

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BUSCA DE UMA ESTRATÉGIA DE CONTROLE PARA
BOLORES EM FRUTOS DE LARANJA**

Natália de Castro

Engenheira Agrônoma

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BUSCA DE UMA ESTRATÉGIA DE CONTROLE PARA
BOLORES EM FRUTOS DE LARANJA**

Natália de Castro

Orientadora: Profa. Dra. Katia Cristina Kupper

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2020

C355b	Castro, Natália de Busca de uma estratégia de controle para bolores em frutos de laranja / Natália de Castro. -- Jaboticabal, 2020 48 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Katia Cristina Kupper 1. Microbiologia. 2. Fitopatologia. 3. Leveduras (Fungos). 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BUSCA DE UMA ESTRATÉGIA DE CONTROLE PARA BOLORES EM FRUTOS DE LARANJA

AUTORA: NATÁLIA DE CASTRO

ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

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

Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agronômico de Campinas - Cordeirópolis/SP

Profa. Dra. PATRÍCIA CIA
Centro de Mecanização e Automação Agrícola-IAC / Campinas/SP
(VIDEOCONFERÊNCIA)

P/

Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ
Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - Unesp - Rio Claro
(VIDEOCONFERÊNCIA)

P/

Jaboticabal, 24 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Natália de Castro – Nascida em 18 de novembro de 1990, em Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Filha de Neusa Maria Tofano de Castro e Luis Henrique Thomazelli de Castro. Iniciou sua graduação em Engenharia Agrônômica em 2013 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo e concluiu o bacharelado em dezembro de 2017. Durante a graduação desenvolveu seu projeto para o trabalho de conclusão de curso no departamento de Solos e Adubos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, sob a orientação do Professor Doutor Renato de Mello Prado. Estagiou na empresa Agrimont Ltda., em Monte Alto, São Paulo e na Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável (CDRS) em Jaboticabal, São Paulo. Em março de 2018 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, como bolsista CAPES, realizando seu projeto de mestrado sob a Orientação da Professora Doutora Katia Cristina Kupper, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, São Paulo.

Epígrafe

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Dedico,

A minha mãe **Neusa** e ao meu pai **Luis**, pelo amor, carinho, dedicação, companheirismo e por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e dando suporte em todas as fases de minha vida. Sempre serei grata a tudo que fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, saúde, proteção, família e todas as oportunidades que tive na vida.

Aos meus pais que sempre estiveram comigo, me apoiando em todos os momentos, por sempre me incentivarem a ir atrás dos meus objetivos com dedicação, responsabilidade e honestidade. Obrigada, sem vocês isso não seria possível.

À Katia Cristina Kupper, por ter me aceitado em ser sua orientada, pelo auxílio e orientação durante a pós-graduação, incentivo em sempre buscar um bom trabalho, pelos conselhos e amizade. Obrigada pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao meu irmão Victor, pelo companheirismo, amizade e carinho que sempre teve por mim.

Aos meus avós, *in memoriam*, Ebee, José e Romilda, pelo amor, carinho e por terem contribuído na minha criação.

A meu namorado Isaías, pela compreensão, amor, carinho, companheirismo, incentivo e por sempre acreditar em mim, nas muitas vezes que eu duvidei da minha capacidade.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), Câmpus de Jaboticabal e ao curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Agradeço aos companheiros do laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Álisson, Deborah, Fernanda, Lucas e Vanessa, pela amizade, trabalho em equipe, ajuda e ensinamentos.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira, por disponibilizar sua estrutura para que eu pudesse realizar este trabalho. A todos os funcionários do IAC em especial, Amélia, Anita, Cleber, Gomes, Isabel, Maria, Nadji, Nidelce, Queque, Rose, Valéria e Vivian, que de alguma forma me ajudaram durante este período.

Aos pesquisadores do IAC, Fernando e Maria Inês, que me ajudaram com frutos e materiais necessários para realizar alguns experimentos.

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

À Citrícola Lucato pela doação de frutos para meus experimentos.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, pelos ensinamentos.

Aos meus amigos de Araras, que me acolheram quando cheguei na cidade, me ajudaram inúmeras vezes e deixaram meus dias divertidos e menos solitários.

Ninguém consegue nada sozinho, todos vocês de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Citricultura brasileira.....	3
2.2. Doenças de pós-colheita em frutas Cítricos.....	3
2.2.1 Bolor verde	4
2.2.2 Bolor azul.....	5
2.3. Controle de bolores	5
2.4. Controle biológico de bolores	7
2.5.Sideróforos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1.Microrganismos.....	9
3.2. Estudo do Crescimento de <i>Aureobasidium pullulans</i>	10
3.3. Produção de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i>	10
3.4. Quantificação da produção de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i> em diferentes tempos de incubação.....	11
3.5. Avaliação da fonte de carbono e nitrogênio na produção de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i>	11
3.6. Produção de biomassa de <i>Aureobasidium pullulans</i> cultivado em diferentes meios de cultura.....	12
3.7. Interações <i>in vitro</i>	13
3.7.1. Avaliação da porcentagem de conídios germinados de <i>Penicillium italicum</i> e <i>Penicillium digitatum</i> , após interação com a levedura ou, do sideróforo produzido.....	13
3.7.2. Avaliação do crescimento micelial de <i>Penicillium italicum</i> e <i>Penicillium digitatum</i> , após cultivo em diferentes meios, acrescidos, ou não, de células de levedura ou de sideróforo.....	14
3.8. Interações <i>in vivo</i>	14

3.8.1. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> de <i>Aureobasidium pullulans</i> contra os patógenos <i>Penicillium italicum</i> e <i>Penicillium digitatum</i>	14
3.8.2. Efeito da combinação de <i>Aureobasidium pullulans</i> e do fungicida imazalil no controle de bolor azul e do bolor verde	16
3.9. Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Estudo do Crescimento de <i>Aureobasidium pullulans</i>	17
4.2. Produção de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i>	17
4.3. Quantificação da produção de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i> em diferentes tempos de incubação.....	18
4.4. Avaliação da fonte de carbono e nitrogênio na produção de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i>	19
4.5. Produção de biomassa de <i>Aureobasidium pullulans</i> cultivado em diferentes meios de cultura.....	21
4.6. Interações <i>in vitro</i>	22
4.6.1. Avaliação da porcentagem de conídios germinados de <i>Penicillium italicum</i> e <i>Penicillium digitatum</i> , após interação com a levedura ou, do seu sideróforo produzido.....	22
4.6.2. Avaliação do crescimento micelial de <i>Penicillium italicum</i> e <i>Penicillium digitatum</i> , após cultivo em diferentes meios, acrescidos, ou não, de células de levedura ou de sideróforo.....	23
4.7. Interações <i>in vivo</i>	25
4.7.1 Atividade antifúngica <i>in vivo</i> de <i>Aureobasidium pullulans</i> contra <i>Penicillium italicum</i> e <i>Penicillium digitatum</i>	25
4.7.1.1 Bolor azul.....	25
4.7.1.2 Bolor verde.....	29
4.7.2 Efeito da combinação de <i>Aureobasidium pullulans</i> e do fungicida imazalil no controle do bolor azul e do bolor verde.....	33
4.7.2.1 Bolor azul.....	33
4.7.2.2 Bolor verde.....	35
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	39

BUSCA DE UMA ESTRATÉGIA DE CONTROLE PARA BOLORES EM FRUTOS DE LARANJA

RESUMO – O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja e de frutas *in natura*, o que representam grande importância para a economia do país. O bolor azul e o bolor verde, causados pelos fungos *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, respectivamente, são as principais doenças que ocorrem na fase de pós-colheita da cultura, com perdas que chegam a 50% na fase de comercialização dos frutos. O controle dessas doenças é através de produtos químicos, como imazalil, no entanto, o uso frequente e indiscriminado desses produtos pode acarretar problemas ambientais e de saúde pública, além do surgimento de linhagens resistentes dos fitopatógenos a esses fungicidas. O uso de leveduras como agentes de biocontrole pode ser uma estratégia alternativa de controle a ser utilizada durante o beneficiamento dos frutos. Diante do exposto, esse estudo teve por objetivos verificar: (i) a produção e quantificação de sideróforos por *A. pullulans*-ACBL-77; (ii) o controle *in vitro* de *P. italicum* e *P. digitatum* por meio da levedura; (iii) o controle do bolor azul e do bolor verde em frutos de laranja pela levedura e, (iv) a combinação da aplicação de *A. pullulans* com menores doses de imazalil no controle das doenças. Pelos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que: *A. pullulans*-ACBL-77 produz sideróforos e sua produção foi aumentada com a adição de sacarose (2,5%) em meio de cultivo da levedura; o sideróforo, produzido pela levedura, pode ser um dos mecanismos de ação contra *Penicillium digitatum*, mas não tem ação antagônica contra *P. italicum*; a aplicação de forma curativa de suspensões da levedura apresentou potencial para controle do bolor azul; aplicações preventivas de células da levedura apresentaram controle sobre o bolor verde, porém, com baixa porcentagem de controle e, finalmente, a combinação de *A. pullulans* com menores doses do fungicida imazalil foi eficiente para o controle do bolor azul e do bolor verde, em frutos de laranja.

Palavras-chave: *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, sideróforo, *Citrus sinensis*

THE SEARCH FOR A STRATEGY TO CONTROL MOLD IN ORANGE FRUITS

Abstract – Brazil is the world's largest producer and exporter of orange juice and fresh fruit, which represents great importance for the country's economy. Blue mold and green mold, caused by the fungi *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*, respectively, are the main diseases that occur in the post-harvest phase of the crop, with losses reaching 50% in the commercialization phase of the fruits. The control of these diseases is through chemical products, such as imazalil, however, the frequent and indiscriminate use of these products can cause environmental and public health problems, in addition to the emergence of resistant strains of phytopathogens to these fungicides. The use of yeasts as biocontrol agents can be an alternative strategy to be used during fruit processing. Given the above, this study aimed to verify: (i) the production and quantification of siderophores by *A. pullulans*-ACBL-77; (ii) the in vitro control of *P. italicum* and *P. digitatum* using yeast; (iii) the control of blue mold and green mold in orange fruits by yeast and, (iv) the combination of the application of *A. pullulans* with lower doses of imazalil in the control of diseases. From the results obtained in this work, it can be concluded that: *A. pullulans*-ACBL-77 produces siderophores and their production was increased with the addition of sucrose (2.5%) in yeast culture medium; the siderophore, produced by yeast, may be one of the mechanisms of action against *Penicillium digitatum*, but it has no antagonistic action against *P. italicum*; the application of a curative form of yeast suspensions had the potential to control blue mold; preventive applications of yeast cells showed control over green mold, however, with a low percentage of control and, finally, the combination of *A. pullulans* with lower doses of the fungicide imazalil was efficient for the control of blue mold and green mold, in orange fruits.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, siderophore, *Citrus sinensis*

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Quantificação de sideróforos em diferentes tempos de incubação.....	19
Tabela 2. Porcentagem de sideróforos produzidos por <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77, após cultivo da levedura em meio pobre em ferro (MPF) acrescido de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	20
Tabela 3. Produção média de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 em meio pobre em ferro (MPF) acrescido de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	21
Tabela 4. Porcentagem de conídios germinados de <i>Penicillium italicum</i> , após interação com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> (cultivada em diferentes meios de cultura) ou, com o sideróforo produzido.....	23
Tabela 5. Porcentagem de conídios germinados de <i>Penicillium digitatum</i> , após interação com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> (cultivada em diferentes meios de cultura) ou, com o sideróforo produzido.....	23
Tabela 6. Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor azul, após tratamento preventivo e curativo com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> ou, sideróforo.....	27
Tabela 7. Porcentagem de frutos de laranja Lima com sintomas de bolor azul, após tratamento preventivo e curativo com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> ou, sideróforo.....	29
Tabela 8. Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor verde, após tratamento preventivo e curativo com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> ou, sideróforo.....	30
Tabela 9. Porcentagem de frutos de laranja Lima com sintomas de bolor verde, após tratamento preventivo e curativo com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> ou, sideróforo.....	32

Tabela 10.	Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor azul, após tratamento curativo com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> associado ou não com diferentes doses de Imazalil.....	34
Tabela 11.	Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor verde, após tratamento curativo com a levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> associado ou não com diferentes doses de imazalil.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.	Curva de crescimento com a produção de células de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 cultivada em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) em diferentes períodos de incubação..... 17
Figura 2.	Avaliação qualitativa de produção de sideróforos por <i>Aureobasidium pullulans</i> - ACBL-77. Sendo, o primeiro tubo de cada imagem (referente a cada período) correspondente ao controle positivo (coloração rosada, presença de sideróforo); segundo tubo controle negativo, ausência de sideróforo; terceiro tubo, indicação de produção de sideróforo pela levedura..... 18
Figura 3.	Avaliação qualitativa de sideróforos produzidos por <i>Aureobasidium pullulans</i> - ACBL-77 em meio pobre em ferro (0,3% K ₂ HPO ₄ ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% MgSO ₄ ; 0,0002% ZnSO ₄) acrescido das fontes nutricionais: a – 2,5% Sacarose + 0,4% Sulfato de Amônio; b -2,5 Sacarose +0,3% Nitrato de Amônio; c – 2,5% Maltose +0,4% Sulfato de Amônio; d- 2,5% Maltose + 0,3% Nitrato de Amônio..... 20
Figura 4.	Avaliação qualitativa de sideróforos produzidos por <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 em meio pobre em ferro (0,3% K ₂ HPO ₄ ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% MgSO ₄ ; 0,0002% ZnSO ₄) acrescido das fontes nutricionais: a – 2,5% Sacarose + 0,4% Sulfato de Amônio; b -2,5 Sacarose +0,3% Nitrato de Amônio; c – 2,5% Maltose +0,4% Sulfato de Amônio; d -2,5% Maltose + 0,3% Nitrato de Amônio. A coloração amarela e, ou branca, indica presença ou ausência de sideróforo, respectivamente, de acordo com a metodologia a base de perclorato de ferro..... 21

- Figura 5.** Produção média de biomassa de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, após cultivo em diferentes meios de cultura. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = meio pobre em ferro (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% $MgSO_4$; 0,0002% $ZnSO_4$). BD = Batata - dextrose (200g de batata + 20g de dextrose + água até completar 1L)..... 22
- Figura 6.** Avaliação do crescimento micelial de *Penicillium italicum*, após cultivo em meios batata-dextrose ou, meio pobre em ferro, acrescidos, ou não, da levedura *Aureobasidium pullulans* ou do sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$. MPF = K_2HPO_4 (0,3%) + ácido cítrico (0,1%) + $MgSO_4$ (0,008%) + $ZnSO_4$ 7(0,0002%). BD = Batata - dextrose (200g de batata + 20g de dextrose + água até completar 1L)..... 24
- Figura 7.** Avaliação do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após cultivo em meios batata-dextrose ou, meio pobre em ferro, acrescidos, ou não, da levedura *Aureobasidium pullulans* ou do sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = K_2HPO_4 (0,3%) + ácido cítrico (0,1%) + $MgSO_4$ (0,008%) + $ZnSO_4$ (0,0002%). BD = Batata - dextrose (200g de batata + 20g de dextrose + água até completar 1L)..... 25
- Figura 8.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Pera, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p

- ≥ 0,05). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-ágar (200g de batata + 20g de dextrose +15 g ágar + água até completar 1L)..... 26
- Figura 9.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-ágar (200g de batata + 20g de dextrose +15 g ágar + água até completar 1L)..... 28
- Figura10.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pera, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-ágar (200g de batata + 20g de dextrose +15 g ágar + água até completar 1L)..... 30
- Figura 11.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* – ACBL-77 ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-

dextrose-ágar (200g de batata + 20g de dextrose +15 g ágar + água até completar 1L) 32

Figura 12. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Pera, após tratamento curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* associada ou não com diferentes dosagens do fungicida imazalil. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$ 33

Figura 13. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pera, após tratamento curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* – ACBL-77 associada ou não com diferentes dosagens do fungicida imazalil. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$ 35

1. Introdução

O bolor azul e bolor verde, causados pelos fungos *Penicillium italicum* Wehmer e *Penicillium digitatum* (Pers.) 1881, respectivamente, são as principais doenças que ocorrem na fase de pós-colheita dos citros, comprometendo a qualidade e a quantidade de frutos colhidos (Palou et al., 2008).

Os sintomas dessas doenças se iniciam com uma mancha mole e aquosa ao redor do local da infecção, que na sequência é recoberta por um micélio branco contendo uma massa de esporos de coloração azulada (bolor azul) ou esverdeada (bolor verde). No caso do bolor azul, a área esporulada fica circundada por um faixa estreita de micélio branco (Palou, 2014). O crescimento ótimo para os fitopatógenos é em torno de 25°C (Plaza et al., 2003), porém, *P. italicum* consegue se desenvolver em frutas armazenadas em temperaturas mais frias, podendo a germinação dos conídios ocorrer a 0°C, segundo Wyatt e Parish (1995).

Atualmente, o controle desses bolores em *packing-house* baseia-se no tratamento dos frutos com o fungicida imazalil (IMZ). Este produto é utilizado há mais de 25 anos, o que pode contribuir para o surgimento de linhagens resistentes dos patógenos a esses princípios ativos (Ismail e Zhang, 2004). Considerando o fato da demanda da sociedade por produtos orgânicos e isentos de resíduos químicos, aliado ao surgimento de linhagens resistentes aos principais fungicidas utilizados para o controle (Palou et al., 2002; Zhu et al., 2006; Kinay et al., 2007), têm-se tornado imprescindível a busca por novas alternativas de controle de doenças.

O uso de leveduras tem apresentado resultados positivos no controle de doenças de pós-colheita de frutas. A espécie *Aureobasidium pullulans* -ACBL-77 mostrou-se eficiente no controle da podridão azeda de citros, com produção de enzimas hidrolíticas, como a quitinase, atividade “killer” e inibição da germinação de conídios de *Geotrichum citri-aurantii*, como possíveis mecanismos de ação contra o patógeno (Ferraz et al., 2016).

Um possível mecanismo de ação desta levedura contra fitopatógenos é a produção de sideróforos. Tais substâncias são compostos produzidos por bactérias e fungos, que apresentam baixo peso molecular e têm a capacidade de quelar íons férricos específicos. Sua função é retirar o ferro do meio ambiente e transformá-lo em forma disponível para os microrganismos (Neilands, 1995). Sua variabilidade

estrutural e afinidade pelo elemento ferro garantem o crescimento de um microrganismo em condições competitivas, ou seja, quando o ferro é um fator limitante no ambiente (Calvente et al., 2001).

Os sideróforos podem ser classificados, de acordo com a sua composição química, em três tipos: catecolatos, carboxilatos e hidroxomatos (Haas, 2003). A maioria das leveduras apresenta sideróforos do tipo hidroxomato (Leong, 1986), com exceção dos zigomicetos que produzem do tipo carboxilato (Thieken e Winkelmann, 1992).

As leveduras, por não produzirem substâncias tóxicas, são indicadas para controle de doenças em frutos, principalmente, aqueles consumidos de forma *in natura*. Atualmente, a literatura relata alguns produtos à base desse microrganismo, como o Shemer® registrado em Israel, Blosson Protect TM®, Boni Protect® na Alemanha e Nexy (*Candida oleophila*) na Bélgica (Bettioli et al., 2012; EFSA, 2012; Wagner et al., 2013).

Alguns trabalhos na literatura têm apresentado dados positivos de controle de doenças combinando a aplicação de leveduras com baixas doses de fungicida, com o intuito de reduzir a quantidade de produto químico a ser utilizado, durante o beneficiamento dos frutos (Palou et al., 2008; Moretto et al., 2014).

Desta forma, compreender o mecanismo de ação de agentes de biocontrole é um pré-requisito para se obter isolados antagônicos mais efetivos e, para o desenvolvimento de métodos de produção e formulação mais consistentes, que mantenham e aumentem a atividade antagonista do microrganismo. Além disso, encontrar uma estratégia de controle, com menos danos ao ambiente e à saúde pública, como por exemplo, a combinação de um método biológico e químico, poderá contribuir para uma agricultura mais sustentável e ecologicamente mais correta.

Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram verificar: (i) a produção e quantificação de sideróforos por *A. pullulans*-ACBL-77; (ii) o controle *in vitro* da levedura contra *P. italicum* e *P. digitatum*; (iii) o controle do bolor azul e do bolor verde em frutos de laranja pela levedura e, (iv) a combinação da aplicação de *A. pullulans* com menores doses de imazalil no controle das doenças.

2. Revisão de literatura

2.1. Citricultura brasileira

As espécies cítricas são originárias da Ásia, de regiões tropicais e subtropicais do continente (Almeida e Passos, 2011). Pertencem ao grupo de plantas do gênero *citrus* e outros gêneros como *Fortunella* e *Poncirus*, e híbridos da família *Rutaceae* e, são representados por laranjas, tangerinas, limões, lima ácida Tahiti, limão galego, pomelos, cidras, laranja-azeda e toranjas (Lopes et al., 2011).

No Brasil, a atividade citrícola começou na década de 80 (século XIX), no estado do Rio de Janeiro, através da exportação de laranja *in natura*. No estado de São Paulo, a atividade começou a ser desenvolvida no ano de 1957, sendo favorecida pelas condições edafo-climáticas do Estado e uma alternativa ao desaquecimento da produção cafeeira. A partir de 1963, São Paulo passou a implementar uma indústria voltada ao processamento da fruta e à exportação de suco de laranja (Borges e Costa, 2006).

Basicamente, a citricultura brasileira está implementada em duas regiões, sendo a principal, a região paulista, que abrange, também, a região sul do triângulo mineiro, em Minas Gerais. E a segunda está localizada nos estados de Sergipe e Bahia, na região nordeste do país (Borges e Costa, 2006). Os principais tipos de citros cultivados nessas regiões são laranjas, tangerinas, limeiras ácidas e os limões. Porém, o Estado de São Paulo detém cerca de 85% da produção brasileira de laranjas (Lopes et al., 2011).

Hoje o Brasil já é o primeiro produtor mundial de citros e o maior exportador de suco de laranja (Almeida e Passos, 2011). Segundo dados do Mapa (2020), as exportações de laranja fresca e do suco concentrado foram de 20.155.000 e 1.397.000 toneladas, respectivamente, no ano de 2019. Desta forma a citricultura brasileira representa um importante setor para economia do país, gerando muitos empregos diretos e indiretos.

2.2. Doenças de pós-colheita em frutos cítricos

As doenças de pós-colheita, causadas por fungos em frutos de laranja, podem ser classificadas em infecções quiescentes ou, infecções ocasionadas por ferimentos. No caso das infecções quiescentes, o fruto é infectado na planta-mãe, na pré-colheita, porém, a doença só se manifesta na pós-colheita, quando os frutos se encontram

maduros e, sob condições de armazenamento ou, durante o transporte, um exemplo de doenças causadas por infecções quiescentes é a pinta preta em citros, causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (Eckert e Eaks, 1989; Feichtenberger, 1996; Toffano et al., 2017).

Já em doenças, como o bolor azul (*Penicillium italicum* Wehmer) e o bolor verde (*Penicillium digitatum* (Pers). Sacc. 1881), para que as infecções ocorram é necessário a presença de ferimentos nos frutos (Eckert e Eaks, 1989). Esses fungos são os principais patógenos de pós-colheita que atacam os frutos cítricos (Ballester et al., 2006) e ocorrem em todas as regiões onde o cultivo de citros está estabelecido (Buriticá et al., 2019), gerando grandes perdas econômicas na indústria em todo o mundo. A infecção se origina geralmente nas etapas produtivas da cultura, mas, se manifesta durante a fase de pós-colheita (Buriticá et al., 2019), e para que a infecção se estabeleça é necessário que ocorra um ferimento na casca, como porta de entrada para o patógeno (Palou et al., 2008). Esses ferimentos geralmente ocorrem durante a colheita, transporte, armazenamento ou, comercialização dos frutos, necessitando de cuidados durante todas as etapas de beneficiamento até a fase de comercialização. Alguns ferimentos podem ser causados, também, por insetos, antes da colheita dos frutos.

Os fungos causadores de bolores produzem muitos conídios e estão presentes na atmosfera, sendo facilmente disseminados a partir das frutas podres que ficam nos solos dos pomares; pelo transporte, armazenamento ou comercialização dos frutos, sendo os conídios facilmente levados por correntes de ar, garantindo assim, a infecção em todas as etapas de manuseio dos frutos, sendo, no entanto, imprescindível a presença de ferimentos, que possibilite a entrada do patógeno (Ismail e Zhang, 2004, Palou, 2014, Palou et al., 2008). No período de comercialização dos frutos, as perdas pelas doenças podem chegar até 50% (Eckert, 1993).

2.2.1 Bolor Verde

Penicillium digitatum, causador do bolor verde, é um fungo pertencente à divisão Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e família *Aspergillaceae*. O fitopatógeno produz uma grande quantidade de conídios unicelulares e hialinos, que estão em cadeia de conidióforos livres com formato de pincel (Bergamim Filho, et al., 1995, Buriticá et al., 2019). Seus conídios apresentam

parede lisa, elipsoidais ou cilíndricas, de tamanhos que variam entre 3,5-8,0 x 3,0-4,0 μM (Palou, 2014).

A doença é identificada pela massa de conídios de coloração verde-oliva produzidos nos frutos infectados. O primeiro sintoma da doença começa com o aparecimento de pontos aquosos e moles na casca do fruto, que vai progredindo e desenvolvendo micélios brancos, que produzem enzimas que degradam a parede celular do fruto, e em poucos dias a fruta está toda coberta por conídios de coloração verde (Ismail e Zhang, 2004). A temperatura ótima para desenvolvimento da doença está entre 20 a 25°C e ocorre em todas as regiões produtoras de citros do mundo (Buriticá et al., 2019).

2.2.2. Bolor Azul

Penicillium italicum, fungo causador do bolor azul, ocorre também em todas as regiões produtoras de citros do mundo, porém, é menos prevalente do que o bolor verde, em regiões com temperaturas mais elevadas. O bolor azul apresenta crescimento ótimo na temperatura de 25°C, porém, este fungo é mais comum em frutas mantidas em armazenamento refrigerado, pois seus conídios podem germinar em temperaturas de até 0°C (Ismail e Zhang, 2004; Plaza et al., 2003; Wyatt e Parish, 1995).

Os conídios apresentam paredes lisas e, geralmente, tem formato cilíndrico, mas podem se tornar elípticos ou subglobosos, com tamanho de 4,0-5,0 x 2,5-3,5 μM (Palou, 2014).

Os sintomas iniciais da doença são lesões aquosa e moles na casca do fruto, com o surgimento de micélios de coloração branca no centro da lesão, que se expandem e, logo ocorre a esporulação de coloração azul ou verde azulada de textura aveludada, sempre cercado por uma fina faixa de micélio branco. Com o tempo toda a casca da fruta é completamente envolvida pelos conídios (Ismail e Zhang, 2004; Palou, 2014; Buriticá et al., 2019).

2.3. Controle de bolores

O método de controle mais utilizado para combater esses bolores é o controle químico por meio do fungicida imazalil (Erasmus et al., 2015). O tratamento na pós-

colheita com esse produto químico é relativamente barato, fácil de aplicar e tem ação curativa contra infecções pré-existentes ou, preventiva contra possíveis infecções. As aplicações do produto são realizadas normalmente em casa de embalagens, aplicadas através de suspensões aquosas ou, com em conjunto com cera de emulsão (Palou, 2014; Palou 2008; Ismail e Zhang, 2004).

O uso frequente desses compostos sintéticos tem levado a constantes ocorrências de populações de patógenos resistentes (Kanetis et al., 2007) a esses princípios ativos, assim como, a crescente preocupação da sociedade com os efeitos que esses fungicidas podem causar na saúde humana e ao meio ambiente. Diante desse contexto, vem sendo implementadas novas alternativas em substituição total ou parcial ao controle químico para o controle desses fitopatógenos em frutos cítricos (Eramus et al., 2015; Fan et al., 2014; Wuryatmo et al., 2014).

Há vários registros na literatura de métodos alternativos no controle, entre eles estão: a refrigeração, tratamento térmico, radiação gama e ultra-violeta, atmosfera controlada, quitosana, óleos essenciais, peptídeos e proteínas.

A refrigeração é um método efetivo de controle de doenças em pós-colheita, por retardar e moderar os processos metabólicos envolvidos na maturação, causadas por enzimas degradativas e oxidativas, reduzindo a produção de etileno e retardando o crescimento de microrganismos (Barkai-Golan, 2001; Kader, 2002).

O tratamento térmico já se mostrou eficiente para controle de patógenos no combate a infecções presentes nas primeiras camadas da casca, ou em esporos dos patógenos que permanecem na superfície delas (Silveira et al., 2005). Esse tratamento basicamente é feito com imersão dos frutos em água quente, lavagem e escovação com água quente (Palou, 2014).

A radiação ultravioleta e ultra-violeta (UV-C) pode ser empregada no controle de doenças em pós-colheita de frutas que são consumidas *in natura*, como abacate, citros e uva. A aplicação do tratamento pode ser feita antes ou após armazenamento e tem a capacidade de atuar sobre vários patógenos (Nigro et al., 2000; Neves et al., 2002; Pascholati et al., 2004).

A utilização de atmosfera controlada pode reduzir os processos bioquímicos de maturação, senescência, evitando o desenvolvimento de podridões. O uso de altos níveis de dióxido de carbono têm mostrado ser eficiente para o aumento de componentes antifúngicos, reduzindo, assim, o desenvolvimento da doença (Prusky et al., 1991; Mari e Guizzardi, 1998).

Aplicação de quitosana em frutas tem ação contra os fungos causadores de bolores e na redução da senescência de várias espécies de *citrus*, durante o armazenamento a frio e a longo prazo (El-Ghaouth et al., 2000; Chien e Chou, 2006).

Óleos essenciais podem ser extraídos de plantas aromáticas como as cítricas, que possuem terpenos C10 e C15 voláteis (Caccioni et al., 1998). O citral, por exemplo, é um componente antifúngico formado no flavedo de frutas cítricas e apresenta resistência à infecção de *P. digitatum* (Ben- Yehoshua, 2005; Rodov et al., 1995).

Plantas e animais produzem peptídeos e proteínas, que podem apresentar atividade antimicrobiana como mecanismo de defesa contra fungos (Broekaert et al., 1995; Broekaert et al., 1997). Blondelle e Houghten, 1992 dizem que peptídeo catiônico antipático pode interagir com a membrana da célula alvo de alguns patógenos e, em seguida, romper a membrana. López-García et al., 2002; López-García et al., 2000 e Muñoz et al. (2007) registraram a capacidade de vários peptídeos em controlar doenças causadas pelos fungos *P. italicum* e *P. digitatum*.

2.4. Controle biológico de bolores

O controle biológico tem como princípio básico a utilização de microrganismos para reduzir ou manter a população de um fitopatógeno, a fim de que não cause prejuízos econômicos (Carmona-Hernandez et al., 2019). Esse tipo de controle tem se mostrado como uma alternativa promissora em substituição ao controle químico (Zhimo et al., 2016).

Existem diversos mecanismos de ação que os microrganismos antagônicos podem apresentar para combater fitopatógenos, como por exemplo, a indução de resistência, competição por espaço e nutrientes, a produção de enzimas hidrolíticas e toxina “killer”, e reposta oxidativa (Ferraz et al., 2016; Liu et al., 2013; Spadaro e Droby, 2016; Cunha et al., 2018). As leveduras possuem grande potencial no controle de doenças por possuírem capacidade de colonizar facilmente os ferimentos em frutos; por se adaptarem facilmente em condições de alta concentração de açúcares, de alta pressão osmótica e baixo pH; não são tóxicos e podem ser tolerantes quanto à presença de fungicidas (Filonow, 1998; Coelho et al., 2003; Lahlali et al., 2011; Spadaro e Droby, 2016).

Alguns autores relatam a eficiência da levedura *A. pullulans* contra diversos fitopatógenos, com diversos possíveis mecanismos de ação contra patógenos, sendo produção de toxina “killer”, enzimas hidrolíticas, protease, compostos antifúngicos termoestáveis, o antibiótico aureobasidin (AbA) e competição por espaço e nutrientes, entre outros (Adikaram et al., 2002; Bencheqroun et al., 2007; Ferraz et al., 2016; Liu et al., 2007; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012;). Estudos feitos por Ferraz et al. (2016) mostraram resultados positivos no controle da podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*) em frutos cítricos, utilizando o isolado ACBL-77 de *A. pullulans*. Segundo os autores, a levedura apresentou como mecanismos de ação contra o fitopatógenos: atividade “killer”, produção de enzima hidrolítica (quitinase) e inibição de conídios do fungo.

Existem diversos bioprodutos comercializados à base de leveduras, como o Blossom Protect™[®] e BoniProtect[®] contendo cepas de *A. pullulans* e registrados na Alemanha; Shemer[®] (*Metschnikowia fructicola*) em Israel e Nexy (*Candida oleophila*) na Bélgica (Bettiol et al., 2012; EFSA, 2012; Wagner et al., 2013).

Por outro lado, o uso isolado de um bioproduto pode muitas vezes não desempenhar um resultado plenamente satisfatório e, nesse caso, a combinação de um produto biológico com outros métodos de controle pode ser uma alternativa mais eficiente, como é o exemplo de trabalhos descritos na literatura em que se combinou aplicação de levedura com doses mais baixas de fungicida para controle de fitopatógenos (Palou et al., 2008; Moretto et al., 2014).

2.5. Sideróforos

O ferro é um elemento essencial para os microrganismos (Chi et al., 2012). É frequentemente encontrado na forma de aglomerados de ferro-enxofre e são usados em muitos processos bioquímicos como a redução do nitrogênio atmosférico, síntese de desoxirribonucleico, respiração, ciclo de ácido tricarboxílico e síntese de aminoácidos, lipídeos e esteróis (Philpott, 2006). Porém, sua forma mais abundante encontrada na natureza é de íon férrico Fe^{3+} , que não é disponível aos microrganismos.

Muitos microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras produzem sideróforos (do grego: “portadores de ferro”), que são quelantes específicos de íon ferro (Fe^{3+}) de baixo peso molecular. A principal função desse composto é retirar o

ferro do meio ambiente e tornar esse mineral disponível para a célula microbiana (Neilands, 1995). Desta forma este composto garante o crescimento dos microrganismos em condições competitivas, ou seja, em situações em que o ferro é um fator limitante no ambiente. Microrganismos produtores de sideróforo recuperam o ferro dos complexos ferri-sideróforos por meio de mecanismos específicos de absorção (Winkelmann 2001; Winkelmann, 2002; Thieken e Winkelmann, 1992; Calvente et al., 2001).

Diversos microrganismos sintetizam sideróforos, bactérias entéricas; bactérias patogênicas de humanos, de animais, fungos e de plantas; espécies de bactérias gram-positivas e negativas, algas verdes e azuis, fungos filamentosos e alguns tipos de leveduras (Benite, et al., 2002). Os sideróforos são divididos em grupos, conforme sua composição química, catecóis, carboxilatos e hidroxomatos (Hass, 2003). No caso específico, com exceção dos zigomicetos que produzem sideróforos do tipo carboxilato, as leveduras produzem do tipo hidroxomato, enquanto, as bactérias produzem sideróforos do tipo carboxilato e hidroxomato (Leong, 1986; Riquelme, 1996; Thieken e Winkelmann, 1992).

Alguns autores relatam que o sideróforo produzido por microrganismos pode ser um fator de controle de alguns fitopatógenos, como no estudo de Sansone et al., 2005, em que os autores demonstram que o sideróforo (ácido rhodotorúlico), produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis*, inibiu a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinza em maçãs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foi utilizado no presente estudo um isolado de *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* e um isolado de levedura *Aureobasidium pullulans* - ACBL-77, todos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil.

3.2. Estudo do crescimento de *Aureobasidium pullulans*

Para o estudo da curva de crescimento da levedura *A. pullulans* (ACBL-77), foi utilizado o meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar). Inicialmente, 100 µL de uma suspensão de células ativas da levedura (1×10^4 células/mL), cultivadas por 72 horas, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e armazenadas em estufa para BOD a 28°C, em diferentes tempos de incubação (6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 e 120h). Para a avaliação da curva de crescimento, alíquotas de 1 mL de suspensões da levedura foram submetidas às diluições decimais. Posteriormente, 100 µL de cada diluição foram submetidas ao plaqueamento em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. A contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada após 48 horas do plaqueamento. A densidade populacional da levedura foi expressa em log₁₀ UFC/mL. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição.

3.3. Produção de sideróforos por *Aureobasidium pullulans*

Esse ensaio teve por objetivo avaliar a produção de sideróforos pela levedura *A. pullulans* - ACBL-77. Para esse ensaio, foi utilizado o método adaptado de Schwyn e Neilands (1987), utilizando um complexo-ferro altamente colorido. Primeiramente, a levedura foi cultivada em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido TSB (caldo tripticaseína de soja) diluído 10 vezes e, incubados a 28°C sob agitação constante em shaker (200 rpm), em diferentes tempos, 24, 48, 72, 92 e 120 horas.

A solução indicadora de cromo azurol S (CAS) foi preparada conforme descrito no manual da Embrapa (Cattelan, 1999).

Após o cultivo, em cada período correspondente, o conteúdo foi centrifugado a 12.000 xg durante 10 minutos, transferindo-se 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio estéril, onde se adicionou 1 mL de CAS (solução cromo azurol S) previamente preparada, conforme descrito por Cattelan (1999). Após 15 minutos fez-se a comparação visual dos resultados com o controle negativo (1 mL de meio TSB + 1 mL CAS, sem a levedura) o qual indica a cor azul e controle positivo (1 mL de meio TSB + 1 mL CAS + 0,05 g de EDTA), indicando a coloração de amarelo a rosado. Para avaliação, os isolados que converteram a cor azul da solução CAS para a

coloração de amarelo a rosado foram considerados produtores de sideróforos, com base em reações positivas imediatas ou em até 15 minutos (Lee et al., 2012).

3.4. Quantificação da produção de sideróforos por *Aureobasidium pullulans* em diferentes tempos de incubação

Dois mililitros de uma suspensão (1×10^6) de *A. pullulans* – ACBL-77 foram adicionados em frascos contendo 48 mL com meio pobre em ferro (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% $MgSO_4$; 0,0002% $ZnSO_4$) em pH 6,2, acrescido de uma fonte de carbono (sacarose à 2,5%) e de nitrogênio (sulfato de amônio à 0,4%) (Calvente et al., 2001; Wang et al., 2009). As culturas foram incubadas à 28°C, sob agitação constante a 200 rpm, por diferentes períodos (24, 48, 72, 96 e 120 h) e, posteriormente, o conteúdo foi centrifugado a 13.000 xg durante 5 minutos à 4°C (Wang et al., 2009).

Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 2,5 mL da solução contendo 5 mM $FeCl_3$ – 0,1 M $HClO_4$ (Calvente et al., 2001) e, a leitura da sua densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm (Wang et al., 2009).

A presença de sideróforo hidroxamato foi indicada pela conversão de cor para laranja-amarelo (Lee et al, 2012). O branco consistiu no meio de cultura sem a levedura (Calvente et al., 2001).

A quantidade de sideróforo no sobrenadante foi mensurada a partir de uma curva padrão feita com Mesilato de Deferoxamina (5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,09; 0,07 e 0,05 g/L), e medido em espectrofotômetro a 440 nm. (Wang et al., 2009; Francesco, 2015).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento.

3.5. Avaliação da fonte de carbono e nitrogênio na produção de sideróforos por *Aureobasidium pullulans*

Este ensaio teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na produção de sideróforos por *A. pullulans*, utilizando duas metodologias diferentes, CAS líquido e a do Perclorato de Ferro, essa última, segundo Payne (1994) detecta apenas a presença de sideróforo do tipo hidroxomato. Os

tratamentos compreenderam meio pobre em ferro (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% $MgSO_4$; 0,0002% $ZnSO_4$) em pH 6,2, segundo Wang et al. (2009) variando as fontes de carbono sacarose ou maltose, na concentração de 2,5% e as fontes de nitrogênio, sulfato de amônio (0,4%) ou nitrato de amônio (0,3%).

Para as duas metodologias, 2 mL de uma suspensão de levedura (1×10^6) foram transferidos para Erlenmeyers contendo 48 mL de cada meio de cultura, conforme o tratamento citado acima. As culturas foram incubadas a 28 °C, sob agitação constante a 200 rpm, por 72 horas (Calvente et al., 2001). Posteriormente, as culturas foram submetidas à centrifugação, conforme descrito no item 3.3 e, o sobrenadante foi reagido com o Cromo azurol (CAS), realizando a leitura em espectrofotômetro à 630 nm. A Unidade de sideróforos foi definida pela fórmula descrita por Payne (1994) e Tortora et al (2011):

$$[(A_r - A_s) / A_r] 100 = \%$$

A_r = Branco contendo meio de cultura sem levedura mais o CAS

A_s = Amostra com levedura reagida com o CAS.

Na metodologia do Perclorato de Ferro, após o período de incubação, as culturas, de acordo com os respectivos tratamentos, foram centrifugadas a 13.000 xg, 4°C por 5 minutos (Wang et al., 2009). Após a centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados 2,5 mL da solução contendo 5 mM $FeCl_3$ – 0,1 M $HClO_4$ (Calvente et al., 2001) e a leitura da sua densidade ótica foi feita em espectrofotômetro a 440 nm (Wang et al., 2009). Após a conversão da cor para amarelo-laranja, a quantidade de sideróforo presente no sobrenadante da solução, foi mensurada pela curva padrão de Mesilato de Deferoxamina, como descrito no item 3.4.

Para esse estudo foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições para cada tratamento, em cada metodologia.

3.6. Produção de biomassa de *Aureobasidium pullulans* cultivado em diferentes meios de cultura

Dois mililitros de suspensões de células da levedura (1×10^6 células/ml) foram cultivados em frascos contendo 48 mL dos diferentes meios de cultura, referentes aos 4 meios descritos no item (3.5) e mais um meio de batata-dextrose (BD). As culturas foram incubadas a 28°C, sob agitação constante a 200 rpm, por 72 horas. Em seguida,

foram submetidas à centrifugação a 4.900 xg por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa obtida foi transferida para estufa de secagem a 60°C, até a obtenção de massa constante (Simmons et al., 1995)

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições para cada tratamento.

3.7. Interações *in vitro*

3.7.1. Avaliação da porcentagem de conídios germinados de *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, após interação com a levedura ou, do seu sideróforo produzido

Para o estudo da competição por nutrientes entre a levedura e os fitopatógenos foram utilizados 4 tratamentos: 1) suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) obtida do cultivo em placas com BDA por 72 horas a 27°C; 2) suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) obtida do cultivo em meio líquido contendo sacarose (2,5%) + sulfato de amônio (0,4%) + K_2HPO_4 (0,3%); ácido cítrico (0,1%); $MgSO_4$ (0,008%); $ZnSO_4$ (0,0002%); 3) Sobrenadante, filtrado em Millipore (0,45 μm), obtido pela metodologia do Perclorato de Ferro (item 3.5); 4) Testemunha (suspensão de patógeno + água).

Para tal, uma alíquota de 20 μl da suspensão da levedura ou do sobrenadante filtrado, de acordo com os tratamentos, juntamente com 20 μl da suspensão de conídios de cada um dos fitopatógenos (1×10^5 conídios/mL) foram depositados em áreas demarcadas de lâminas, previamente preparadas, com meio ágar-água. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 27 °C, em fotoperíodo 12/12h, por 19 horas para o teste com *P. italicum*, e 16 horas para o com *P. digitatum*. A germinação dos conídios dos fungos foi paralisada através da aplicação de azul lático. A avaliação foi realizada através da contagem de conídios germinados e não germinados, em um total de 100 conídios ao acaso, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à largura do conídio, seguindo a metodologia adaptada de Kupper et al. (2013).

Foi utilizando um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 7 repetições para cada fitopatógeno.

3.7.2. Avaliação do crescimento micelial de *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, após cultivo em diferentes meios, acrescidos, ou não, de células de levedura ou de sideróforo

Este ensaio teve como objetivo avaliar a capacidade da levedura *A. pullulans* - ACBL-77 ou, do sideróforo produzido pela levedura, em afetar o crescimento micelial de *P. italicum* e do *P. digitatum*.

Os tratamentos para este ensaio corresponderam a frascos de Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura, conforme os seguintes tratamentos, acrescido de 2mL de uma suspensão dos fitopatógenos (1×10^5 conídios/mL). Os tratamentos avaliados foram: 1) Meio pobre em ferro (MPF) [K_2HPO_4 (0,3%); ácido cítrico (0,1%); $MgSO_4$ (0,008%); $ZnSO_4$ (0,0002%)] contendo sacarose (2,5%) + sulfato de amônio (0,4%) acrescido com 10 mL do sobrenadante filtrado em Millipore de 0,45 μm (item 3.5); 2) MPF + sacarose (2,5%) + sulfato de amônio (0,4%) + 10mL da levedura (1×10^7 células/mL); 3) MPF + sacarose (2,5%) + sulfato de amônio (0,4%) + 10mL de água destilada e esterilizada; 4) meio batata-dextrose (BD) + 10mL da levedura (1×10^7 células/mL) e, finalmente, 5) meio BD acrescido com 10mL de água destilada e esterilizada.

As culturas foram incubadas em estufa tipo shaker a 28 °C, sob agitação constante de 200 rpm, por 48 horas (Calvente et al., 2001). Após este período, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em filtro de papel (9 cm de diâmetro) e secado em estufa a 121°C por um dia (Wiyono et al., 2008; Klein et al., 2016) e pesado.

Foram realizados dois Ensaios um para cada fitopatógeno, utilizando um delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições para cada tratamento.

3.8. Interações *in vivo*

3.8.1. Atividade antifúngica *in vivo* de *Aureobasidium pullulans* contra *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*

Para este estudo foram realizados dois ensaios com diferentes variedades de laranja, para cada fitopatógeno estudado.

Frutos de laranja Pera e de laranja Lima foram lavados com detergente neutro, desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio (0,2%) e feridos em dois

pontos equidistantes, na região mediana, com agulhas demarcadas e esterilizadas, a uma profundidade de 3 mm.

Para esse estudo foram utilizados 5 tratamentos: 1) suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) obtida do cultivo em placas com BDA por 72 horas a 27°C; 2) suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) obtida do cultivo em meio líquido contendo sacarose (2,5%) + sulfato de amônio (0,4%) + K_2HPO_4 (0,3%); ácido cítrico (0,1%); $MgSO_4$ (0,008%); $ZnSO_4$ (0,0002%); 3) Sobrenadante, filtrado em Millipore (0,45 μm), obtido pela metodologia do Perclorato de Ferro (item 3.5); 4) Imazalil (2 mL/L) e 5) Testemunha (frutos inoculados com cada fitopatógeno e sem tratamento).

Para o tratamento dos frutos, uma alíquota de 20 μL da suspensão da levedura ou do sobrenadante filtrado, de acordo com os tratamentos, foram depositados na região do ferimento 24 horas antes e 24 horas depois da inoculação dos fitopatógenos, onde 20 μL da suspensão dos fitopatógenos (1×10^4 conídios/mL) foi inoculado no local do ferimento. Para o tratamento químico, os frutos foram imersos na calda do fungicida por 2 minutos.

Após tratamento e inoculação, os frutos foram armazenados em caixas de propileno (40x30x15 cm) com tampa a 10 °C e 90 ± 3 % de umidade relativa (UR), para os testes com bolor azul. E para os testes com bolor verde, as frutas foram colocadas em cestos de plástico (55x22x30 cm), em temperatura ambiente ($22^\circ C \pm 3^\circ C$) e $90 \pm 3\%$ de umidade relativa (UR).

A severidade de cada doença foi avaliada pelo tamanho médio das lesões de bolor azul ou de bolor verde. Para a avaliação do bolor azul em frutos de laranja Pera, as medições ocorreram a partir do 13º até 26º dia de armazenamento, enquanto ,para os frutos de laranja Lima o período correspondente de avaliação foi do 12º ao 30º dia.

Para a avaliação do tamanho de lesão dos frutos com bolor verde, tanto para laranja Pera quanto para laranja Lima, as avaliações foram do 4º até 8º dia.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições, com 20 frutos por repetição, para cada variedade de laranja e fitopatógeno. Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre o tamanho médio das lesões ocasionadas pelos patógenos, foi efetuado o cálculo da área abaixo a curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a fórmula de Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i)/2] * [(T_{i+1} - T_i)]; \text{ em que:}$$

n – é o número de observações/avaliações.

Y_i – proporção da doença na “i”- ésima observação/avaliação;

T_i – é o tempo em dias na “i”- ésima observação/avaliação;

A incidência da doença foi determinada pela porcentagem de frutos doentes.

3.8.2. Efeito da combinação de *Aureobasidium pullulans* e do fungicida imazalil no controle do bolor azul e do bolor verde

Frutos de laranja Pêra foram submetidos aos mesmos procedimentos de higienização, desinfestação, fermento e inoculação, conforme descrito no item 3.8.1.

Os tratamentos compreenderam: frutos tratados com diferentes doses de imazalil (0,5 mL/L; 1,0 mL/L; 2,0 mL/L) associadas à levedura ACBL-77 (1×10^7 células/mL); levedura sozinha na mesma concentração; tratamento químico (2 mL/L de imazalil) e testemunha (frutos sem tratamento). Nos tratamentos que corresponderam à associação com a levedura, os frutos foram tratados no local do fermento, depositando-se uma alíquota de 20 μ L da suspensão da levedura (1×10^7 células/mL) e imersos na solução com o produto químico nas diferentes doses por 2 minutos. Para os ensaios com bolor azul a aplicação dos tratamentos foi realizada após 24 horas (tratamento curativo) e para o bolor verde 24 horas antes (tratamento preventivo), a inoculação do fitopatógeno.

Os frutos foram armazenados em caixas de propileno (40x30x15 cm) com tampa a 10 °C e 90 ± 3 % de umidade relativa (UR) para o bolor azul. Para avaliação do bolor verde, os frutos foram armazenados em cestos de plástico (55x22x30 cm), em temperatura ambiente ($22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) e $90 \pm 3\%$. O experimento foi realizado em duplicata para cada fitopatógeno.

Para a avaliação da severidade, as lesões de bolor azul foram medidas a partir do 12º até o 24º dia de armazenamento, enquanto, para o bolor verde, as medições ocorreram a partir do 4º até 8º dia. Posteriormente, foi determinada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a fórmula de Shaner e Finney (1977), como descrito no item 3.8.1.

A incidência da doença foi determinada pela porcentagem de frutos doentes.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 4 repetições, com 15 frutos por repetição, para cada fitopatógeno.

3.9. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o Software de estatística AgroEstat e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo do Crescimento de *Aureobasidium pullulans*

Ao se observar a curva de crescimento de ACBL-77 cultivada em meio de cultura BDA, notou-se que a fase lag foi de 6 a 18 horas, a exponencial de 18 a 72 horas e a fase estacionária de 72 a 96 horas, iniciando sua fase de declínio a partir de 96 horas de incubação (Figura 1).

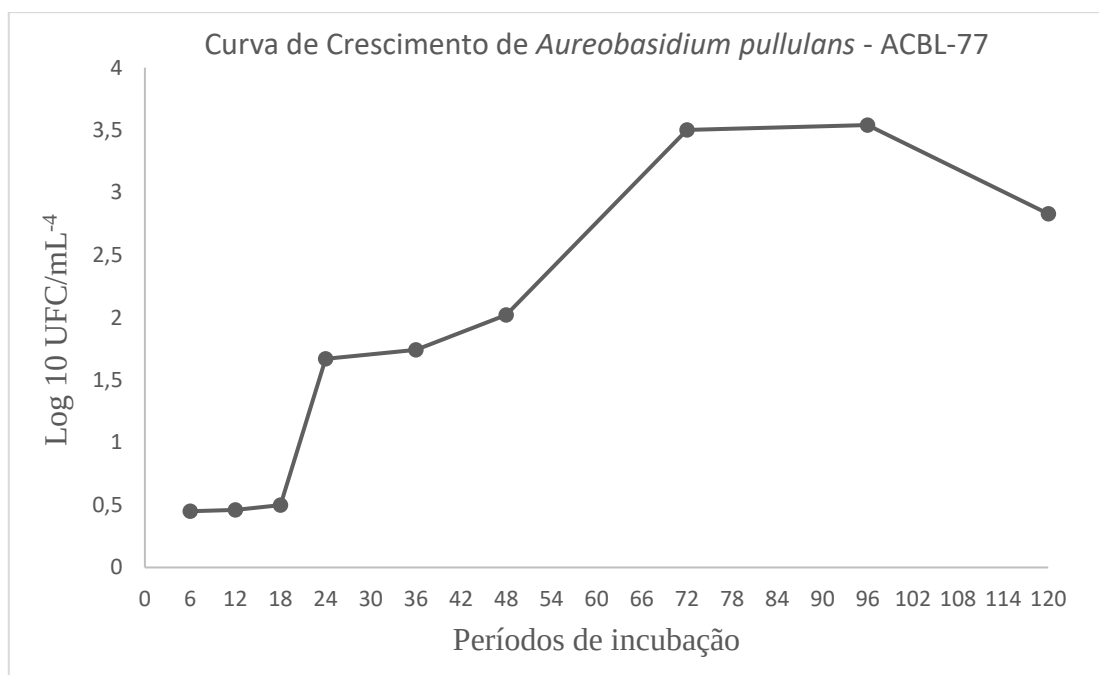


Figura 1: Curva de crescimento de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, cultivada em meio Batata-Dextrose-Ágar, em diferentes períodos de incubação.

4.2. Produção de sideróforo por *Aureobasidium pullulans*

Os dados referentes à produção de sideróforos pelas células de *A. pullulans* - ACBL-77 encontram-se ilustrados na Figura 2. A levedura apresentou produção de

sideróforos no teste visual qualitativo em todos os tempos de incubação testados (24, 48, 72, 92 e 120 horas).

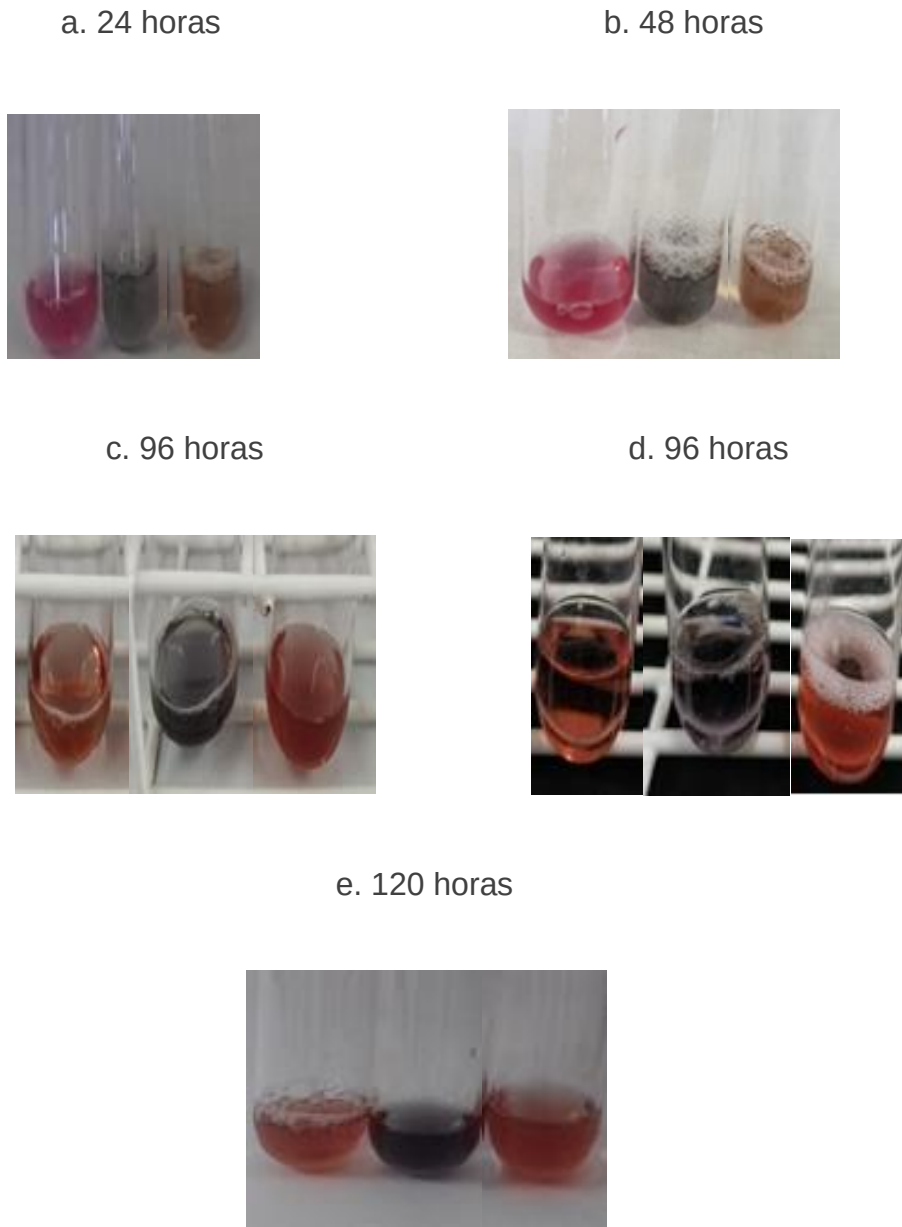


Figura 2: Avaliação qualitativa de produção de sideróforos por *Aureobasidium pullulans* - ACBL-77. Sendo, o primeiro tubo de cada imagem (referente a cada período) correspondente ao controle positivo (coloração rosada, presença de sideróforo); segundo tubo controle negativo, ausência de sideróforo; terceiro tubo, indicação de produção de sideróforo pela levedura.

4.3. Quantificação da produção de sideróforo por *Aureobasidium pullulans* em diferentes tempos de incubação

Os dados apresentados na Tabela 1 mostram que a maior produção de sideróforo ocorreu no período de 72 e 96 horas de incubação da levedura, não diferindo estatisticamente de 120 h. Sendo que a menor produção de sideróforo obtida no período de 24 horas de incubação.

Tabela 1: Quantificação de sideróforos em diferentes tempos de incubação.

Tempos de Incubação	Sideróforos (g/L)
24 horas	0,034 c ⁽¹⁾
48 horas	0,13 b
72 horas	0,21 a
96 horas	0,21 a
120 horas	0,17 ab

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

4.4. Avaliação da fonte de carbono e nitrogênio na produção de sideróforos por *Aureobasidium pullulans*

Os dados obtidos, após utilização da metodologia CAS líquido, mostraram que, quando se avaliou o efeito da combinação de uma fonte de carbono e de nitrogênio na produção de sideróforos pela levedura, verificou-se que sacarose (2,5%), independente da fonte de nitrogênio utilizada, aumentou a produção de sideróforo (6,97 a 6,87% de unidades de sideróforos, quando comparado com a maltose a 2,5% (6,06% de unidades de sideróforo) (Tabela 2). A fonte de carbono ou, de nitrogênio acrescido em meio de cultivo da levedura, não impediu a produção dessa substância, como ilustrado na Figura 3.

Tabela 2: Porcentagem de sideróforos produzidos por *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, após cultivo da levedura em meio pobre em ferro (MPF) acrescido de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Fontes Nutricionais	Reação CAS	Produção média %
2,5% Sacarose + 0,4% Sulfato de Amônio	Positivo	6,97 a ⁽¹⁾
2,5% Sacarose + 0,3% Nitrato de Amônio	Positivo	6,87 ab
2,5% Maltose + 0,4% Sulfato de Amônio	Positivo	6,06 b
2,5 % Maltose + 0,3% Nitrato de Amônio	Positivo	6,06 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% $MgSO_4$; 0,0002% $ZnSO_4$).

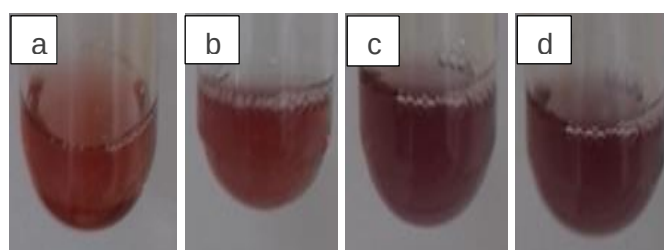


Figura 3: Avaliação qualitativa de sideróforos produzidos por *Aureobasidium pullulans* - ACBL-77 em meio pobre em ferro (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% $MgSO_4$; 0,0002% $ZnSO_4$) acrescido das fontes nutricionais: a – 2,5% Sacarose + 0,4% Sulfato de Amônio; b -2,5 Sacarose +0,3% Nitrato de Amônio; c – 2,5% Maltose +0,4% Sulfato de Amônio; d -2,5% Maltose + 0,3% Nitrato de Amônio.

Ao se utilizar a metodologia de perclorato de ferro para quantificação e qualificação de sideróforos produzidos pelas células de ACBL-77, foi verificado que os meios de cultura acrescidos de sacarose (2,5%) e com as diferentes fontes de nitrogênio apresentaram reações positivas quanto à produção de sideróforos (Tabela 3). A produção foi melhor em meio contendo sacarose (2,5%) e sulfato de amônio a 0,4%, (0,21 g/L), quando comparado com sacarose (2,5%) combinado com nitrato de amônio a 0,3% (0,11 g/L). No entanto, a utilização de maltose (2,5%) em meio de cultivo da levedura, independente da fonte de nitrogênio, impediu a identificação de produção de sideróforo por este método, como pode ser observado na Figura 4.

Tabela 3: Produção média de sideróforos por *Aureobasidium pullulans* - ACBL-77 em meio pobre em ferro (MPF) acrescido de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Fontes Nutricionais	Reação FeCl_3	Produção média (g/l)
2,5% Sacarose + 0,4% Sulfato de Amônio	Positivo	0,21 a ⁽¹⁾
2,5% Sacarose + 0,3% Nitrato de Amônio	Positivo	0,11 b
2,5% Maltose + 0,4 % Sulfato de amônio	Negativo	0,0 c
2,5% Maltose + 0,3% Nitrato de Amônio	Negativo	0,0 c

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% MgSO_4 ; 0,0002% ZnSO_4).

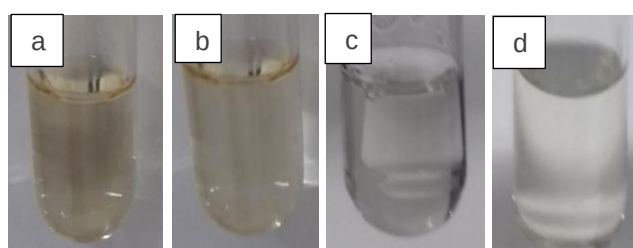


Figura 4: Avaliação qualitativa de sideróforos produzidos por *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 em meio pobre em ferro (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% MgSO_4 ; 0,0002% ZnSO_4) acrescido das fontes nutricionais: a – 2,5% Sacarose + 0,4% Sulfato de Amônio; b -2,5 Sacarose +0,3% Nitrato de Amônio; c – 2,5% Maltose +0,4% Sulfato de Amônio; d -2,5% Maltose + 0,3% Nitrato de Amônio. A coloração amarela e, ou branca, indica presença ou ausência de sideróforo, respectivamente, de acordo com a metodologia a base de perclorato de ferro.

4.5. Produção de biomassa de *Aureobasidium pullulans* cultivado em diferentes meios de cultura

Os dados apresentados na Figura 5 mostraram que a adição de maltose (2,5%), em meio pobre de ferro, para cultivo da levedura favoreceu a produção de biomassa, independente da fonte de nitrogênio utilizada. Tais tratamentos à base dessa fonte de carbono não diferiram entre si e do tratamento com o meio batata-dextrose (BD).

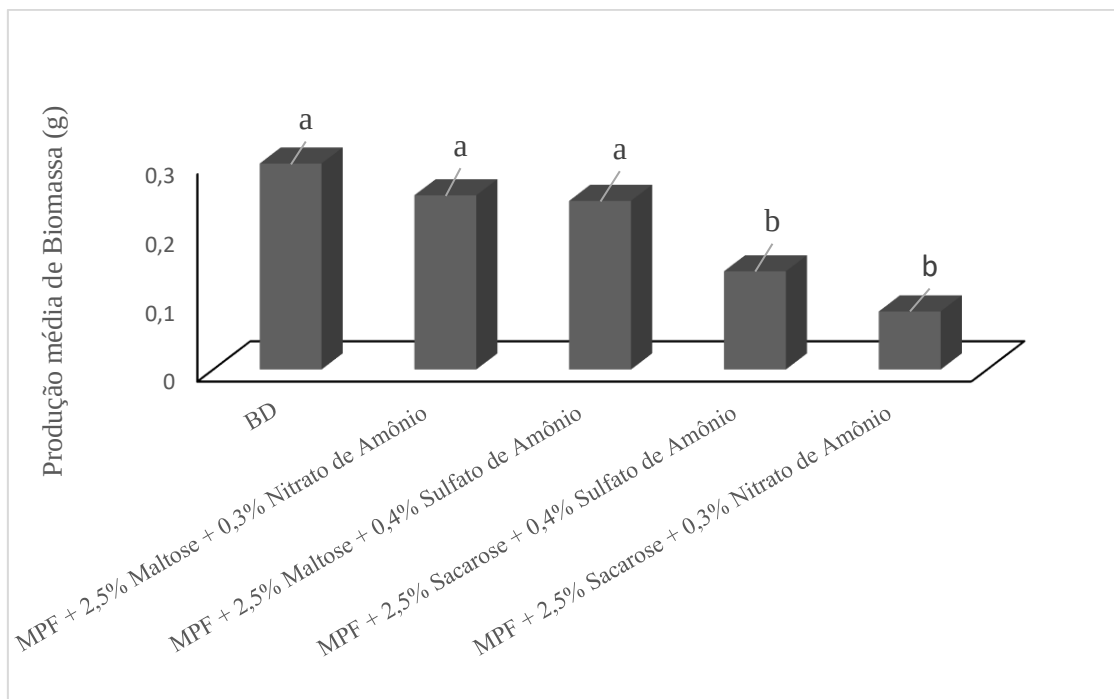


Figura 5: Produção média de biomassa de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77, após cultivo em diferentes meios de cultura. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = meio pobre em ferro (0,3% K_2HPO_4 ; 0,1% ácido cítrico; 0,008% $MgSO_4$; 0,0002% $ZnSO_4$). BD = Batata - dextrose (200g de batata + 20g de dextrose + água até completar 1L).

4.6. Interações *in vitro*

4.6.1. Avaliação da porcentagem de conídios germinados de *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, após interação com a levedura ou, do seu sideróforo produzido

Os dados apresentados nas Tabelas 4 e 5 mostram que células da levedura inibiram a germinação dos conídios de *P. italicum* e *P. digitatum*, independentemente do meio de cultivo do microrganismo.

Os valores de inibições da germinação dos conídios de *P. italicum* e *P. digitatum* variaram em torno de 94 a 95% e de 82,6 e 85,6%, respectivamente, em relação aos tratamentos testemunha.

Quando conídios de *P. italicum* foram colocados em contato com o sideróforo produzido pela levedura, a substância favoreceu a germinação do fungo. Por outro lado, para os conídios de *P. digitatum*, a substância apresentou um efeito contrário, inibindo a germinação em 79,4%.

Tabela 4: Porcentagem de conídios germinados de *Penicillium italicum*, após interação com a levedura *Aureobasidium pullulans* (cultivada em diferentes meios de cultura) ou, com o sideróforo produzido.

Tratamentos	% de conídios germinados de <i>P. italicum</i>	% de Inibição em relação a testemunha
Testemunha	71,4 b ⁽¹⁾	-
Sideróforo	98,6 a	-38,0
ACBL-77 + MPF + Sacarose (2,5%)+Sulfato de Amônio (0,4%)	3,6 c	95,0
ACBL-77 + BDA	4,0 c	94,41

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro. BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose + 15 de água + água até completar 1L).

Tabela 5: Porcentagem de conídios germinados de *Penicillium digitatum*, após interação com a levedura *Aureobasidium pullulans* (cultivada em diferentes meios de cultura) ou, com o sideróforo produzido.

Tratamentos	% de conídios germinados	% de Inibição em relação à testemunha
Testemunha	76,37 a ⁽¹⁾	-
Sideróforo	15,7 b	79,4
ACBL-77 + MPF + Sacarose (2,5%)+0,4% Sulfato de Amônio (0,4%)	13,3 b	82,6
ACBL-77+ BDA	11,0 b	85,6

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro. BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose + 15 de água + água até completar 1L).

4.6.2. Avaliação do crescimento micelial de *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, após cultivo em diferentes meios, acrescidos, ou não, de células de levedura ou de sideróforo

O maior crescimento micelial de *P. italicum* ocorreu no meio de cultura batata-dextrose, na ausência da levedura, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Quando se cultivou o fungo em meio BD ou, em meio pobre em ferro na presença da levedura, verificou-se que houve diminuição, significativa, do desenvolvimento do patógeno, no entanto, esses tratamentos não diferiram entre si e, nem dos

tratamentos à base de meio pobre em ferro sem a levedura ou, com a substância (sideróforo) (Figura 6).

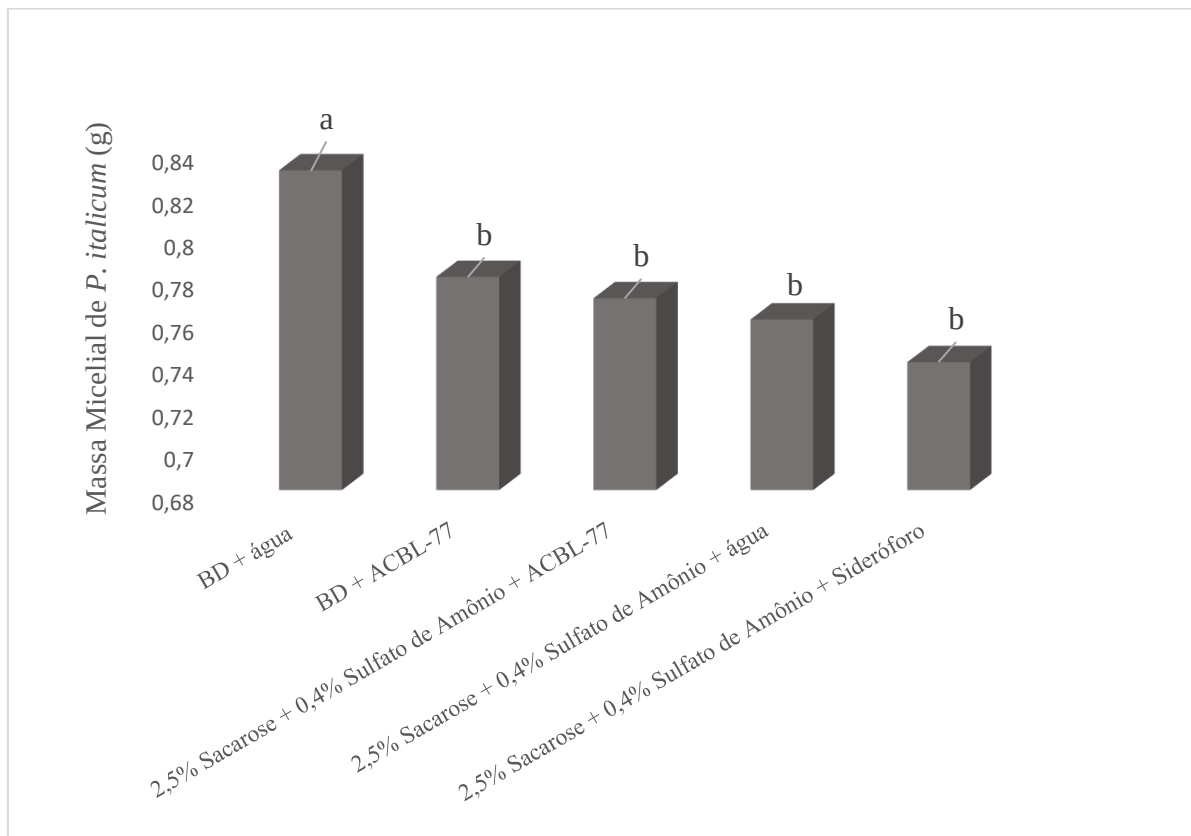


Figura 6: Avaliação do crescimento micelial de *Penicillium italicum*, após cultivo em meios batata-dextrose ou, meio pobre em ferro, acrescidos, ou não, da levedura *Aureobasidium pullulans* ou do sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$. MPF = K_2HPO_4 (0,3%) + ácido cítrico (0,1%) + $MgSO_4$ (0,008%) + $ZnSO_4$ (0,0002%). BD = Batata - dextrose (200g de batata + 20g de dextrose + água até completar 1L).

Quando o fungo *P. digitatum* é cultivado meio pobre em ferro contendo a levedura, ou água, ou a substância sideróforo, o seu desenvolvimento micelilar é menor, não havendo diferença estatística entre os tratamentos. Por outro lado, quando o fungo é cultivado em meio BD, independente da presença ou ausência da levedura, apresenta um crescimento micelial maior, diferindo significativamente, dos demais tratamentos, porém, não havendo diferença entre si (Figura 7).

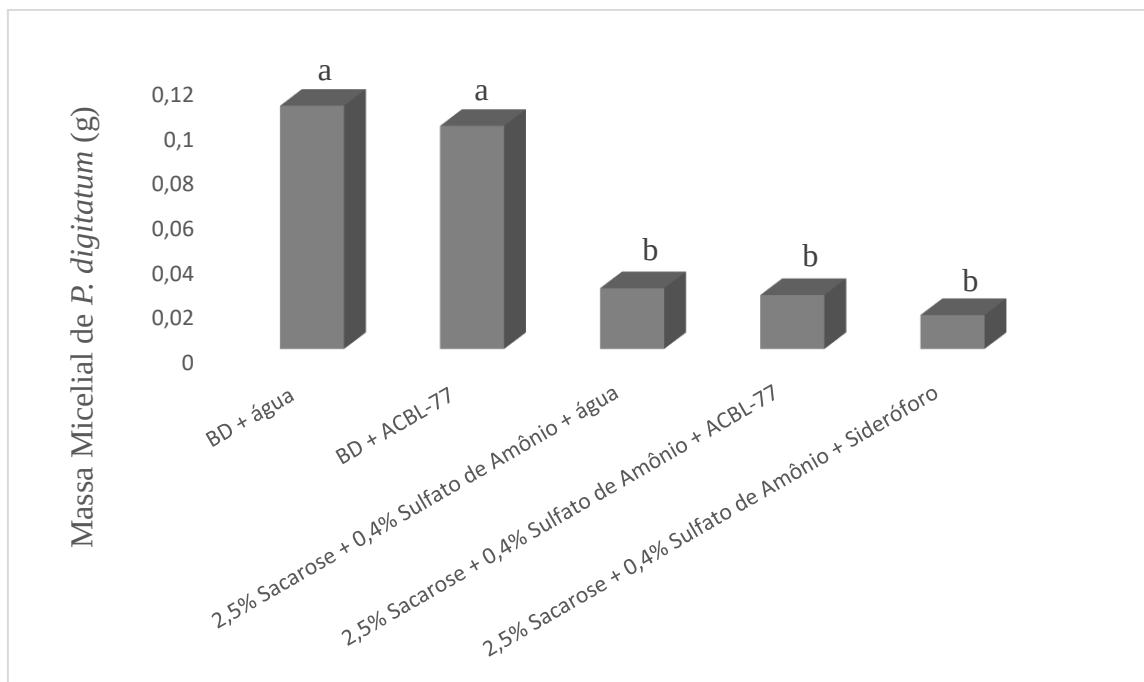


Figura 7: Avaliação do crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, após cultivo em meios batata-dextrose ou, meio pobre em ferro, acrescidos, ou não, da levedura *Aureobasidium pullulans* ou do sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = K_2HPO_4 (0,3%) + ácido cítrico (0,1%) + $MgSO_4$ (0,008%) + $ZnSO_4$ (0,0002%). BD = Batata - dextrose (200g de batata + 20g de dextrose + água até completar 1L).

4.7. Interações *in vivo*

4.7.1 Atividade antifúngica *in vivo* de *Aureobasidium pullulans* contra *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*

4.7.1.1. Bolor azul

Frutos de laranja Pera tratados com a levedura *A. pullulans* (ACBL-77) de forma curativa apresentaram as menores lesões de bolor azul, não diferindo do tratamento químico. Sideróforo utilizado preventivamente ou, curativamente, aumentou o tamanho das lesões nos frutos inoculados com o fitopatógeno, não diferindo estatisticamente da testemunha (Figura 8).

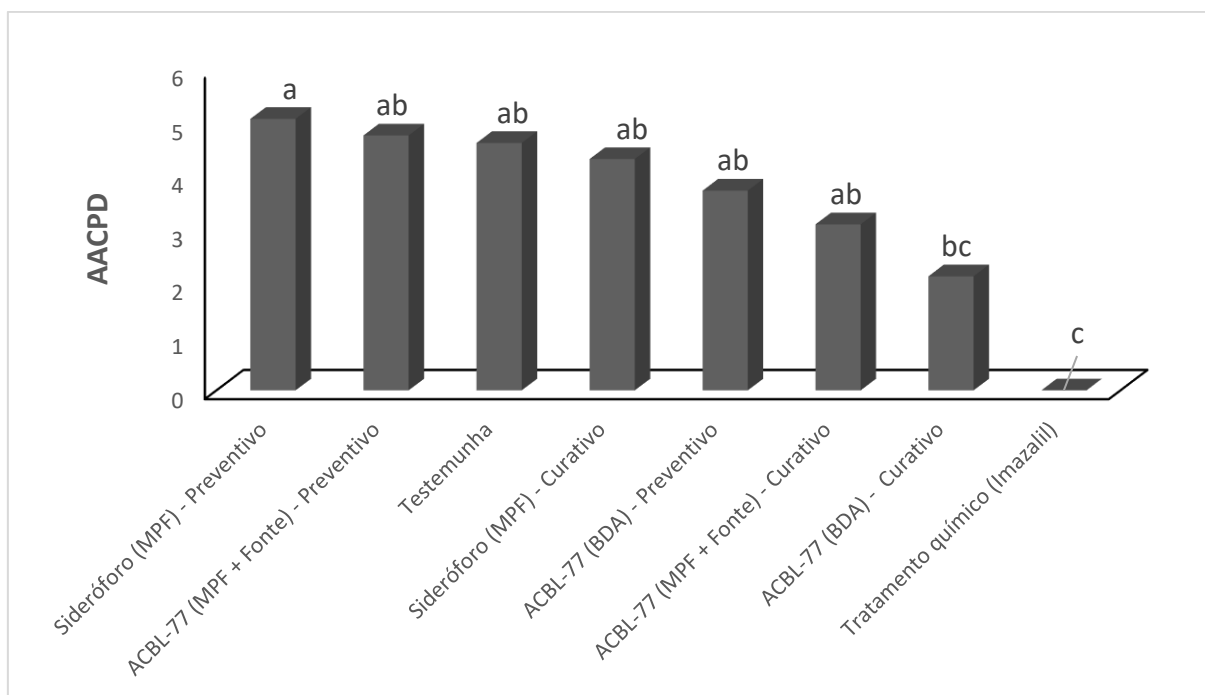


Figura 8: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Pera, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose + 15 g água + água até completar 1L).

Quando se avaliou a incidência de bolor azul em frutos de laranja Pera, os melhores controles foram obtidos pela aplicação curativa da levedura, cultivada em meio pobre em ferro e BDA, com porcentagens de frutos sadios que variaram de 33,7 a 46%, respectivamente. O tratamento químico (imazalil) apresentou 100% de frutos sadios (Tabela 6).

Tabela 6: Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor azul, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo.

Tratamentos	% de frutos doentes	% de controle em relação à testemunha
Sideróforos Preventivo	100,0a ⁽¹⁾	-5
Testemunha	95,0 a	-
ACBL-77 (Cultivada em BDA) - Preventivo	90,0 a	5,2
ACBL-77 (cultivada em MPF + Fonte) – Preventivo	88,3 a	7,05
Sideróforo - Curativo	85,0 ab	10,53
ACBL-77 (cultivada em MPF + Fonte) – Curativo	63,0 bc	33,7
ACBL-77 (cultivada em BDA) - Curativo	51,6 c	46,0
Tratamento químico (imazalil)	0,0 d	100

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro. Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose +15 g ágar + água até completar 1L).

As menores lesões de bolor azul, em frutos de laranja Lima, foram obtidas em frutos tratados de forma curativa com a levedura ACBL-77 cultivada previamente em meio BDA. Esse tratamento não diferiu do tratamento químico. Sideróforo aplicado preventivamente ou, curativamente nos frutos proporcionaram os maiores tamanhos das lesões da doença, não diferindo dos tratamentos testemunha e com aplicação da levedura cultivada em BDA de forma preventiva (Figura 9).

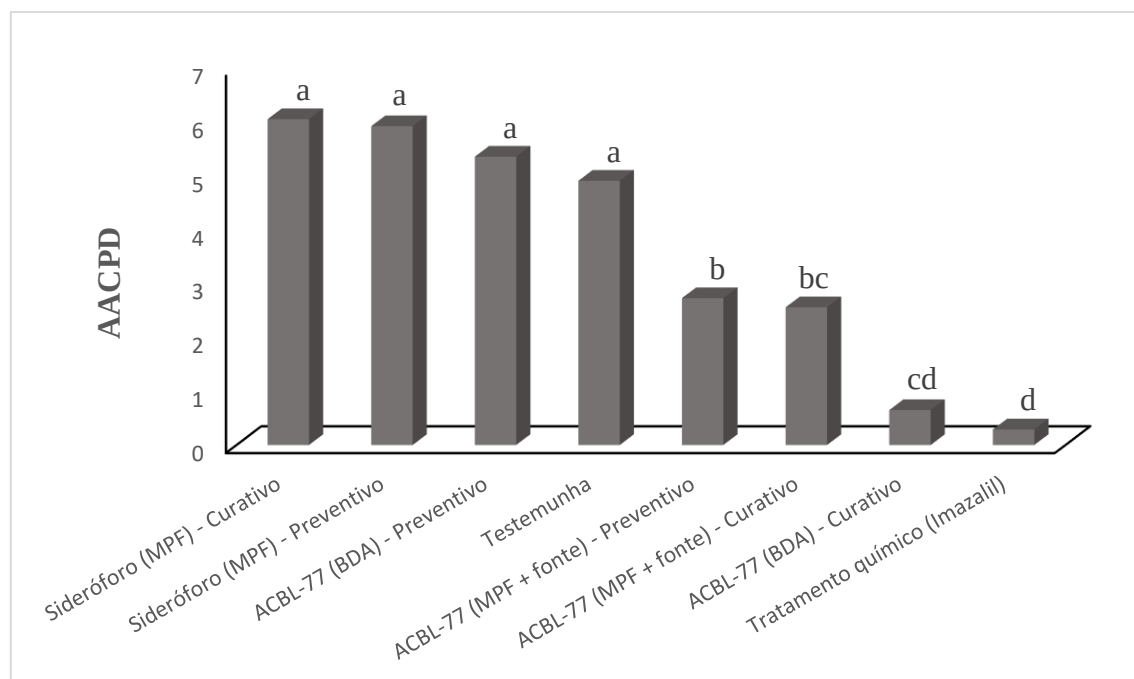


Figura 9: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose + 15 g água + água até completar 1L).

Quando se avaliou a incidência de bolor azul em frutos de laranja Lima, observou-se que frutos tratados com a levedura de forma curativa, previamente cultivada em BDA, apresentaram 53% de controle de bolor azul, não diferindo estatisticamente do tratamento químico, com 93% de frutos assintomáticos (Tabela 7).

Tabela 7: Porcentagem de frutos de laranja Lima com sintomas de bolor azul, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo.

Tratamentos	% de frutos doentes	% de Controle em relação à testemunha
Sideróforo – Preventivo	65,0 a ⁽¹⁾	-10
ACBL-77 (cultivada em BDA) - Preventivo	59,0 a	0
Testemunha (frutos inoculados e sem tratamento)	59,0 a	-
Sideróforo – Curativo	57,0 a	3,39
ACBL-77 (cultivada em MPF + Fonte) – Curativo	51,0 ab	13,6
ACBL-77 (cultivada em MPF + Fonte) – Preventivo	49,0 ab	17
ACBL-77 (cultivada em BDA) - Curativo	27,7 bc	53
Tratamento químico (imazalil)	4,0 c	93,2

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro. Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-ágar (200g de batata + 20g de dextrose +15 g ágar + água até completar 1L).

4.7.1.2. Bolor Verde

Frutos de laranja Pera tratados de forma preventiva, contendo levedura ou sideróforo sozinho, independente do meio de cultura, diminuíram o tamanho das lesões de bolor verde e apresentaram em torno de 20% de frutos sadios, diferindo, estatisticamente dos tratamentos que foram aplicados de forma curativa. O melhor controle, significativo, da doença foi obtido quando os frutos foram tratados com imazalil, com 100% de frutos sadios (Tabela 8 e Figura 10).

Tabela 8: Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor verde, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo.

Tratamentos	% de frutos doentes	% de controle em relação à testemunha
Testemunha	100,0a ⁽¹⁾	-
ACBL-77 (Cultivada em BDA) - Curativo	100,0 a	0
Sideróforos – Curativo	100,0 a	0
ACBL-77 (Cultivada em MPF + Fonte)- Curativo	100,0 a	0
ACBL-77 (Cultivada em BDA) - Preventivo	79,3 b	20,7
Sideróforos Preventivo	79,2 b	20,8
ACBL-77 (cultivada em MPF + Fonte) - Preventivo	79,2 b	20,8
Tratamento químico (imazalil)	0,0 c	100

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro. Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose +15 g água + água até completar 1L).

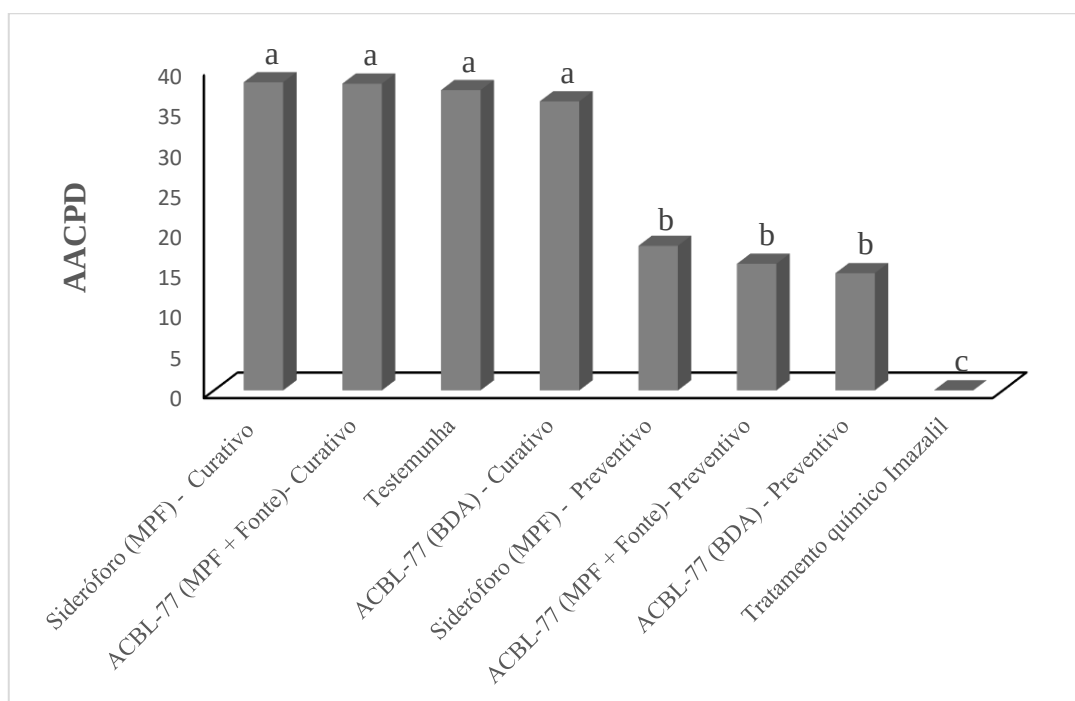


Figura 10: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pera, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%)

+ Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-ágar (200g de batata + 20g de dextrose +15 g ágar + água até completar 1L).

Com relação aos frutos de laranja Lima, os resultados de severidade da doença foram semelhantes aos obtidos para a variedade de laranja Pera, em que frutos tratados preventivamente contendo levedura ou sideróforo sozinho, independente do meio de cultura, diminuíram, significativamente, o tamanho das lesões de bolor verde, quando comparado com o tratamento testemunha (frutos sem tratamento). O melhor controle da doença foi obtido quando os frutos foram tratados com imazalil, no entanto, esse tratamento não diferiu estatisticamente dos frutos tratados com a levedura, cultivada em meio BDA e aplicada de forma preventiva (Figura 11).

Com relação à avaliação de incidência da doença, todos os tratamentos aplicados preventivamente apresentaram em torno de 23 a 25% de frutos sadios, diferindo, estatisticamente, dos tratamentos que foram aplicados de forma curativa. Frutos tratados com o fungicida apresentaram 100% de controle da doença, diferindo, significativamente dos demais tratamentos (Tabela 9).

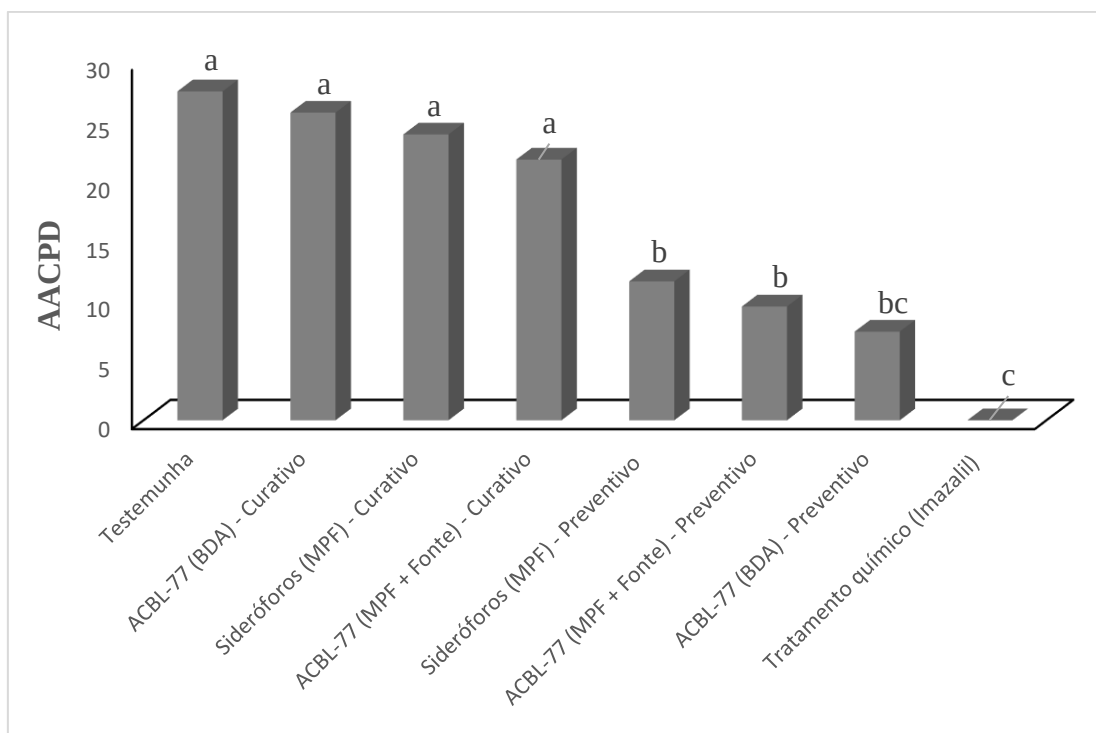


Figura 11: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Lima, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* – ACBL-77 ou, sideróforo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro; Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose + 15 g ágar + água até completar 1L).

Tabela 9: Porcentagem de frutos de laranja Lima com sintomas de bolor verde, após tratamento preventivo e curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* ou, sideróforo.

Tratamentos	% de frutos doentes	% de controle em relação à testemunha
Testemunha	100,0a ⁽¹⁾	-
ACBL-77 (Cultivada em BDA) - Curativo	100,0 a	0
Sideróforos - Curativo	98,0 a	2,0
ACBL-77 (Cultivada em MPF + Fonte)- Curativo	92,3 a	7,7
ACBL-77 (Cultivada em BDA) - Preventivo	77,0 b	23,0
Sideróforos Preventivo	75,3 b	24,7
ACBL-77 (cultivada em MPF + Fonte) - Preventivo	75,3 b	24,7
Tratamento químico (imazalil)	0,0 c	100

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). MPF = Meio pobre em ferro. Fonte = Sacarose (2,5%) + Sulfato de amônio (0,4%). BDA = Batata-dextrose-água (200g de batata + 20g de dextrose + 15 g ágar + água até completar 1L).

4.7.2. Efeito da combinação de *Aureobasidium pullulans* e do fungicida imazalil no controle do bolor azul e do bolor verde

4.7.2.1. Bolor azul

Quando se avaliou a severidade da doença, após os tratamentos dos frutos de laranja Pêra com diferentes doses do fungicida, combinado, ou não, com a levedura, observou-se que, todos os tratamentos diferiram da testemunha. A combinação dos dois métodos favoreceu, significativamente, o controle da doença, com os menores tamanhos de lesões em relação à aplicação da levedura sozinha. Com relação à combinação, especificamente, os menores tamanhos de lesões de bolor azul foram obtidos nos frutos tratados com levedura combinado com metade da dose do fungicida (1 mL/L) ou com dose cheia (2 mL/L), os quais não diferiram, estatisticamente, entre si e nem do tratamento químico aplicado sozinho (2 mL/L). (Figura 12).

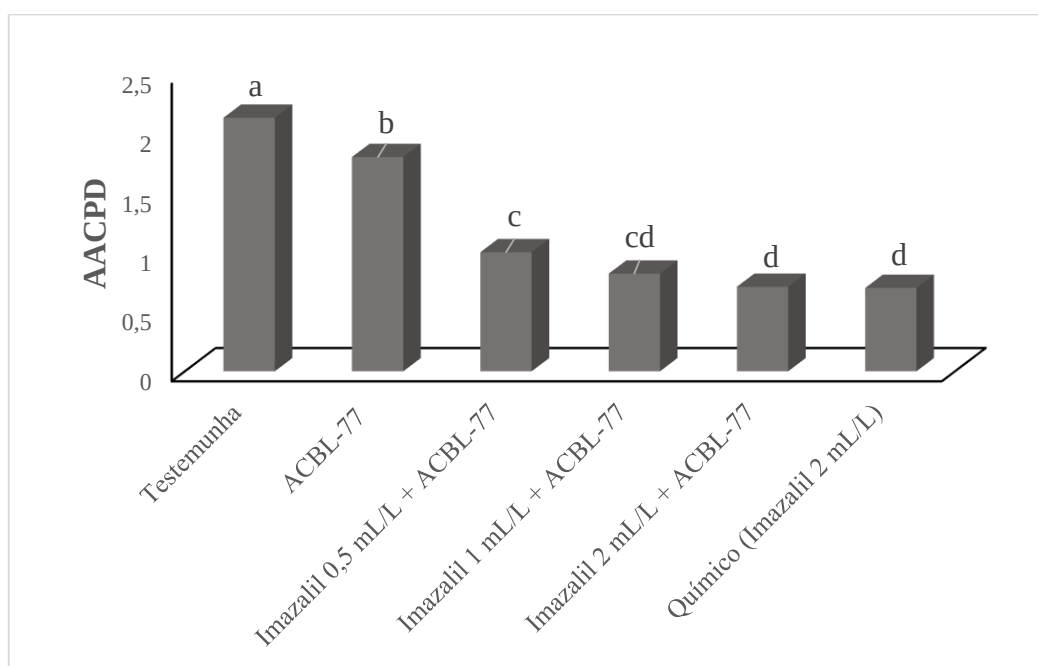


Figura 12: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium italicum* em frutos de laranja Pera, após tratamento curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* associada ou não com diferentes dosagens do fungicida imazalil. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

Quando se avalia a incidência de doença, os melhores tratamentos foram a combinação da levedura com metade da dose (1mL/L) e com a dose cheia (2mL/L) do fungicida e com frutos tratados apenas com imazalil (2mL/L), com porcentagens de controle da doença de 85, 100 e 100%, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10: Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor azul, após tratamento curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* associado ou não com diferentes doses de Imazalil.

Tratamentos	% de frutos doentes	% de controle em relação à testemunha
Testemunha	87,0 a ⁽¹⁾	-
ACBL-77	45,25 b	48
Imazalil 0,5 mL/L + ACBL-77	27,0 c	69
Imazalil 1 mL/L + ACBL-77	13,25 d	85
Imazalil 2 mL/L + ACBL-77	0,0 e	100
Tratamento químico (Imazalil 2 mL/L)	0,0 e	100

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

4.7.2.2. Bolor verde

Os frutos tratados de forma preventiva com a levedura *A. pullulans* -ACBL-77 combinada com as diferentes doses de imazalil (0,5, 1,0 e 2,0 mL/L) apresentaram os menores tamanhos de lesões de bolor verde, não diferindo estatisticamente do tratamento químico padrão (imazalil, 2mL/L) (Figura 13).

Frutos tratados com a levedura combinada com as doses 0,5; 1,0 e 2,0 mL/L do fungicida imazalil apresentaram 93,5; 95 e 100% de frutos sadios, respectivamente. O tratamento com a levedura sozinha proporcionou 20% de controle (Tabela 11).

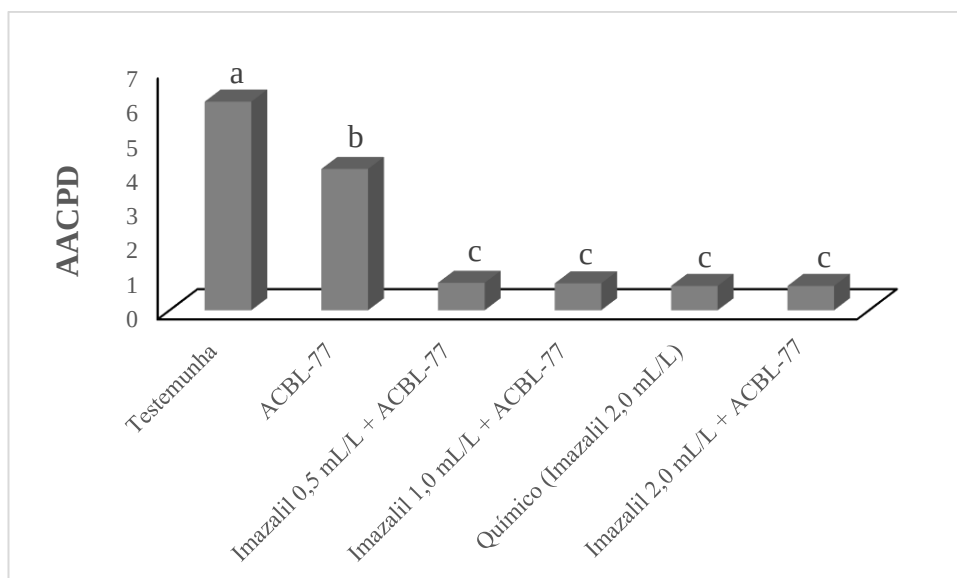


Figura 13: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o diâmetro médio de lesões ocasionadas por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pera, após tratamento curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* – ACBL-77 associada ou não com diferentes dosagens do fungicida imazalil. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

Tabela 11: Porcentagem de frutos de laranja Pera com sintomas de bolor verde, após tratamento curativo com a levedura *Aureobasidium pullulans* associado ou não com diferentes doses de imazalil.

Tratamentos	% de frutos doentes	% de controle em relação à testemunha
Testemunha	100,0 a ⁽¹⁾	-
ACBL-77	90,0 b	20
Imazalil 0,5 mL/L + ACBL-77	6,5 c	93,5
Imazalil 1 mL/L + ACBL-77	5,0 c	95
Imazalil 2 mL/L + ACBL-77	0,0 c	100
Tratamento químico (Imazalil 2mL/L)	0,0 c	100

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

5. DISCUSSÃO

O uso de leveduras antagonistas para controle de doenças em pós-colheita é considerado uma alternativa aos fungicidas sintéticos (Geng et al., 2011). Estudos anteriores realizados por Ferraz et al. (2016) relataram o potencial do isolado ACBL-77 (*A. pullulans*) para o biocontrole de podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*) em frutos de laranja Pera. Portanto, dando continuidade a essa linha de pesquisa, esse trabalho teve por objetivo verificar a produção e quantificação de sideróforos por *A. pullulans*, como mecanismo de ação, assim como, verificar a capacidade da levedura em controlar o bolor azul (*Penicillium italicum*) o bolor verde (*P. digitatum*) em frutos de laranja. Esse estudo, também, quis analisar se o controle biológico poderia ser associado com o controle químico, visando um manejo das doenças de forma mais sustentável.

Pelos dados apresentados neste estudo foi possível verificar que o isolado ACBL-77 produziu sideróforo num período de 24 a 120 horas de incubação da levedura. Ao quantificar a produção de sideróforos, 72 e 96 horas foi o período em que *A. pullulans* produziu maior quantidade de sideróforos. Pelos dados obtidos quando se determinou a curva de crescimento da levedura, 72 horas é o início da fase estacionária do microrganismo, enquanto 96 horas corresponde à fase de declínio da levedura. Alguns autores, como, Liles et al. (2000) e Oliveira et al. (2006) ao estudarem os isolados de *Legionella pneumophila* e *Saccharopolyspora erythraea*, respectivamente, mostraram que a maior produção de sideróforos por esses microrganismos ocorreu no início da fase estacionária de crescimento. Por outro lado, Wang et al. (2009) ao trabalharem com um isolado de *A. pullulans* verificaram que a maior produção da substância ocorreu no período de 120h de crescimento, período esse correspondente à fase estacionária do isolado.

Quando se avaliou o efeito da combinação de uma fonte de carbono e de nitrogênio em meio pobre em ferro, para otimizar a produção de sideróforos pela levedura, verificou-se que sacarose (2,5%), independente da fonte de nitrogênio utilizada, aumentou a produção de sideróforo. A utilização de sacarose como fonte de carbono para produção de sideróforos, também, foi relatado nos trabalhos de Chi et al. (2012) e Calvente et al. (2001). Sobre o cultivo em meio de cultura pobre em ferro, Calvente, et al. (1999) relataram que a produção de sideróforos por duas cepas de *Rhodotorula glutinis*, foi maior na presença de concentrações pobres em ferro. Esses

autores, assim como outros na literatura (Zhu et al., 2005; Renshaw et al., 2002) relataram que para os organismos que apresentam esse mecanismo de ação, o meio de cultivo pobre em ferro estimula a produção de sideróforos.

De acordo com Payne (1994), meios de culturas com deficiência de ferro podem apresentar uma taxa de crescimento do microrganismo mais lenta e, conseqüentemente, uma menor produção de biomassa. No respectivo trabalho, ficou evidente que a produção de células da levedura foi inversamente proporcional à produção de sideróforo, fato esse que pode ser explicado pela adição das fontes de carbono em meio pobre em ferro. A adição de maltose (2,5%) favoreceu a produção de biomassa, enquanto, diminuiu a produção de sideróforo. O efeito contrário foi verificado quando se utilizou sacarose (2,5%) como fonte de carbono.

Trabalhos comprovam a produção de sideróforos, como mecanismo de ação contra diversos fitopatógenos (Lacava et al., 2008; Manwar et al., 2004). Os ensaios *in vitro*, realizados no respectivo estudo, demonstraram que o isolado ACBL-77 sozinho foi capaz de inibir a germinação de conídios de *P. italicum* e *P. digitatum*, independente do meio de cultivo do microrganismo, ou seja, meio pobre em ferro ou meio batata-dextrose. Um fato interessante observado neste trabalho, é que quando a substância sideróforo, produzida pela levedura, foi colocada sozinha em contato com os conídios dos fitopatógenos, a germinação de *P. italicum* foi favorecida, enquanto, para *P. digitatum* a substância provocou inibição da germinação de seus conídios em torno de 79%. Essa diferença com relação à ação dessa substância sobre os fitopatógenos pode ser explicada com a observação relatada pelos autores Oberegger et al. (2001). Segundo os autores, fungos da espécie *Aspergillus* (*A. quadricinctus*, *A. fumigatus* e *A. melleus*) possuem um sistema de absorção de sideróforos que são produzidos por eles mesmos ou, por outros microrganismos. Esse sistema age como mecanismo de competição para adquirir e armazenar o ferro, que é um nutriente essencial para os microrganismos. Portanto, alguns fungos podem absorver sideróforo, como é o exemplo de *A. nidulans*, citado pelos autores, que absorve sideróforo ferrirubina do tipo hidroxamato e o sideróforo enterobactina do tipo catecolato, que são produzidos por enterobactérias. Pelos resultados deste trabalho é possível que *P. italicum* possa ter essa capacidade de absorção do sideróforo produzido pela levedura, no entanto, novos estudos para comprovar essa hipótese devem ser desenvolvidos.

Os resultados dos ensaios *in vivo* com frutos de laranja mostraram que tratamentos utilizando apenas o sideróforo, produzido pela levedura, não tem efeito no controle do bolor azul. No entanto, quando suspensões de células de *A. pullulans*-ACBL-77 foram aplicadas de forma curativa sobre os frutos de laranja Pera e Lima, a porcentagem de controle foi de 46 e 53%, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Cunha et al. (2018), segundo os autores, quando frutos de laranja Valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram tratados curativamente por *Candida stellimalicola*-ACBL-08, reduziu em 57% a ocorrência de frutos com sintomas da doença. Luo, et al. (2012) trabalhando com a levedura *Pichia membranefaciens* e Obagwu e Korsen (2003) com diferentes isolados de *Bacillus subtilis* relataram a eficiência desses agentes de controle biológico contra *P. italicum* em frutos cítricos.

Os ensaios *in vivo* para controle do bolor verde mostraram que os tratamentos em que se utilizou suspensões da levedura *A. pullulans* ou de sideróforo sozinho, aplicados de forma preventiva apresentaram porcentagens de controle do bolor verde em frutos de laranja, em torno de 21 a 25%. Tais resultados não corroboram com outros autores, que encontraram porcentagens de controle bem maiores. Moretto et al. (2014), ao trabalharem com *Saccharomyces cerevisiae* ACB-CR1, obtiveram 87% de frutos de laranja Hamlin sadios, e 73% em lima ácida Tahiti utilizando o isolado ACB-K1 de *S. cerevisiae*, aplicado de forma preventiva.

Fungicidas, como imazalil e thiabendazol são os mais utilizados para o controle de bolores em frutos cítricos (Cunningham e Taverner, 2014; Palou, 2008, 2014). A combinação de agentes de controle biológico e produtos químicos além de poder aumentar a eficiência de controle de patógenos, que ocorrem na fase de pós-colheita, também, pode contribuir para minimizar os problemas relacionados à presença de resíduos nas frutas (Qin e Tian, 2004). Os ensaios, utilizando menores dosagens do fungicida imazalil combinado com a levedura *A. pullulans*, mostraram a eficiência no controle dos bolores, com reduções de frutos doentes na ordem de 69 a 85% para *P. italicum* e de 95% para *P. digitatum*, quando comparado às testemunhas (frutos não tratados). Esses resultados corroboram com outros autores, que comprovaram a eficiência do uso de agentes de biocontrole combinados com menores doses de fungicidas (Kinay et al., 2001; Zhou et al., 2002; Usall et al., 2001).

A condição de armazenamento dos frutos à 10°C, utilizada durante o teste de biocontrole do bolor azul se mostrou adequada e deu indícios de que *A. pullulans* - ACBL-77 conseguiu desempenhar a sua função antagônica mesmo em baixas

temperaturas. Considerando que o uso de câmaras frias é uma das estratégias de controle para frutas e legumes em pós-colheita (Zhang et al., 2005), a combinação do controle biológico com o armazenamento em baixa temperatura poderia diminuir os problemas de doença.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- a) *Aureobasidium pullulans*-ACBL-77 produz sideróforos e sua produção foi aumentada com a adição de sacarose (2,5%) em meio de cultivo da levedura;
- b) O sideróforo, produzido pela levedura, pode ser um dos mecanismos de ação contra *Penicillium digitatum*, mas não tem ação antagônica contra *P. italicum*;
- c) A aplicação de forma curativa de suspensões da levedura apresentou potencial para controle do bolor azul;
- d) Aplicações preventivas de células da levedura apresentaram controle sobre o bolor verde, porém, com baixa porcentagem de controle;
- e) A combinação de *A. pullulans* com menores doses do fungicida imazalil foi eficiente para o controle do bolor azul e do bolor verde, em frutos de laranja. Nesse aspecto, tal estratégia de controle pode ser recomendada como uma nova tecnologia a ser empregada durante o beneficiamento em *packing-house*, visando diminuir a quantidade de resíduos nos frutos cítricos.

8. REFERÊNCIAS

- 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. Australas. **Plant Pathol.** 31:223–229
- Almeida OC, Passos SO (2011) Citricultura brasileira em busca de novos rumos – Desafios e oportunidades na região Nordeste. **Embrapa Mandioca e Fruticultura** 9:9-13.
- Ballester AR, Lafuente M, González-Candelas, L (2006) Spatial study of antioxidante enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biology and Technology** 39:115-124, doi:10.1016/j.postharvbio.2005.10.002

Barkai-Golan R (2001) Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control. **Elsevier**, Amsterdam 418p.

Bencheqroun SK, Bajji M, Massart S, Labhilili M, Jaafari S, 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 Biol. Technol** 46:128-135.

Benite AMC, Machado SP, Machado BC (2002) Sideróforos. Uma resposta dos microrganismos. **Química Nova**, São Paulo 25:1155-1164. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700016>

Ben-Yehoshua S, Mercier J (2005) UV irradiation, biological agents, and natural compounds for controlling postharvest decay in fresh fruits and vegetables. **Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality**, Boca Raton, FL, USA 265–299p.

Bergamim Filho A, Kimati H, Amorim L (1995) **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Ceres, p. 919.

Bettiol W, Morandi BAM, Pinto VZ, Júnior PJT (2012) Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 99-101.

Blondelle SE, Houghten RA (1992) Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. **Biochemistry** 31:12688-12694. <https://doi.org/10.1021/bi00165a020>

Borges ACG, Costa VMHM (2006) A Evolução do Agronegócio Citrícola Paulista e o Perfil da Intervenção do Estado. **Revista UNIARA** 17:101-123. Doi: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2006.v9i2.270>

Broekaert WF, Cammue BP, De Bolle MF, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW (1997) Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews in Plant Science** 16: 297–323. <https://doi.org/10.1080/07352689709701952>

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW (1995) Plant defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. **Plant Physiology** 108:1353–1358. Doi: 10.1104/pp.108.4.1353

Buriticá JR, Alfonso CAA, Zapata JC (2019) Guia ilustrada de enfermidades en poscosecha de frutas y verduras y sus agentes causantes em Colombia. **Academia Colombiana de Ciencias Exactas**, Bogotá, D.C 38:33-519.

Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on

Penicillium digitatum and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology** 43:73–79. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00099-3)

Calvente V, Benuzzi D, Tosetti, MIS (1999) Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the post-harvest pathogen *Penicillium expansum*. **Int. Biodeter. Biodegrad** 43:167–172. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00046-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00046-3)

Calvente V, Orellano ME, Sansone G, Benuzzi D, Tosetti, MIS (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>

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>

Cattelan AJ (1999) Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja. Documentos** 139:36.

Chien PJ, Chou CC (2006) Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Takan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). **Journal of the Science of Food and Agriculture** 86:1964-1969. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2570>

Chi Z, Wang XMZ, Buzdar MA, CHI, ZM (2012). The unique role of siderophore in marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2. **Biomaterials** 25:219-230. Doi: 10.1007/s10534-011-9499-1.

Coelho AR, Hoffmann FL, Hirooka EY (2003). Biocontrol by yeasts: perspectives in application for fruits safety: a review. **Semina: Ciências Agrárias** 24:337-358.

Cunha T, Ferraz LP, Wehr PP, Kupeer 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>.

Cunningham MN, Taverner DP (2014) Efficacy of integrated postharvest treatments against mixed inoculations of *penicillium digitatum* and *geotrichum citri-aurantii* in 'leng' navel oranges (*citrus sinensis*). New Zealand. **Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand 35:187192. <http://dx.doi.org/10.1080/01140670709510184>

Eckert JW (1993) Post-harvest diseases of citrus fruits. **Agriculture Outlook**, Paris, 54:225-232. <https://doi.org/10.1177/003072707800900506>

Eckert JW, Eaks IL (1989) Postharvest disorders and diseases of *citrus* fruits. In: Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.), **The Citrus Industry**. DANR. University of California Press, Berkeley, CA, USA, 179–260 p.

EFSA (2012) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Candida oleophila* strain O. **European Food Safety Authority Journal** 10:2944.

El-Ghaouth A, Smilanick JL, Wilson CL (2000) Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology** 19:103–110. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00076-4)

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>

Fan F, Tao N, Jia L, He X (2014) Use of citral incorporated in postharvest wax of citrus fruit as a botanical fungicide against *Penicillium digitatum*. **Postharvest Biology and Technology** 90:52-55. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.005>

Feichtenberger, E (1996). Mancha–preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja** 17:93-108.

Ferraz LP, Cunha T, Silva AC, Kupper KC (2016) Biocontrol Ability and Putative Mode of Action of Yeasts Against *Geotrichum citri-aurantii* in Citrus Fruit. **Microbiological Research** 188:72–79. <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 mould of apple. **Biocontrol Science and Technology** 8:243-256. <https://doi.org/10.1080/09583159830315>

Francesco A (2015) **Aureobasidium pullulans as biological control agent: modes of action**. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Dottorato Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Itália.

Geng P, Chen S, Hu M, Rizwan-UI-Haq M, Lai K, Qu F, Zhang Y (2011) Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. **Int. J. Food Microbiol** 151:190-194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.023>

Haas H (2003) Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: The role of siderophores in iron uptake and storage. **Applied Microbiology and Biotechnology** 62:316-330. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1335-2>

Ismail M, Zhang J (2004) "Postharvest citrus diseases and their control". **Outlooks on pest management**, 29-35 p. Doi:10.1564/15feb12

Kader A (2002) Postharvest Technology of Horticultural Crops. **Riverside: UC Regents** 3:535.

Kanetis L, Forster H, Adaskaveg JE (2007) Comparative Efficacy of the New Postharvest Fungicides Azoxystrobin, Fludioxonil, and Pyrimethanil for Managing Citrus Green Mold. **Plant Disease** 91:1502-1511. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1502>

Kinay P, Mansour MF, Gabler FM, Margosan DA, Smilanick JL (2007) Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. **Crop Protection** 26:647-656. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.002>

Kinay P, Yildiz M, Yildiz F, Delen N, Tosun N (2001) Control of Postharvest *Penicillium* Decay of Citrus Fruits with antagonistic yeasts and chemical fungicides. **Acta Hort** 553:383–388. Doi: 10.17660/actahortic.2001.553.87

Klein MN, Da Silva, AC, Kupper KC (2016) *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 32:12. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2157-6>

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>

Kupper KC, Cervantes ALL, Klein MN, Silva AC (2013) Avaliação de micro-organismos antagonísticos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura** 35:20-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000200011>

Lacava PT, Silva-Stenico ME, Araújo WL, Simionato AVC, Carrilho E, Tsai SM, Azevedo JL (2008) Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. **Pesquisa agropecuária brasileira** 43:521-528. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000400011>

Lahlali R, Raffaele B, Jijakli MH (2011) UV protectants for *Candida oleophila* (strain O), a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Plant Pathology** 60:288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02368.x>

Lee J, Postmaster A, Soon HP, Keast D, Carson KC (2012) Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western. **BioMetals**, Australia, 25:285–296. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9503-9>

Leong J (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 24:187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.001155>

Liles RM, Scheel AT, Cianciotto PN (2000) Discovery of a Nonclassical Siderophore, Legiobactin, Produced by Strains of *Legionella pneumophila*. **Journal of Bacteriology** 182:749-757. Doi: 10.1128/JB.182.3.749-757.2000

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, Zhun Z, 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. **Int. J. Food Microbiol.** 119:223–229.

López-García B, González-Candelas L, Pérez-Payá E, Marcos JF (2000) Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13:837-846. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.8.837>

López-García B, Pérez-Payá E, Marcos JF (2002) Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. **Applied and Environmental Microbiology** 68:2453–2460. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2453-2460.2002>

Lopes JMS, Déo TFG, Andrade BJM, Giroto M, Felipe ALS, Junior CEI, Bueno CEMS, Silva TF, Lima FCC (2011) Importância econômica dos citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia** 20:1-3.

Luo Y, Zeng K, Ming J (2012) Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses. **Scientia Horticulturae** 135:120-127. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.031>

Manwar AV, Khandelwal SR, Chaudhari BL, Meyer JM, Chincholkar SB (2004). Siderophore Production by a Marine *Pseudomonas aeruginosa* and Its Antagonistic Action Against Phytopathogenic Fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 118:243-251. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:243>

Mapa (2020) Sumário Executivo Laranja. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Política Agrícola.**

Mari M, Guizzardi M (1998) The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica** 26:59-66. <https://doi.org/10.1007/BF02981267>

Moretto C, Cervantes ALL, Filho AB, 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>

Muñoz A, López-García B, Marcos JF (2007) Comparative study of antimicrobial peptides to control citrus postharvest decay caused by *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55:8170-8176. <https://doi.org/10.1021/jf0718143>

Neilands JB (1995) Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry** 270:26723-26726. doi: 10.1074/jbc.270.45.26723

Neves LC, Mazione RL, Vieites RL (2002) Radiação Gama na Conservação Pós-Colheita da Nectarina (*Prunus persica* var. nucipersica) Frigoconservada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 24:676-679. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452002000300026>

Nigro F, Ippolito A, Lattanzio V, Di Venere D, Salerno M (2000) Effect of ultravioleta-C light on postharvest decay of strawberry. **Journal of Plant Pathology**, Bologna, 82:29-37. <https://www.jstor.org/stable/41997977>

Obagwu J, Korsten L (2003) Integrated control of *citrus* green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. **Postharvest Biology and Technology** 28:187-194. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00145-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00145-X)

Oberegger H, Schoeser M, Zadra I, Abt B, Haas H (2001) SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol** 41:1077-1089. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02586.x>

Oliveira HP, Batagov A, Ward J, Baganz F, Krabben P (2006) Identification of erythrobactin, a hydroxamate-type siderophore produced by *Saccharopolyspora erythraea*. **Letters in Applied Microbiology** 42:375-380. Doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01849.x

Palou, L (2014) *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In: Bautista-Baños, Silvia. Postharvest Decay: Control Strategies. **Elsevier**, Mexico, 2:45-102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8>

Palou L, Smilanick JL, Droby S (2008) Alternatives to conventional fungicides for the control of *citrus* postharvest green and blue moulds. **Stewart Postharvest Review** 2:1-16.

Palou L, Usall J, Munoz A, Smilanick JL, Vinas I (2002) Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of

clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology** 24:93-96. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00178-8)

Pascholati SF (2004) O fenômeno da Indução de Resistência e o Controle de Doenças Pós-Colheita. **Reunião brasileira sobre indução de resistência em plantas**, Lavras-Mg, Anais NEFIT/UFLA, p. 2-4.

Payne SM (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology** 235:329-344. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)

Philpott CC (2006) Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763:636-645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.008>

Plaza P, Usall J, Teixido N, Vinas I (2003) Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, 94:594-554. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01909.x>

Prusky D, Plumbley RA, Kobiler I (1991) Effect of CO₂ treatment on the induction of antifungal diene in unripe avocado fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, 39:325-334.

Qin ZG, Tian PS (2004) Biocontrol of Postharvest Diseases of Jujube Fruit by *Cryptococcus laurentii* Combined with a Low Dosage of Fungicides Under Different Storage Conditions. **The American Phytopathological Society** 88:497-501. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.497>

Renshaw J, Robson D, Trinci A, Wiebe M, Livens F, Collison D, Taylor RJ (2002) Fungal siderophore: structures, functions and applications. **The British Mycological Society** 106:1123-1142. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006548>

Riquelme, M., 1996. Fungal siderophores in plant-microbe interactions. **Microbiol. SEM.** 12, 537-546

Rodov V, Ben-Yehoshua S, Fang DQ, Kim JJ, Ashkenazi R (1995) Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43:1057-1061. <https://doi.org/10.1021/jf00052a039>

Sansone G, Rezza I, Calvente V, Benuzzi D, Tosetti MIS (2005) Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, 35:245-251. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.09.005>

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry** 160:47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Shaner G, Finney RE (1977) The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology** 67:1051-1055.

Silveira NSS, Michereff SJ, Silva SSLI, Oliveira SMA (2005) Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogenese e controle. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. **Revista Caatinga**, Mossoró,18:283-298.

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>

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>

Thieken A, Winkelmann G (1992) Rhizoferrin: A complexone type of siderophores of the Mucorales and Entomophthorales (Zygomycetes). **FEMS Microbiology Letters** 94:37-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05285.x>

Toffano L, Fialho MB, Pascholati SF (2017) Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. **Biological Control**. 108: 77-82. [doi:10.1016/j.biocontrol.2017.02.009](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.02.009)

Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology** 193:275-286. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0672-7>

Usall J, Teixidó N, Torres R, Eribe OX, Viñas I (2001) Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. **Postharvest Biology and Technology** 21:147-156. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00131-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00131-9)

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.

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>

Winkelmann G (2002) Microbial siderophore-mediated transport. **Biochem Soc. Trans** 30:691-696. Doi: 10.1042/bst0300691

Winkelmann G (2001) Siderophore transport in fungi. **Microbial transport systems**. Wiley-VCH, Weinheim.

Wiyono S, Schulz DF, Wolf GA (2008) Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. **Biol Control** 46:348–357. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.020>

Wuryatmo E, Able AJ, Ford CM, Scott ES (2014) Effect of volatile citral on the development of blue mould, green mould and sour rot on navel orange. **Australasian Plant Pathology** 43:403-411. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0281-z>

Wyatt MK, Parish ME (1995) Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. **Food Microbiology** 12:237-243. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80103-0](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80103-0)

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. **Int. J. Food Microbiol.** 153:453–464.

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. **Biol. Control** 54:172–180.

Zhang HY, Zheng X, Xi YF (2005) Biological control of postharvest blue mould of orange by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. **BioControl** 50:331-342. <https://doi.org/10.1007/s10526-004-0452-x>

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.

Zhou T, Northover J, Schneider EK, Lu X (2002) Interactions between *Pseudomonas syringae* MA-4 and cyprodinil in the control of blue mold and gray mold of apple. **Can. J. Plant Pathol** 24:154-161. <https://doi.org/10.1080/07060660309506990>

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, Zhejiang** 7:362-365. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.AS0362>

Zhu M, Valdebenito M, Winkelmann G, Hantke K (2005) Functions of the siderophore esterases IronD and IronE in iron-salmochelin utilization. **Microbiology** 151:2363-2372. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27888-0>