

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 08/02/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Vanessa Santos Moura

Engenheira Agrônoma

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Vanessa Santos Moura

Orientadora: Prof. Dra. Katia Cristina Kupper

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

M929f Moura, Vanessa Santos

Formulação de *Aureobasidium pullulans* para controle de doenças de pós-colheita em frutos cítricos / Vanessa Santos Moura. -- Jaboticabal, 2022

85 f. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Katia Cristina Kupper

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: VANESSA SANTOS MOURA

ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

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

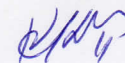
Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER (Participação Virtual)
Centro de Citricultura / IAC Instituto Agronomico de Campinas CordeiropolisSP



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

P/ 

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

P/ 

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

P/ 

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

P/ 

Jaboticabal, 08 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

Epígrafe

segura as pontas
que você dá conta, mulher

você não cogitou ir tão longe
e mesmo assim conseguiu

é arrebatador
traçar o próprio roteiro

Ryane Leão

Dedicatória

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. CONCLUSÕES

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

7. REFERÊNCIAS

- Abadias M, Usall J, Teixidó N, Viñas I (2003) Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. **Phytopathology** 93:436–442. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.436>).
- Adikaram NKB, Joyce DC, Terry LA (2002) Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. **Australasian Plant Pathology** 31:223–229. <https://doi.org/10.1071/AP02017>
- Aguirre-Güitrón L, Calderón-Santoyo M, Bautista-Rosales PU, Ragazzo-Sánchez JA (2019) Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). **Food Science and Technology** 113:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108271>.
- Alcântara MR (2017) **A Competitividade na produção de laranja**. 98f. Monografia (Graduação em Engenharia Agrícola) – Unicamp – Campinas.
- Aloui H, Licciardello F, Khwaldia K, Hamdi M, Restuccia C (2015) Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **Int. International Journal of Food Microbiology** 200:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.015>
- Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) **AgroEstat - sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Jaboticabal: FCAV/UNESP. 396p
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil** 378:1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bazioli J, Belinato J, Costa J, Akiyama D, Pontes J, Kupper K, Augusto F, Carvalho J, Fill T (2019) Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. **Toxins** 11:460. <https://doi.org/10.3390/toxins11080460>
- Bencheqroun SK, Bajji M, Massart S, Labhilili M, Jaafari SEI, Jijakli MH, (2007) In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. **Postharvest Biology and Technology** 46:128–135. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.005>
- Brown GE (2003) **Sour rot. Causal organism and disease cycle**. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Science Extension Service Fact Sheet. p. 137.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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