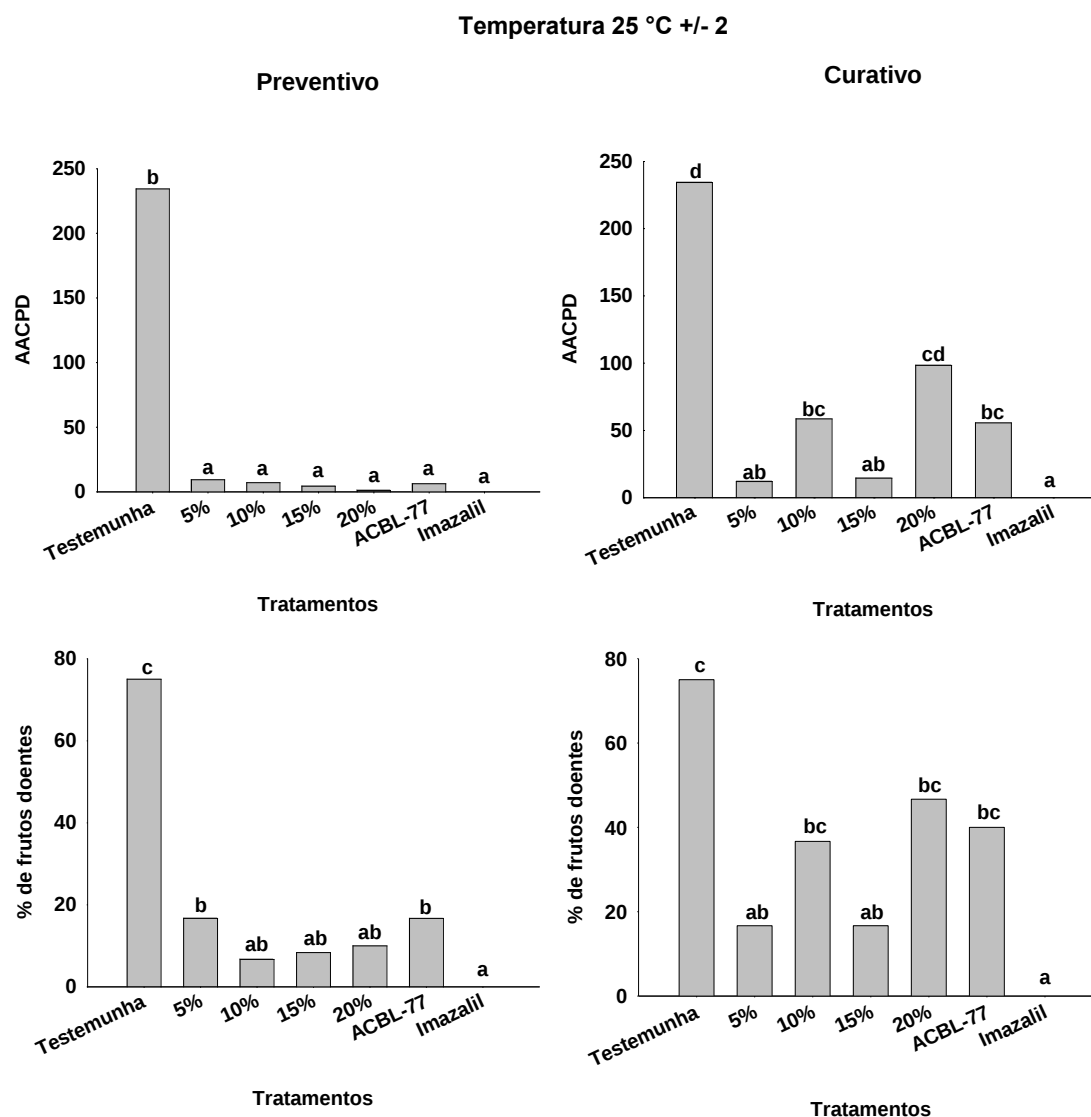


Figura 27. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pêra e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 25°C ± 2. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey (P <0,05).



Figura 28. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR.



Figura 29. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 70% de UR.

A eficiência de controle dos tratamentos foi maior, quando os frutos foram tratados preventivamente e armazenados em temperatura de 10°C e 90% de UR (Figura 30, 31 e 32). Os tratamentos dos frutos à base do formulado a 5, 10, 15 e 20% proporcionaram valores médios de reduções do tamanho das lesões do bolor verde em torno de 99%, com uma média de 97% de frutos sadios. Os tratamentos onde se aplicaram apenas as células da levedura, de forma curativa e preventiva, observa-se valores de reduções do tamanho das lesões de bolor verde de 94% e 98%, respectivamente. Com relação à porcentagem de frutos sadios os valores foram de 91 e 96%, para aplicações curativa e preventiva da levedura, respectivamente.

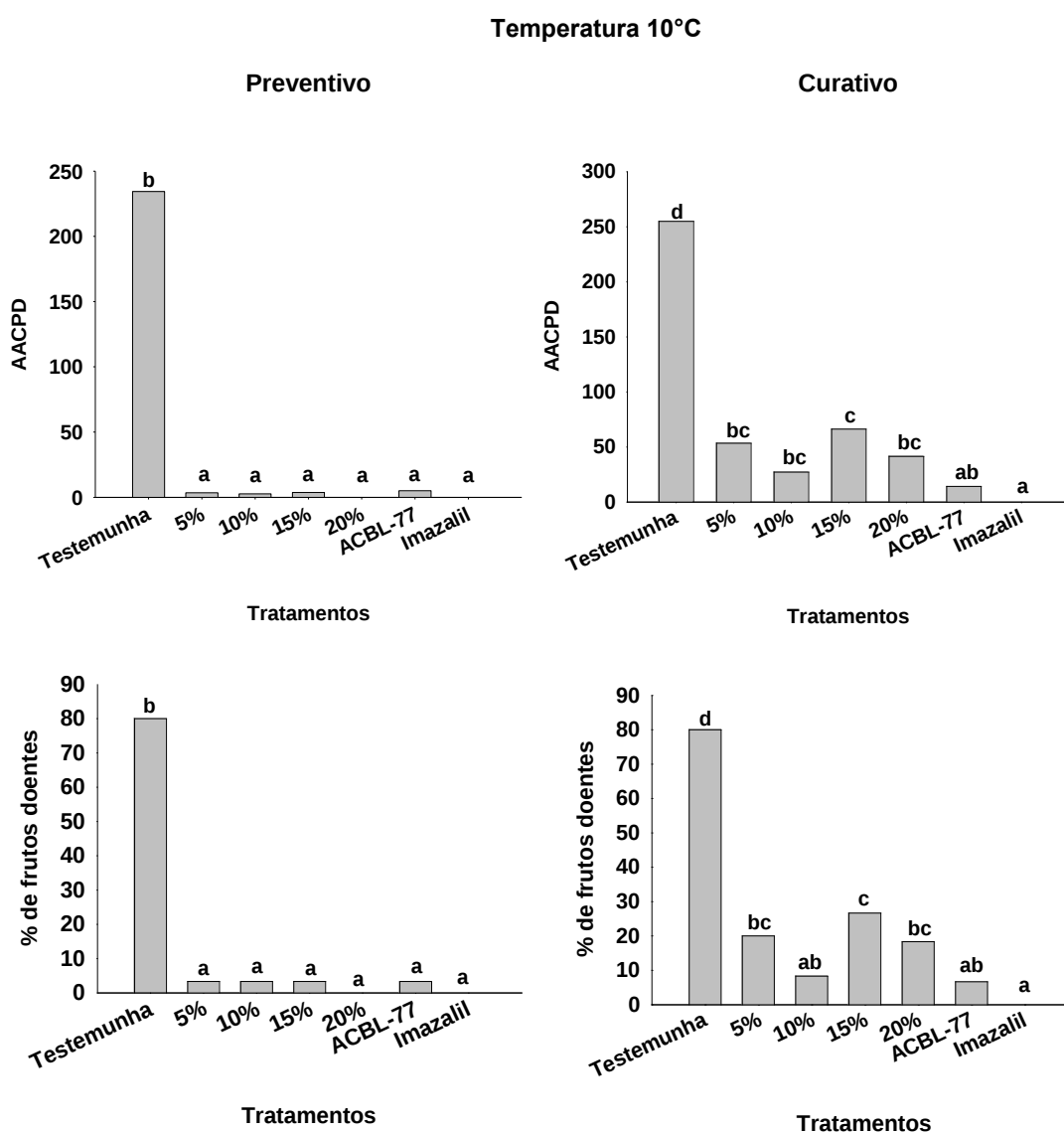


Figura 30. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos

de laranja Pêra e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$).



Figura 31. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados preventivamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenados a 10°C e 90% de UR.

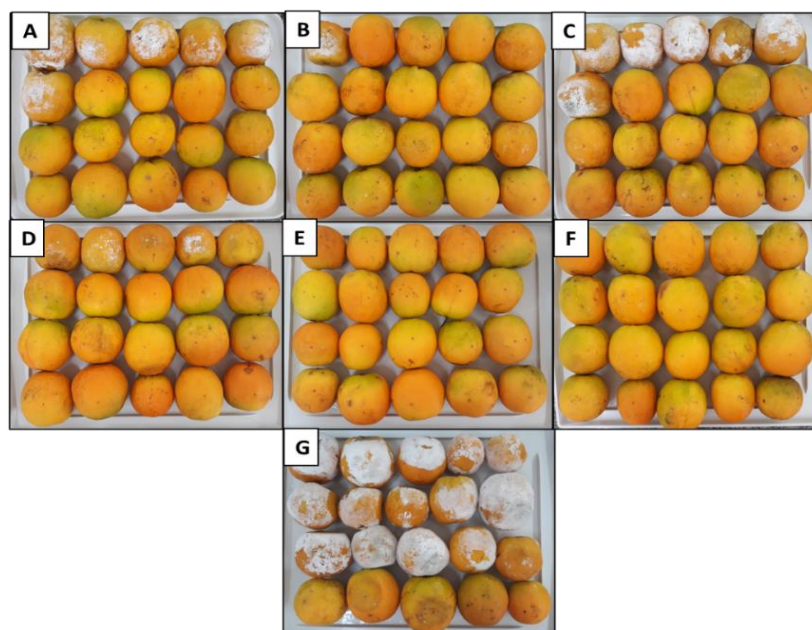


Figura 32. Frutos de laranja Pêra inoculados com *Penicillium digitatum* e tratados curativamente com o formulado: A) 5%; B) 10%; C) 15%; D) 20%. (E) Frutos tratados com células de ACBL-77. (F) Tratamento químico (Imazalil). (G) Testemunha (sem tratamento). Armazenados a 10°C e 90% de UR.

4.9.2.3 Tangor Murcott

Com exceção do tratamento fungicida, nenhum dos tratamentos aplicados de forma curativa em frutos de tangerina Murcott foi eficiente para o controle do bolor verde. Por outro lado, quando os frutos foram tratados preventivamente, apenas o tratamento com células da levedura reduziu (91%) o tamanho médio das lesões de bolor verde e proporcionou 71% de frutos assintomáticos, quando comparado com o tratamento testemunha. (Figura 33).

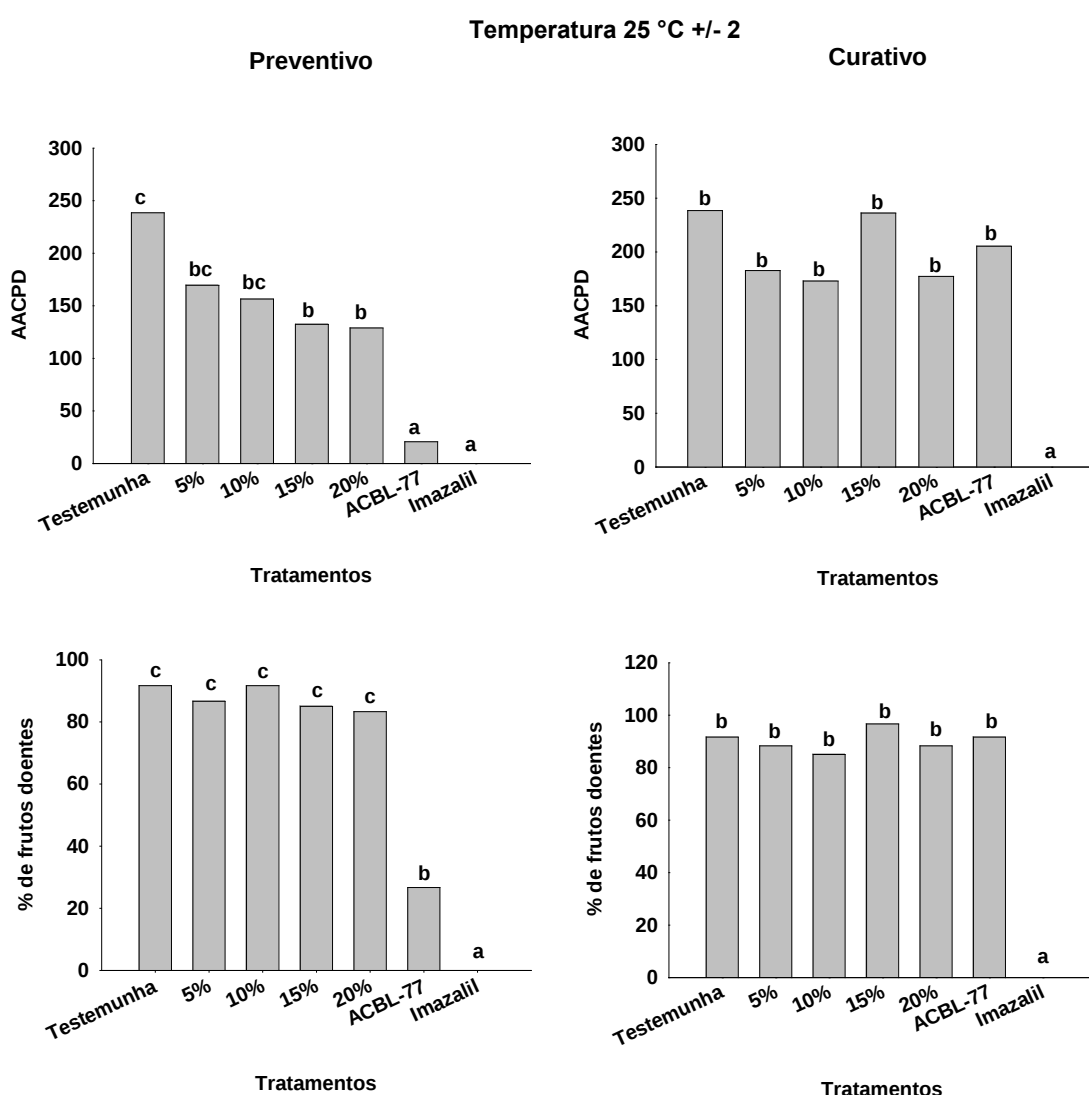


Figura 33. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de tangerina Murcott e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes

concentrações, armazenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Frutos de tangor Murcott armazenados a 10°C e 90% de UR, após serem tratados com células *A. pullulans* ACBL-77 e o formulado à base da levedura, em todas as concentrações testadas, apresentaram os menores tamanhos de lesões de bolor verde em relação à testemunha, com uma média de redução da lesão de 69 a 82% e de 54 a 68%, quando a aplicação dos tratamentos se deu de forma preventiva e curativa, respectivamente (Figura 34). Ao analisar a incidência da doença, verifica-se que, o formulado nas diferentes concentrações testadas, e do modo de aplicação, não diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. Os frutos tratados com células de ACB-77, preventivamente, apresentaram 23,7% de frutos assintomáticos.

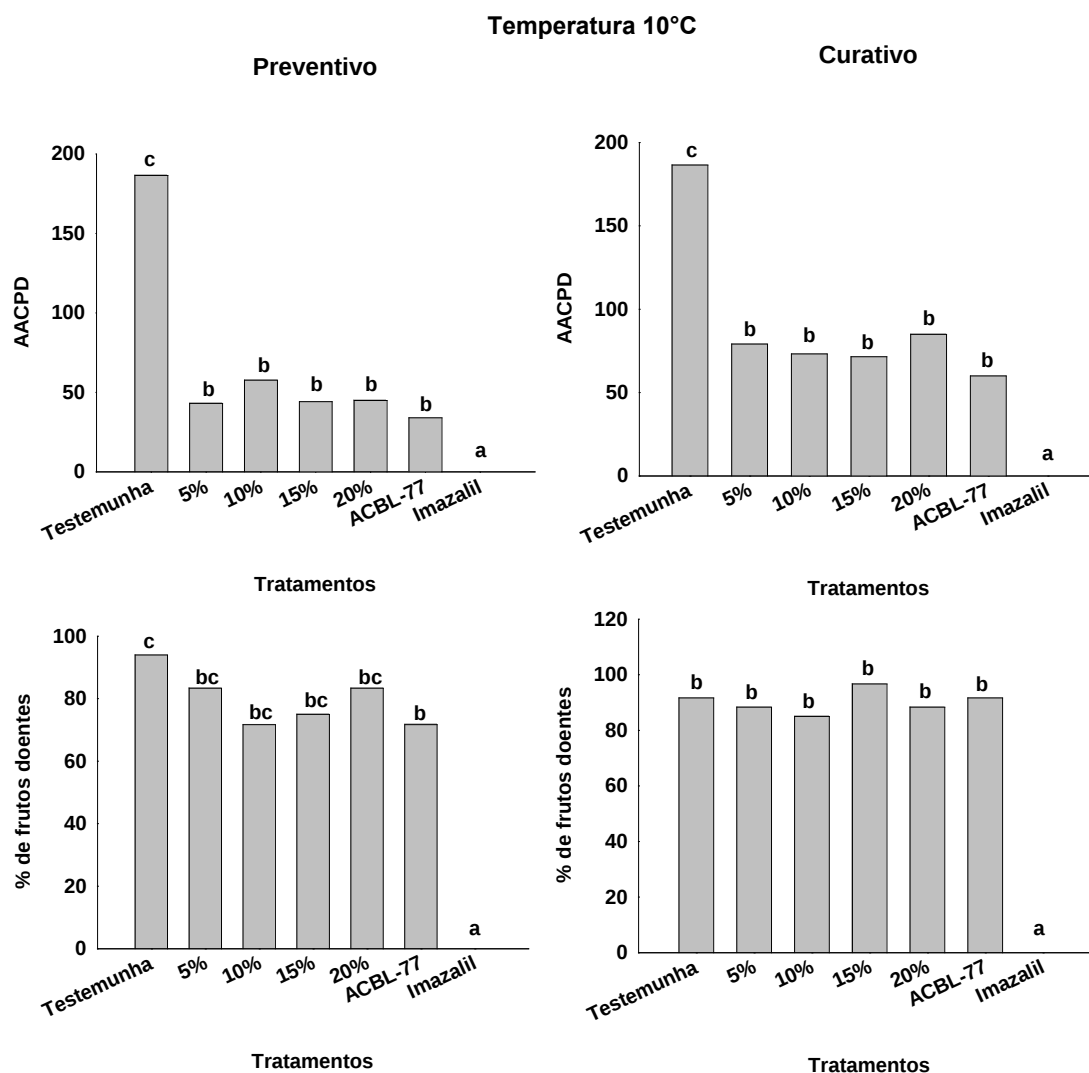


Figura 34. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliada pelo diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Penicillium digitatum* em frutos de tangerina Murcott e a porcentagem de frutos doentes após tratamento preventivo e curativo com formulado à base de *Aureobasidium pullulans*, em diferentes concentrações, armazenadas a 10°C e 90% de UR. Médias seguidas de mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

4.10. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *Aureobasidium pullulans* nos parâmetros de qualidade dos frutos cítricos

A aplicação das diferentes concentrações do formulado à base da levedura não apresentaram alterações nos parâmetros de qualidade dos frutos (rendimento médio de suco, teor de sólidos solúveis totais (SS), acidez total titulável (ATT) e *ratio*), em suas condições comerciais, quando comparados com os valores de referência determinados por Pio et al. (2005), indicando que os frutos de lima ácida Tahiti, laranja Pêra e tangor Murcott, após o tratamento com o bioproduto, têm potencial para comercialização (Tabelas 18-34).

Tabela 18. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* na porcentagem de rendimento médio de suco de lima ácida Tahiti.

Tratamentos	Rendimento médio do suco (%)
Testemunha	47,30 b ⁽¹⁾
Imazalil	55,10 a
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	53,04 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	54,14 a
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	55,65 a
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	53,89 ab

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.
Desvio Padrão = 6,33. CV (%) =11,91

Tabela 19. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* no teor de sólidos solúveis totais (°Brix) em lima ácida Tahiti.

Tratamentos	°Brix
Testemunha	8,46 a ⁽¹⁾
Imazalil	8,34 a
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	8,34 a
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	8,30 a
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	8,40 a
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	8,46 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.
Desvio Padrão = 0,23. CV (%) =2,77

Tabela 20. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* no do teor de sólidos solúveis totais (°Brix), após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos.

Tempo de armazenamento (dias)	°Brix
1	8,17 b ⁽¹⁾
14	8,50 a
21	8,55 a
28	8,55 a
35	8,11 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Desvio Padrão = 0,23. CV (%) = 2,77

Tabela 21. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100mL de amostra) em frutos de lima ácida Tahiti.

Tratamentos	g de ácido cítrico/100mL de amostra
Testemunha	6,41 b ⁽¹⁾
Imazalil	6,90 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	6,46 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	6,72 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	6,83 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	6,99 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.

Desvio Padrão = 0,52. CV (%) = 7,78

Tabela 22. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de acidez total titulável (ATT) de lima ácida Tahiti, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos.

Tempo de armazenamento (dias)	g de ácido cítrico/100mL de amostra
1	6,19 c ⁽¹⁾
14	6,64 bc
21	7,54 a
28	7,07 ab
35	6,16 c

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Desvio Padrão = 0,52. CV (%) = 7,78

Tabela 23. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável) em frutos de lima ácida Tahiti.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	1	14	21	28	35
Testemunha	1,33 aB	1,56 aA ⁽¹⁾	1,23 aB	1,23 aB	1,30 aB
Imazalil	1,30 aAB	1,13 cBC	1,10 aC	1,16 aBC	1,36 aA
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	1,30 aA	1,43 abA	1,10 aB	1,33 aA	1,33 aA
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	1,30 aA	1,26 bcA	1,16 aA	1,23 aA	1,30 aA
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	1,36 Aa	1,16 cB	1,13 aB	1,20 aAB	1,30 aAB
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	1,30 Aa	1,20 cA	1,13 aA	1,16 aA	1,30 aA

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.

Desvio Padrão = 0,07. CV (%) =6,15

Tabela 24. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* na porcentagem de rendimento médio de suco de laranja Pêra.

Tratamentos	Rendimento médio do suco (%)
Testemunha	51,36 a ⁽¹⁾
Imazalil	53,41 a
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	53,23 a
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	54,09 a
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	54,39 a
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	53,64 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.

Desvio Padrão = 03,66. CV (%) =6,86

Tabela 25. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* no teor de sólidos solúveis totais (°Brix) em laranja Pêra.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	1	14	21	28	35
Testemunha	8,27 bAB	8,30 bAB ⁽¹⁾	7,80 abA	8,73 cBC	8,93 cC
Imazalil	7,97 abAB	8,00 abAB	7,53 aA	8,00 abAB	8,07 abB
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	7,83 abAB	7,87 abAB	7,37 aA	7,73 aAB	7,97 aB
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	7,57 aA	7,73 aAB	8,20 bBC	8,30 bcB	7,97 aABC
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	7,87 abAB	7,60 aA	8,17 bBC	8,27 abcBC	8,60 bcC
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	7,90 abABC	7,50 aA	7,73 abAB	8,37 bcC	8,07 abBC

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana. Desvio Padrão = 0,23. CV (%) =2,89

Tabela 26. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100mL de amostra) em frutos de lima ácida Tahiti.

Tratamentos	g de ácido cítrico/100mL de amostra
Testemunha	0,79 b ⁽¹⁾
Imazalil	0,70 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	0,69 a
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	0,68 a
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	0,71 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	0,69 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.
Desvio Padrão = 0,06. CV (%) =9,22

Tabela 27. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de acidez total titulável (ATT) de lima ácida Tahiti, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos.

Tempo de armazenamento (dias)	g de ácido cítrico/100mL de amostra
1	0,68 a ⁽¹⁾
14	0,73 a
21	0,68 a
28	0,69 a
35	0,74 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).
Desvio Padrão = 0,06. CV (%) =9,22

Tabela 28. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de “Ratio” em frutos de laranja Pêra.

Tratamentos	“Ratio”
Testemunha	11,07 a ⁽¹⁾
Imazalil	11,41 a
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	11,33 a
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	11,97 a
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	11,47 a
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	11,55 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.
Desvio Padrão = 1,00. CV (%) =8,79

Tabela 29. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de “Ratio” de laranja Pêra, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos.

Tempo de armazenamento (dias)	“Ratio”
1	11,66 ab ⁽¹⁾
14	10,82 a
21	11,52 ab
28	11,96 b
35	11,39 ab

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Desvio Padrão = 1,00. CV (%) = 8,79

Tabela 30. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* na porcentagem de rendimento médio de suco de tangerina Murcott.

Tratamentos	Rendimento médio do suco (%)
Testemunha	46,24 ab ⁽¹⁾
Imazalil	48,46 a
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	47,48 a
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	46,24 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	42,68 b
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	47,93 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.

Desvio Padrão = 3,36. CV (%) = 7,23

Tabela 31. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* no teor de sólidos solúveis totais (°Brix) de tangerina Murcott.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)				
	1	14	21	28	35
Testemunha	13,60 abA	13,40 aA ⁽¹⁾	13,13 abA	12,17 bcdA	13,08 aA
Imazalil	13,93 abA	13,40 aA	14,10 aA	13,53 abA	13,74 aA
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	12,13 bAB	12,33 aAB	13,40 abA	11,27 cdB	12,28 aAB
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	14,07 Aa	13,87 aA	14,03 aA	13,03 abcA	13,75 aA
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	14,20 Aa	13,97 aA	11,73 bB	10,87 dB	12,69 aAB
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	13,70 abA	13,77 aA	14,10 aA	14,27 aA	13,96 aA

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.

Desvio Padrão = 0,80. CV (%) = 6,06

Tabela 32. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100mL de amostra) em frutos de tangerina Murcott.

Tratamentos	g de ácido cítrico/100mL de amostra
Testemunha	0,69 b ⁽¹⁾
Imazalil	0,73 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	0,72 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	0,74 a
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	0,73 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	0,73 ab

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.
Desvio Padrão = 0,05. CV (%) =7,06

Tabela 33. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de acidez total titulável (ATT) de tangerina Murcott, após o tempo de armazenamento (em dias) dos frutos.

Tempo de armazenamento (dias)	g de ácido cítrico/100mL de amostra
1	0,75 a ⁽¹⁾
14	0,70 b
21	0,74 ab
28	0,70 b
35	0,72 ab

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).
Desvio Padrão = 0,05. CV (%) =7,06

Tabela 34. Efeito da aplicação do produto formulado à base de *A. pullulans* nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável) em frutos tangerina Murcott.

Tratamentos	“Ratio”
Testemunha	19,11 a ⁽¹⁾
Imazalil	19,01 ab
G (20%) + GX (5g/L) a 5% ⁽²⁾	17,23 c
G (20%) + GX (5g/L) a 10%	18,57 abc
G (20%) + GX (5g/L) a 15%	17,37 bc
G (20%) + GX (5g/L) a 20%	19,33 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ G=Glicerol, GX= Goma Xantana.
Desvio Padrão = 1,55. CV (%) =8,43

5. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, com o isolado *A. pullulans*-ACBL-77, foi demonstrado a eficiência de controle da podridão azeda em frutos de laranja Pêra e os possíveis mecanismos de ação envolvidos no biocontrole (Ferraz et al., 2016; Klein e Kupper, 2018; Moura et al., 2021). Compreender os mecanismos de ação de um agente de controle biológico é um dos requisitos para o desenvolvimento de uma formulação à base de antagonistas (Droby et al., 2016).

Vários fatores devem ser considerados para a confecção de um bioproduto, tais como: a biologia específica de cada microrganismo; a capacidade do isolado de sobreviver e manter a sua atividade antagônica; durante o processo de formulação, e sua estabilização.

Neste estudo, inicialmente, foi avaliada a composição de diferentes meios de cultivo da levedura ACBL-77, visando obter produção de células viáveis, maior quantidade de biomassa e produção de biofilme pelo antagonista. Para alguns autores, a escolha de um meio de cultura apropriado para o desenvolvimento de grandes quantidades de biomassa microbiana é uma questão primordial quando se leva em consideração os custos de produção e a garantia de se obter número necessário de células viáveis (Bashan et al., 2014; Lobo et al., 2019). Os dados obtidos no respectivo trabalho mostraram que o meio líquido YEPD favoreceu a produção de células viáveis, maior quantidade de biomassa e favoreceu a produção de biofilme pela levedura.

Segundo Droby et al. (2009) a formação de biofilme pelo microrganismo favorece a aderência às superfícies, aumentando a sua resistência às tensões. Reforçado por outros autores como, um forte mecanismo de biocontrole, através de sua capacidade em colonizar as lesões dos frutos (Spadaro e Gullino, 2004, Klein e Kupper, 2018; Perez et al., 2019 e Wang et al., 2020).

Ao se estudar a adição de glicerol, como um agente de preservação da levedura nas formulações, verificou-se que as maiores concentrações de Glicerol (40 e 60%) afetaram de forma negativa a sobrevivência da célula de *A. pullulans*, principalmente, quando os produtos foram armazenados em temperatura mais alta (25 °C).

O glicerol, além de ser uma fonte de carbono para os microrganismos, possui ação protetora às células (Stamenković et al., 2018; Vassilev et al., 2020). No entanto, concentrações acima de 20% de glicerol pode ser toxica aos organismos afetando a sua sobrevivência, mesmo em baixas temperaturas (Sola et al., 2012).

Dentre as nove formulações estudadas, neste estudo, a que manteve a maior quantidade de células viáveis da levedura até o sexto mês de armazenamento foi a formulação contendo a menor concentração de Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L), porém, quando o produto foi armazenado à 4 °C. De forma geral a temperatura baixa de armazenamento teve uma forte influência na viabilidade das células de *A. pulullans*-ACBL-77 na formulação líquida. Corroborando com os resultados obtidos no respectivo estudo, Abadias et al. (2003) relataram que o armazenamento das formulações líquidas, à base de *Candida sake* CPA-1, a 25°C reduziu a viabilidade das células da levedura em poucos dias. Por outro lado, formulações líquidas armazenadas a 4°C mantiveram a viabilidade de *C. sake* por vários meses e apresentaram um desempenho tão bom quanto células frescas da levedura foram usadas no controle do bolor azul em maçãs. Carbó et al (2017) ao estudarem uma formulação seca à base de células de *C. sake*, através do processo de secagem em leito fluidizado, obtiveram os melhores resultados a 4°C do que a 25° C e a viabilidade permaneceu estável por 12 meses de armazenamento. Segundo os autores, as formulações inibiram, tanto a incidência quanto a severidade, em 52 e 72%, respectivamente, do bolor azul em maçãs, não apresentando diferença significativa entre as aplicações contendo a formulação ou, as células frescas da levedura. Kinay e Yildiz (2008), ao estudarem 12 formulações experimentais, com duas leveduras diferentes (*Metschnikowia pulcherrima* e *Pichia guilliermondii*), verificaram que todas as formulações armazenadas à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ tiveram uma vida útil mais longa do que aquelas armazenadas a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

De acordo com Mejri et al. (2013), em temperaturas baixas, vários processos são evitados ou, atrasados, como por exemplo: a divisão celular microbiana e a taxa metabólica, o esgotamento de nutrientes, o acúmulo de metabólitos tóxicos e a perda de umidade, favorecendo dessa forma o armazenamento do formulado a longo prazo. Para Melin et al. (2007), a baixa

sobrevivência das células de antagonistas em temperaturas elevadas resulta em desvantagens na confecção de uma formulação líquida.

Em estudos realizados por Moura et al. (2021) com o mesmo isolado de levedura (ACBL-77), os autores demonstraram a atividade *killer* contra *G. citri-aurantii* e *P. digitatum* e, relataram que, a proteína *killer* produzida pela levedura pertence à família das ubiquitinas. Nesse estudo foi possível afirmar que a atividade *killer* do isolado ACBL-77 se manteve nos produtos formulados avaliados até seis meses e, nas duas condições de armazenamento (4 e 25 °C).

Existem na literatura vários trabalhos empregando leveduras *killer* no controle de vários fitopatógenos (Zhang et al., 2012; Grzegorzczuk et al., 2017). Aloui et al. (2015) trabalhando com a levedura *killer Wickerhamomyces anomalus* verificaram que ao utilizarem dois filmes de revestimento à base de alginato de sódio - NaAlg (2%, w/v) e goma de alfarroba - LBG (1%, w/v), a formulação manteve mais de 85% da população inicial da levedura, após 21 dias e inibiram completamente o crescimento de *P. digitatum in vitro*.

Castro (2020) verificou que o isolado *A. pullulans*-ACBL-77 produz sideróforos e este mecanismo pode estar relacionado em sua ação contra *P. digitatum*. Wang et al. (2020) ao estudarem o isolado *Metschnikowia citriensis* contra *G. citri-aurantii* verificaram que a levedura tem a capacidade de esgotar o ferro e inibir o crescimento do patógeno *in vitro* e *in vivo*. Os resultados apresentados no respectivo trabalho mostraram que as formulações avaliadas foram capazes de não só manter a produção de sideróforos, como também, tiveram aumentado a sua produção após seis meses de armazenamento.

O formulado à base de *A. pullulans*- ACBL-77 inibiu, significativamente, o tamanho da colônia de *G. citri-aurantii*, porém, não afetou o desenvolvimento de *P. digitatum*. Por outro lado, o bioproduto inibiu, significativamente, a germinação de conídios dos fitopatógenos. Dados de literatura têm mostrado o efeito ou, não de leveduras, quanto à produção de substâncias antifúngicas. Liu et al. (2019) relataram que metabólitos extracelulares de *Metschnikowia citriensis* FL01 não apresentaram atividade antifúngica contra *P. digitatum* e tiveram um efeito inibitório fraco no desenvolvimento das colônias de *P. italicum*. Dados contrários foram relatados por Wang et al. (2020), de acordo com os autores, células de *M. citriensis* apresentaram um efeito inibitório, em torno de 93%, no crescimento de *G. citri-aurantii*. Com relação do efeito de leveduras sobre a germinação, Perez

et al. (2019) verificaram que as leveduras *Clavispora lusitaniae* 146 e *Pichia fermentans* 27 inibiram em 90% a germinação de *P. digitatum*, enquanto que, o isolado *C. catenulata* M1.4 apresentou 30% de inibição. Wang et al. (2020) relataram que a germinação de conídios de *G. citri-aurantii* foi, significativamente, inibida por *M. citriensis*, quando comparado com os tratamentos controle, com taxas médias de germinação de 0,77%, 0,88%, 1,32% e 1,55%, após 10, 24, 36 e 60 horas de incubação, respectivamente.

O produto formulado, independente da concentração testada, controlou preventiva e curativamente a podridão azeda em frutos de lima ácida Tahiti e de laranja Pêra. Por outro lado, o controle do bolor verde só foi atingido em frutos de laranja Pêra e, quando o produto foi aplicado de forma preventiva. A eficiência de controle foi maior quando os frutos foram armazenados em câmara fria. Em frutos de tangor Murcott, aplicações preventivas de células de levedura ACBL-77 foram mais eficientes no controle da podridão azeda e do bolor verde do que os tratamentos com o bioproduto.

Resultados similares foram obtidos por Mounir et al. (2007) ao estudarem uma formulação líquida à base de *A. pullulans* – Ach 1-1 Os autores verificaram que o formulado obteve um controle de 89% contra *P. expansum*, em frutos de maçã. Torres et al. (2003) ao estudarem diferentes substâncias protetoras (Trealose (1%), Polietilenoglicol (5 e 1%) e Glicerol (5%)) em suas formulações à base de *Candida sake*, verificaram inibição, significativa, no desenvolvimento do bolor azul (*P. expansum*) em maçã, reduzindo a severidade e a incidência da doença. Da mesma forma, os revestimentos NaAlg e LBG enriquecidos com levedura *W. anomalus* foram eficazes na redução da perda de peso e manutenção da firmeza de laranjas 'Valência' durante o armazenamento, reduzindo o bolor verde nos frutos inoculados em mais de 73% após 13 dias (Aloui et al., 2015). Segundo Wagner et al. (2013) os produtos comerciais Blossom Protect™ e BoniProtect®, contendo cepas de *A. pullulans* e registrados na Alemanha, são utilizados para controle de *Monilia fructigena*, *P. expansum* e *Botrytis cinerea* em maçã.

Janisiewicz e Jeffers (1997) descobriram que uma formulação pó molhável utilizando a cepa ESC-11-*P. Syringae* (BioSave 11 WP), bem como as células frescas do isolado, controlaram *P. expansum* e *Botrytis cinerea* em maçãs. No mesmo estudo, a formulação ESC-10 WP (10 WP; BioSave) reduziu,

significativamente, a incidência das doenças, mas de forma menos eficaz do que as células frescas.

De um modo geral, no respectivo estudo, verificou-se que as células de *A. pullulans*-ACBL-77 controlam eficientemente a podridão azeda e o bolor verde, quando aplicadas preventivamente sobre os frutos cítricos de diferentes variedades. Estes resultados corroboram, em parte, com os encontrados por outros autores. Díaz et al. (2020) ao imergirem frutos cítricos, durante 15 segundos, em células da levedura *Clavispora lusitaniae*-146 ($3,06 \times 10^8$ células/ml), obtiveram alto nível de proteção em laranjas (93%), limão (91%) e tangerina (88%) contra o bolor verde, quando a levedura foi aplicada de forma preventiva. Perez et al. (2017) ao estudarem diferentes cepas de levedura *killer*, verificaram que a levedura 27 (*Pichia*) apresentou 93,6% de controle do bolor verde nos frutos de limão tratados preventivamente e armazenados a 24°C, com diminuição da eficiência de controle (68,33%) nos frutos armazenados a 7°C. Por outro lado, no respectivo trabalho, os frutos de limão ao serem tratados, preventivamente, com células da levedura e, posteriormente, armazenados a 25 e 10°C, obtiveram 85 e 81% de controle da doença, respectivamente, mantendo a eficiência de controle da levedura nas duas condições de armazenamento.

Esse estudo demonstrou que a formulação à base de *A. pullulans*-ACBL-77 foi eficiente para o controle da podridão azeda em frutos de laranja Pêra e Lima ácida Tahiti e do bolor verde, em frutos de laranja Pêra, mantendo as células da levedura viáveis em até 6 meses de armazenamento. Com base nesses resultados, é possível verificar a aplicação comercial deste bioproduto, durante o beneficiamento de frutos cítricos em *packing houses*. No entanto, algumas pesquisas adicionais devem ser realizadas de modo a se obter um produto com menor custo de produção e com maior facilidade de aplicação pelo produtor, quando se pretende o uso em grande escala; além da realização dos trâmites para a obtenção de registo do produto.

6. CONCLUSÕES

- a) O meio líquido à base de YEPD favoreceu as produções de células, de biomassa e de biofilme de *A. pullulans*- ACBL-77;
- b) A formulação à base de Glicerol (20%) + Goma Xantana (5g/L) + células da levedura (1×10^8 células/ml) proporcionou um período mais longo de sobrevivência da levedura e foi capaz de manter as suas atividades de antagonismo avaliadas (*killer* e produção de sideróforos):
- c) A temperatura de 4°C proporcionou maior vida-de-prateleira do formulado;
- d) O formulado à base de *A. pullulans*- ACBL-77 afetou o tamanho da colônia de *G. citri-aurantii*, e, a germinação de conídios de *G. citri-aurantii* e de *P. digitatum*;
- e) Células da levedura ACBL-77 e o produto formulado, independente da concentração testada controlaram, preventiva e curativamente, a podridão azeda em frutos de lima ácida Tahiti e de laranja Pêra;
- f) Aplicações preventivas de células de levedura ACBL-77 foram mais eficientes no controle do bolor verde, em frutos de lima ácida Tahiti, do que o produto formulado à base do microrganismo;
- g) Para frutos de laranja Pêra, as células da levedura e o produto formulado controlaram de forma preventiva o bolor verde e, a eficiência de controle foi maior quando os frutos foram armazenados em câmara fria;
- h) Em frutos de tangor Murcott, aplicações preventivas de células de levedura ACBL-77 foram mais eficientes no controle da podridão azeda e do bolor verde;
- i) O produto formulado, independente das concentrações avaliadas, não afetaram os parâmetros de qualidade dos frutos de lima ácida Tahiti, laranja Pêra e tangor Murcott.

7. REFERÊNCIAS

Abadias M, Usall J, Teixidó N, Viñas I (2003) Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. **Phytopathology** 93:436–442. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.436>).

Adikaram NKB, Joyce DC, Terry LA (2002) Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. **Australasian Plant Pathology** 31:223–229. <https://doi.org/10.1071/AP02017>

Aguirre-Güitrón L, Calderón-Santoyo M, Bautista-Rosales PU, Ragazzo-Sánchez JA (2019) Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). **Food Science and Technology** 113:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108271>.

Alcântara MR (2017) **A Competitividade na produção de laranja**. 98f. Monografia (Graduação em Engenharia Agrícola) – Unicamp – Campinas.

Aloui H, Licciardello F, Khwaldia K, Hamdi M, Restuccia C (2015) Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **Int. International Journal of Food Microbiology** 200:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.015>

Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) **AgroEstat - sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Jaboticabal: FCAV/UNESP. 396p

Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil** 378:1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

Bazioli J, Belinato J, Costa J, Akiyama D, Pontes J, Kupper K, Augusto F, Carvalho J, Fill T (2019) Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. **Toxins** 11:460. <https://doi.org/10.3390/toxins11080460>

Bencheqroun SK, Bajji M, Massart S, Labhilili M, Jaafari SEI, Jijakli MH, (2007) In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. **Postharvest Biology and Technology** 46:128–135. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.005>

Brown GE (2003) **Sour rot. Causal organism and disease cycle**. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Science Extension Service Fact Sheet. p. 137.

CAGED - Cadastro Geral de Empregados e Desempregados. Vínculos empregatícios relacionados à citricultura. Disponível em: < <http://pdet.mte.gov.br/novo-caged> > Acesso em: 01 de out. 2021.

Calvente V, De Orellano ME, Sansone G, Benuzzi D, Sanz De Tosetti MI (2001) Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 26:226–229. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000117>

Carbó A, Torres R, Usall J, Fons E, Teixidó N (2017) Dry formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 using fluidised bed drying to control the main postharvest diseases on fruits. **Journal Science Food Agricultura** 9:3691–3698. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8229>.

Carmona-Hernandez S, Reyes-Pérez JJ, Chiquito-Contreras RG, Rincon-Enriquez G, Cerdan-Cabrera CR, Hernandez-Montiel LG (2019) Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. **Agronomy** 9:121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>

Castro N (2020) **Busca de uma estratégia de controle para bolores em frutos de laranja**. 48 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária), Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/193125>>.

Chanchaichaovivat A, Panijpan B, Ruenwongsa P (2008) Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. **Biological Control** 47:207–215. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.018>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra Brasileira de laranja. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-laranja> > Acesso em: 01 de out. 2021.

Cook RJ, Backer KF (1983) **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS, 539 p.

Cunha T, Ferraz LP, Sousa-Júnior GS, Kupper KC (2020) The action of yeast strains as biocontrol agents against *Penicillium digitatum* in Lima sweet oranges. **Citrus Research & Technology** 41:1054. <https://doi.org/10.4322/crt.1881>.

Cunha T, Ferraz LP, Wehr PP, Kupper KC (2018) Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology** 276:20-27. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.019>).

Cunha, Tatiane da (2013) **Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária), Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94878>>.

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society** 57:363-IN2. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(71\)80050-5](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(71)80050-5)

Di Francesco A, Martini C, Mari M (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? **European Journal of Plant Pathology** 145:711–717. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0867-0>

Di Francesco A, Roberti R, Martini C, Baraldi E, Mari M (2015) Activities of *Aureobasidium pullulans* cell filtrates against *Monilinia laxa* of peaches. **Microbiological Research** 181:61–67. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.003>

Di Francesco A, Ugolini L, D'Aquino S, Pagnotta E, Mari M (2017) Biocontrol of *Monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: Insights on competition for nutrients and space. **International Journal of Food Microbiology** 248:32-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.007>

Díaz MA, Pereyra MM, Picón-Montenegro E, Meinhardt F, Dib JR (2020) Killer yeasts for the biological control of postharvest fungal crop diseases. **Microorganisms** 8:1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111680>

Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt EE, Porat R (2002) Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology** 92:393–399. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.393>

Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, Wilson C (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology** 52:137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>

Droby S, Wisniewski M, Teixidó N, Spadaro D, Jijakli MH (2016) The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. **Postharvest Biology and Technology** 122:22-29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>

Dukare AS, Paul S, Nambi VE, Gupta RK, Singh R, Sharma K, Vishwakarma RK (2018) Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 59:1498-1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>

Erasmus A, Lennox CL, Korsten L, Lesar K, Fourie PH (2015) Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. **Postharvest Biology and Technology** 107:66–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.008>

FAO. Fruit Production. Disponível em: <
<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA> > Acesso em 01 de outubro de 2019.

Feitoza FS, Gasparotto AMS (2020) Estudo Sobre a Produção Nacional De Suco De Laranja Concentrado. **Revista Interface Tecnológica** 17:625–634. <https://doi.org/10.31510/infa.v17i1.768>

Ferraz LP, Cunha Tda, da Silva AC, Kupper KC (2016) Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research** 188–189:72–79. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.012>

Filonow AB (1998) Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology** 8:243–256. <https://doi.org/10.1080/09583159830315>

Fischer IH, Toffano L, Lourenço AS, Amorim L (2007) Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de “packinghouse”. **Fitopatologia Brasileira** 32:304–310. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000400004>

Grzegorzczak M, Żarowska B, Restuccia C, Cirvilleri G (2017) Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. **Food Microbiology** 61:93–101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.005>

Gusella G, Fiorenza A, Aiello D, Polizzi G (2021) Unusual Stylar-End Breakdown and Sour Rot on Key Lime (*Citrus aurantiifolia*) in Pre-Harvest Condition in Italy. **Plants** 10(5):989. <https://doi.org/10.3390/plants10050989>

Hasse G. (1987) **A Laranja no Brasil**. São Paulo: Duprat & lobe p. 296.

IBGE - Produção Agrícola - Lavoura Permanente. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/12046>> Acesso em: 01 de out. 2021.

Ippolito A, El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski ME (2000) Control of Postharvest Decay of Apple Fruit with *Candida saitoana* and Induction of Defense Responses. **Postharvest Biology and Technology** 19:265–272. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.344>

Ippolito A, Schena L, Pentimone I, Nigro F (2005) Control of post-harvest rots of sweet cherries by pre-and post-harvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology** 36(3):245–252. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.02.007>

Ismail M, Zhang J (2004) Postharvest citrus diseases and their control. **Outlooks on pest management** 15:29–35. <https://doi.org/10.1564/15feb12>

Janisiewicz WJ, Jeffers SN (1997) Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. **Crop Protection** 16:629–633. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(97\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(97)00048-3)

Kalaki RB, Neves MF (2017) **Plano estratégico para o sistema agroindustrial cítrica brasileiro**. Gestão & Produção, 24:2:338–354.

Kara M, Soylyu EM (2020) Assessment of glucosinolate-derived isothiocyanates as potential natural antifungal compounds against citrus sour rot disease agent *Geotrichum citri-aurantii*. **Journal of Phytopathology** 00:1–11. <https://doi.org/10.1111/jph.12889>

Kinay P, Yildiz M (2008) The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. **Biological Control** 45:433–440. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.001>

Klein MN, Kupper KC (2018) Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology** 69:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.008>

Konstantinos P, Matthaios MM, Joaquín HH, Vasileios Z (2019) Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). **Trends in Food Science & Technology** 86:479–491. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053>

Kupper KC, Ferraz LP, da Silva AC, Coletta Filho HD (2016) **Doenças dos citros**. Informe Agropecuário (Belo Horizonte) 37:36-53. ISSN: 0100-3364.

Kurtzman CP, Droby S (2001) *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. **Systematic and Applied Microbiology** 24:395–399. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00045>

Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S, Liu Y (2013) Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology** 167:153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>

Liu X, Wang J, Gou P, Mao C, Zhu ZR, Li H (2007) In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. **International Journal of Food Microbiology** 119:223–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.054>

Liu X, Wang LP, Li YC, Li HY, Yu T, Zheng XD (2009) Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. **Journal of Applied Microbiology** 107:1450–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04328.x>

Liu Y, Yao S, Deng L, Ming J, Zeng K (2019) Different mechanisms of action of isolated epiphytic yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. Postharvest **Postharvest Biology and Technology** 152:100–110. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.002>

Lobo CB, Tomás MSJ, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME (2019) Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiological research** 219:12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>

Lv X, Zhao S, Ning Z, Zeng H, Shu Y, Tao O, Xiao C, Lu C, Liu Y (2015) Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. **Chemistry Central journal** 9:68. <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0145-9>

Ma ZC, Chi Z, Geng Q, Zhang F, Chi ZM (2012) Disruption of the pullulan synthetase gene in siderophore-producing *Aureobasidium pullulans* enhances siderophore production and simplifies siderophore extraction. **Process Biochemistry** 47:1807–1812. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.024>

MAPA – Ministério da Agricultura e Meio Ambiente. Registra recorde de 95 defensivos de controle biológico em 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020> > Acesso em: 01 out. de 2021

Medina A, Mohale S, Samsudin NIP, Rodriguez-Sixtos A, Rodriguez A, Magan N (2017) Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action. **Current Opinion in Food Science** 17:41-48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.008>

Mejri D, Gamalero E, Souissi T (2013) Formulation development of the deleterious rhizobacterium *Pseudomonas trivialis* X33d for biocontrol of brome (*Bromus diandrus*) in durum wheat. **Journal Applied Microbiology** 114:219–228. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12036>.

Melin P, Håkansson S, Schnürer J (2007) Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **Applied Microbiology and Biotechnology** 73:1008–1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0552-x>

Morandi MAB, Bettiol W (2009) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente 341p.

Moretto C, Cervantes ALL, Batista Filho A, Kupper KC (2014) Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. **Scientia Horticulturae** 165:433–438. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.019>

Mounir R, Durieux A, Bodo E, Allard C, Simon JP, Achbani EH, El-Jaafari S, Douira A, Jijakli MH (2007) Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. **Biotechnology Letters** 29:553–559. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9269-2>

Moura VS, Moretto RK, Machado BI, Kupper KC (2019) Alternativas de controle de doenças de pós-colheita em citros. **Citrus Research & Technology** 40:1044. <https://doi.org/10.4322/crt.17819>

Moura VS, Pollettini FL, Ferraz LP, Mazzi MV, Kupper KC (2021) Purification of a killer toxin from *Aureobasidium pullulans* for the biocontrol of phytopathogens. **Journal Basic Microbiology** 61:77–87. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000164>

Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Pereira FC, Kalaki RB (2010) **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto, Markestrat p.137.

Nunes, CA (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology** 133:181-196. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7>.

O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiples, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology** 28(3):449-461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>

Patiño-Vera M, Jiménez B, Balderas K, Ortiz M, Allende R, Carrillo A, Galindo E (2005) Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. **Journal of Applied Microbiology** 99:540–550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02646.x>

Perez MF, Díaz MA, Pereyra MM, Córdoba JM, Isas AS, Sepúlveda M, Ramallo J, Dib JR (2019) Biocontrol features of *Clavispora lusitaniae* against *Penicillium digitatum* on lemons. **Postharvest Biology and Technology** 155:57-64. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.012>.

Perez MF, Perez Ibarreche J, Isas AS, Sepulveda M, Ramallo J, Dib JR (2017) Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control** 115:135–140. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.10.006>

Pio RM, Figueiredo JO, Stuchi ES, Cardoso SAB (2005) Variedades copas. In: Mattos DJR, de Negri JD, Pio RM, Pompeu JJR (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC e Fundag, p.37-60.

Qian X, Yang Q, Zhang Q, Abdelhai MH, Dhanasekaran S, Serwah B, Gu N, Zhang H (2019) Elucidation of the initial growth process and the infection mechanism of *Penicillium digitatum* on postharvest citrus (*Citrus reticulata* Blanco). **Microorganisms** 7(11):485. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110485>

Reed JB, Hendrix DL, Hendrix CM (1986) Quality control manual for citrus processing plants. Book I, Intercit Inc. Safety Harbor, Fla., 250p

Shaner G, Finney RE (1977) The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology** 77:1051. <https://doi.org/10.1094/phyto-67-1051>

Simmons P, Tobin JM, Singleton, I (1995) Considerations on the use of commercially available yeast biomass for the treatment of metal-containing effluents. **Journal of Industrial Microbiology** 14:240–246. <https://doi.org/10.1007/BF01569934>

Sola MC, de Oliveira AP, Feiste JC, Rezende CSM (2012) Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, 8:1398.

Spadaro D, Droby S (2016) Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology** 47:39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

Spadaro D, Gullino ML (2004) State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology** 91(2):185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5)

Stamenković S, Beškoski V, Karabegović I, Lazić M, Nikolić N (2018) Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. **Spanish Journal of Agricultural Research** 16(1). <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-12117>

Torres, R., Usall, J., Teixidó, N., Abadías, M., Viñas, I., 2003. Liquid formulation of the biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. **Journal of Applied Microbiology** 94:330–339. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01843.x>

USDA, 2020. All countries production orange juice. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>> Acesso em: 01 de out. 2021.

Vassilev N, Vassileva M, Martos V, Garcia del Moral LF, Kowalska J, Tylkowski B, Malusá E (2020). Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. **Frontiers in plant science** 11:270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

Véras SM (2014). Doenças de plantas: controles convencional e alternativo. 1. ed. Manaus: EDUA, 1000:70p.

Vidal MF (2019) **CITRICULTURA NA ÁREA DE ATUAÇÃO DO BNB**. Caderno Setorial ETENE, 10 p. (Banco do Nordeste, Ano 4 N° 107).

Wagner A, Hetman B, Kopacki M, Jamiolkowska A, Krawiec P, Lipa T (2013) Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. **ACTA Agrobotanica** 66:77–88. <https://doi.org/10.5586/aa.2013.009>

Wang K, Zheng X, Zhang X, Zhao L, Yang Q, Boateng N, Ahima J, Liu J, Zhang H (2019) Comparative transcriptomic analysis of the interaction between *Penicillium expansum* and apple fruit (*Malus pumila* Mill.) during early stages of infection. **Microorganisms** 7(11):495. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110495>

Wang M, Sun X, Zhu C, Xu Q, Ruan R, Yu D, Li H (2015) PdbrlA, PdabaA and PdwetA control distinct stages of conidiogenesis in *Penicillium digitatum*. **Research in microbiology** 166(1):56–65. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.003>

Wang S, Ruan C, Yi L, Deng L, Yao S, Zeng K (2020) Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichum citri-aurantii* causing sour rot of postharvest citrus fruit. **Food microbiology** 87:103375. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103375>

Wang WL, Chi ZM, Chi Z, Li J, Wang XH (2009) Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. **Bioresource Technology** 100:2639–2641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.010>

Yaghmour MA, Bostock RM, Morgan DP, Michailides TJ (2012) Biology and sources of inoculum of *Geotrichum candidum* causing sour rot of peach and nectarine fruit in California. **Plant Disease** 96:204–210. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0391>

Yang Q, Qian X, Dhanasekaran S, Boateng N, Yan X, Zhu H, He F, Zhang H (2019) Study on the infection mechanism of *Penicillium digitatum* on postharvest citrus (*Citrus Reticulata* Blanco) based on transcriptomics. **Microorganisms** 7(12):672. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120672>

Zajc J, Černoša A, Aless, Francesco R, Castoria R, Curtis FD, Lima G, Badri H, Jijakli H, Ippolito A, Gostinčar C, Zalar P, Gunde-Cimerman N, Janisiewicz WJ (2020) Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolates selected as biocontrol agents against fruit decay pathogens. **Fungal Genomics & Biology** 10:161. <https://doi.org/10.35248/2165-8056.20.10.163>

Zhang D, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML (2010) Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. **Biological Control** 54:172–180. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.003>

Zhang D, Spadaro D, Valente S, Garibaldi A, Gullino ML (2012) Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. **International Journal of Food Microbiology** 153:453–464. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.016>

Zhang X, Li B, Zhang Z, Chen Y, Tian S (2020) Antagonistic Yeasts: A Promising Alternative to Chemical Fungicides for Controlling Postharvest Decay of Fruit. **Journal of Fungi** 6:158. <https://doi.org/10.3390/jof6030158>

Zhimo VY, Bhutia DD, Saha J (2016) Biological control of post-harvest fruit diseases using antagonistic yeasts in India. **Journal of Plant Pathology** 98:275–283. <https://www.jstor.org/stable/44280446>

Zhu J, Xie Q, Li H (2006) Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE A** 7:362–365. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.AS0362>