

**CONTROLE *In vitro* DE *Alternaria* sp. E *Colletotrichum* spp. COM LEVEDURAS  
ANTAGONISTAS**

Renata Mori Thomé<sup>1\*</sup>, Luiz Vitor Barbosa de Oliveira<sup>1</sup>, Maicon Fernando Petry de Paula<sup>1</sup>,  
Matheus Felipe Prado Ferreira<sup>1</sup>, Maria Isabel Balbi-Peña<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Campus Universitário,  
Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina, Paraná.

\*Autor para correspondência: Renata Mori Thomé (renata.mori.thome@uel.br)

## Resumo

Doenças fúngicas causadas por *Alternaria* spp. e *Colletotrichum* spp. podem acarretar sérios danos em maçãs, tanto no campo quanto em pós-colheita. No Brasil, são utilizadas vários produtos químicos para o controle de doenças da macieira, e o uso demasiado e errôneo desses produtos acabam deixando resíduos nos frutos, visto que, ultimamente a preocupação e a procura dos consumidores por alimentos livre de resíduos fitossanitários, têm se intensificado. Diante dessa problemática, o uso de controle biológico com microrganismos pode se tornar uma ótima alternativa para o controle de doenças fúngicas da macieira. As leveduras apresentam características positivas como agentes de biocontrole, pois suas demandas nutricionais são simples, possuem uma rápida colonização de superfícies e não produzem esporos alergênicos, micotoxinas ou antibióticos. O presente trabalho teve por finalidade verificar o antagonismo de isolados de leveduras contra *Colletotrichum* spp. e *Alternaria* sp. em condições *in vitro*. Foram utilizados quatro isolados de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *P. manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763). Para a avaliação do antagonismo foi realizado um experimento de cultura dupla, no qual as leveduras foram estriadas a 3 cm do centro de placas contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e após 48 horas adicionou-se um disco micelial de cada fitopatógeno no centro das mesmas. Avaliou-se o crescimento da colônia, a formação do halo de inibição e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos patógenos na presença das leveduras comparando-os com a testemunha (sem levedura). Para a avaliação do antagonismo por compostos voláteis, foram utilizadas placas bipartidas contendo um disco micelial dos fungos e uma suspensão ( $3,0 \times 10^6$  cél/mL) das leveduras em lados opostos da placa com meio BDA. Foi avaliado o diâmetro da colônia e o IVCM dos fungos, comparando-os com os da testemunha. Todas as cepas de leveduras apresentaram efeito antagônico *in vitro* contra patógenos que causam podridão em maçãs. Esse antagonismo foi maior por metabólitos difusíveis no meio do que por substâncias voláteis. Os isolados CCMA 0759 (*Pichia caribbica*) e CCMA 0760 (*Hanseniaspora opuntiae*) exerceram maior efeito inibitório sobre os patógenos e apresentam potencial para serem testadas no controle da podridão amarga e da podridão marrom em experimentos de pós-colheita de maçã.

**Palavras-chave:** Antagonismo, Compostos voláteis, Podridão amarga, Podridão marrom da maçã.

## Introdução

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é pertencente à família Rosaceae, sendo umas das espécies frutícolas de clima temperado mais cultivadas do mundo (Petri & Leite, 2008). A maçã está entre as quatro frutas mais produzidas no mundo e o seu consumo pode ser *in natura* ou utilizada na preparação de geleias, bebidas fermentadas, purês entre outros (EPAGRI, 2008). A produção brasileira na safra de 2019, foi de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas de maçãs (IBGE, 2019). A produção é comercializada durante o ano todo, sendo distribuída a todos os estados brasileiros. Tendo em vista a importância e consumo da maçã no Brasil e no mundo, faz-se necessário preservar sua integridade e segurança mantendo-a livre de resíduos de agrotóxicos, toxinas e microrganismos prejudiciais (Gouveia et al, 2007).

A podridão amarga das maçãs e a podridão marrom da maçã, causados por *Colletotrichum* spp. (pertencentes aos complexos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense*) (Moreira, Peres & May de Mio, 2019) e *Alternaria alternata* e *Alternaria* sp., respectivamente, são doenças que afetam frutos da macieira.

A podridão amarga da maçã é causada por isolados do mesmo gênero que aqueles que causam a mancha foliar de *Glomerella*, causando sintomas nos frutos. Várias espécies causam a podridão amarga, alguns deles relatados recentemente. As espécies *C. fioriniae*, *C. clavatum*, *C. godetiae*, *C. fragariae*, *C. karstii*, *C. nymphaeae*, *C. fruticola*, *C. melonis*, *C. theobromicola*, *C. abisissum*, *C. Paranaense*, *C. limeticola* e *C. siamense* têm sido relatadas como agentes causais da podridão amarga. Essas espécies pertencem aos complexos de espécies *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. acutatum* (Moreira, Peres & May de Mio, 2019).

Fungos do gênero *Colletotrichum* podem vir a causar infecção ainda no pomar, a partir do momento da queda das pétalas. Os sintomas da podridão amarga são pequenas manchas de 2 a 3 mm de coloração parda ou marrom, esta lesão aumenta de tamanho podendo ser observada uma depressão no centro das lesões com os bordos elevados. Quando há condições ambientais favoráveis, há o surgimento de círculos concêntricos e um número elevado de acérvulos.

O controle da doença é realizado pela remoção e destruição de frutas doentes e ramos com cancos. O controle químico tem resultado variáveis dependendo da sensibilidade aos fungicidas dos isolados dominantes no pomar (Valdebenito-Sanhueza et al., 2016).

A podridão marrom, causada por *Alternaria* spp., é uma importante doença pós-colheita de maçãs. A penetração do fungo ocorre principalmente por lenticelas e ferimentos, formam lesões iniciais amarronzadas que se desenvolvem para pretas, circulares e levemente deprimidas sobre o fruto, causando também podridão seca e esponjosa na polpa (Bleicher, 2005; Sanhueza, 2004).

Para o controle de tais doenças a medida usualmente utilizada é a aplicação de fungicidas. Entretanto, esses produtos podem vir a apresentar efeito residual nos frutos assim como afetar o trabalhador no momento da aplicação (Piaty, Schneider & Nozaki, 2011). A fitopatologia busca desenvolver produtos biológicos para o controle de doenças, sendo este um dos maiores desafios para a produção agrícola sustentável. Reduzir o uso do controle químico clássico e implementar o controle biológico considera questões de segurança com o meio ambiente e o homem, e também deve considerar a viabilidade econômica da produção agrícola. (Bettiol, Ghini, 1995 & Fravel, 1988).

Em fitopatologia, o termo controle biológico se aplica ao uso de antagonistas microbianos para suprimir doenças, mas, mais amplamente, o termo o controle biológico também tem sido aplicado ao uso dos produtos naturais extraídos ou fermentados de várias

fontes (Pal, Mcspadden & Gardener, 2006). O controle biológico constitui uma alternativa viável em relação ao controle químico tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas (Wilson & Wisniewski, 1994).

O uso de leveduras para a proteção de frutos sem processamento vem tendo um aumento significativo, ainda mais porque não produzem antibióticos e, portanto, não trazem risco para a saúde humana (Coelho et al., 2007).

A constatação da letalidade de fator killer em determinadas leveduras perante fungos filamentosos ampliou as perspectivas de aplicação, sob o ponto de vista de biocontrole dos fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos (Jacobs & Van Vuoren, 1991).

As leveduras são microrganismos que apresentam algumas características muito positivas como agentes de biocontrole de doenças, pois apresentam uma boa capacidade de sobrevivência em condições ambientais distintas, não possuem exigências nutricionais muito severas e podem constituir formulações com longos prazos de validade (Cunha, Ferraz, Wehrb & Kupper, 2018).

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagônico de isolados das leveduras *Pichia caribbica*, *Pichia manshurica*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* contra os fungos fitopatógenos isolados de maçã: *Alternaria* sp. (ALT1), *Colletotrichum fructicola* (74SC), *C. fructicola* (COL133), *C. nymphaeae* (COL15), *C. siamense* (COL143), *C. siamense* (COL144) em condições *in vitro*.

### Material e métodos

A manutenção dos isolados de leveduras e de fungos patogênicos e os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL. Foram utilizados quatro isolados de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *P. manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) provenientes da Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola - CCMA, localizada no Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As leveduras foram mantidas em placas de petri contendo meio de cultura batata-dextrose ágar -BDA (15g de ágar, 20 g de dextrose, 200g de batata L<sup>-1</sup>) a 25°C e fotoperíodo de 12/12. Foram utilizados os seguintes isolados: *Alternaria* sp. (ALT1), *Colletotrichum fructicola* (74SC), *C. fructicola* (COL133), *C. nymphaeae* (COL15), *C. siamense* (COL143), *C. siamense* (COL144), todos advindos do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas (LEMID), da Universidade Federal do Paraná (UFPR)

As leveduras e fungos testados foram respectivamente cultivados em YEPD por 48-72hrs e em BDA por 7 e 12 dias a 25°C, respectivamente. Para avaliar a atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos, uma alçada de leveduras foi estriada ortogonalmente a partir do centro da placa de petri contendo BDA. Foram utilizadas cinco placas para cada levedura e cada fungo. Após incubação a 25°C por 48h, discos miceliais (6 mm de diâmetro) dos fungos foram adicionados nas placas a 3cm de distância do inóculo da levedura. Uma placa controle apenas inoculada com os fungos também foi preparada. O experimento foi encerrado quando o crescimento do patógeno nas placas controle alcançou a borda da placa.

Para a determinação da produção de compostos voláteis os isolados de *Alternaria* sp. e *Colletotrichum* spp., foram cultivados simultaneamente com os isolados de leveduras, utilizando placas bipartidas, com o intuito que os exsudatos não voláteis produzidos pela levedura tenham contato com os fungos fitopatógenos através do meio de cultura. Para tal, um

disco micelial de 6 mm de diâmetro dos fungos, foi depositado em um dos lados da placa contendo meio de cultura BDA, e do outro lado, 50 uL de uma suspensão de leveduras ( $3,0 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>) foi espalhada na superfície do meio com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12/12. O experimento foi encerrado quando o crescimento do patógeno nas placas controle alcançou a borda da placa.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado em ambos os testes, com a seguinte equação:  $IVCM = \sum \frac{(D-Da)}{N}$  onde, IVCM é o índice de velocidade de crescimento micelial, D diâmetro médio atual da colônia, Da o diâmetro médio da colônia no dia anterior e N o número de dias após incubação (Oliveira, 1991). Para isso, o crescimento micelial foi avaliado diariamente, medindo o diâmetro das colônias de *Alternaria* sp. e *Colletotrichum* spp. em dois sentidos perpendiculares e, comparou-se ao cultivo do fungo na placa controle (sem a presença da levedura) (Ferraz, 2014).

No final do período de incubação de ambos os testes, a redução do crescimento micelial foi calculada em relação ao crescimento do controle utilizando a seguinte equação:  $ICM(\%) = \frac{(DTT-DTL)}{DTT} \times 100$  onde, ICM (%) representa a porcentagem de inibição do crescimento micelial, DTT equivale ao diâmetro no tratamento testemunha e o DTL o diâmetro no tratamento com leveduras (Garcia, Julliat, Barbosa & Casemiro, 2012).

Os experimentos foram realizados duas vezes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x4 (6 patógenos e 4 isolados de leveduras) com cinco repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa. Os dados foram avaliados quanto a normalidade dos dados e para homogeneidade de variância, submetidos a análise de variância com nível de significância de 5%. Constatada significância, os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa R.

### Resultados e Discussão

As leveduras e os isolados de fungos patogênicos mostraram interação significativa para a variável inibição de crescimento micelial no teste de antagonismo de cultura dupla, portanto, analisamos apenas a interação (Tabela 1). No caso de *Alternaria* sp. (Alt1), o crescimento micelial foi mais reduzido pelas leveduras CCMA0759, CCMA0760 e CCMA0762 e menos pela CCMA0763. Os isolados Col745C, Col 133 e Col 144 tiveram um comportamento similar, apresentando uma inibição que não teve influência do isolado de levedura com valores de 28,9, 30,9 e 28,9%, respectivamente.

Os isolados Col 15 e Col 143 foram mais inibidos pelo isolado CCMA 0759 e menos pelo CCMA0763. O efeito da levedura CCMA0759 foi maior sobre o crescimento micelial do isolado de Alt 1 e Col 15 quando comparados com os outros isolados de *Colletotrichum* (Tabela 1). O isolado CCMA0760 apresentou maior efeito sobre Alt 1 e menor em todos os outros isolados de *Colletotrichum*. Os isolados de leveduras CCMA0762 e CCMA0763 apresentaram um comportamento similar, exceto sobre Alt 1, onde o isolado CCMA0762 inibiu mais do que o CCMA0763.

No teste de antagonismo em cultura dupla, as leveduras e os isolados de fungos patogênicos também mostraram interação significativa para a variável índice de velocidade de crescimento micelial (Tabela 2). No caso de *Alternaria* sp. (Alt1) o IVCM foi menor na presença das leveduras CCMA0759 e CCMA0760, e maior na presença de CCMA0763, o que é coerente com a inibição observada anteriormente. Os isolados Col745C e Col 133 tiveram um comportamento similar (0,69 e 0,70 cm/dia de média, respectivamente), não tendo influência

do isolado de levedura. O IVCN do isolado Col 15 foi menor na presença de CCMA0759 e CCMA0760. O IVCN dos isolados Col 143 e Col 144 teve um comportamento muito similar, sendo menos reduzido pelas leveduras CCMA0762 seguido das CCMA0763 e CCMA0760. Em geral o efeito de todas as leveduras foi maior sobre o IVCN do isolado de Alt 1 e menor sobre o isolado Col 143.

Ainda no teste de antagonismo em cultura dupla, leveduras e isolados fitopatogênicos apresentaram interação (Tabela 3). No caso de *Alternaria* sp. (Alt1), foi o fungo que apresentou o maior tamanho de halo, chegando a 1 cm na presença das leveduras CCMA0759 e CCMA0760. Para Alt 1 o halo foi menor na presença de CCMA0763 (0,3 cm) o que reafirma os resultados anteriores. Para os isolados Col 15, Col 745C e Col 143 o maior halo também foi na presença de CCMA0759 (0,75, 0,52 e 0,42 cm, respectivamente). Já para os isolados Col 144 e Col 133 os maiores halos foram na presença dos isolados CCMA0760 e CCMA0763, respectivamente (0,53 cm em ambos). A respeito das leveduras, para todos os isolados, o halo maior foi versus o isolado de Alt 1, exceto para CCMA0763, o qual formou um halo maior contra Col 133 e Col 15.

No teste de compostos voláteis as leveduras e os isolados de fungos patogênicos não mostraram interação significativa para a variável inibição de crescimento micelial nem para o IVCN, portanto, analisaremos os efeitos simples de cada fator (Tabela 4). O crescimento micelial dos isolados Alt 1 e Col 15 foi o que apresentou a maior inibição por voláteis das leveduras (14,1 e 13,1%, respectivamente), comparado com Col 745C e Col 144 os quais apresentaram os menores valores de inibição por voláteis (7,50 e 7,22%, respectivamente). Por outro lado, os isolados das leveduras CCMA0759 e CCMA0760 exerceram as maiores inibições através de compostos voláteis (16,3 e 12,6%, respectivamente) em comparação com CCMA0760 e CCMA0762 (6,34 e 5,72%, respectivamente).

O IVCN, no teste de antagonismo por compostos voláteis (Tabela 5) foi maior no isolado Col 133 (1,42 cm/dia) seguido pelo isolado Col 15 e Col 143 (1,18 e 1,11 cm/dia, respectivamente), Col 745C (1,02 cm/dia) e Alt 1 (0,77 cm/dia). Os isolados de leveduras que mostraram mais efeito na redução da velocidade de crescimento micelial foram CCMA0759 e CCMA0760, o que é coerente com os resultados de inibição comentados anteriormente.

No teste de antagonismo por cultura dupla existiu uma variação de inibição de crescimento micelial dos patógenos por metabólitos produzidos pelas leveduras que foi de 19,3 a 45,2%. No experimento foi verificada uma interação levedura por patógeno nas três variáveis avaliadas, ou seja, o antagonismo de cada levedura dependeu do patógeno que foi confrontado. Embora exista esta interação levedura x patógeno, em termos gerais, os resultados de inibição de crescimento micelial, IVCN e halo indicam que o isolado Alt 1, agente causal da podridão marrom, foi o mais afetado pelas leveduras testadas. Das espécies de *Colletotrichum*, o isolado Col 15 (*C. nymphaeae*) foi o mais inibido pelas leveduras. O conjunto de resultados indicam que os metabólitos liberados no meio pelos isolados CCMA 0759 (*P. caribbica*) e CCMA 0760 (*H. opuntiae*) apresentam maior efeito sobre o crescimento micelial de todos os patógenos, em comparação com os outros isolados de leveduras.

No experimento de compostos voláteis não foi verificada interação entre leveduras e patógenos. Analisando os efeitos simples de cada fator, podemos concluir que as leveduras CCMA 0759 (*P. caribbica*) e CCMA 0763 (*L. thermotolerans*) foram as que exerceram mais inibição por voláteis, o que se refletiu no IVCN. Esse efeito inibitório por compostos voláteis foi menor que o exercido por compostos difusíveis no meio de cultura, variando de 1,1 a 28,6%.

Assim como verificado no experimento de cultura dupla, os isolados mais afetados pelos voláteis das leveduras foram o Alt 1 (*Alternaria* sp.) e o Col 15 (*C. nymphaeae*).

Ruiz-Moyano et al. (2016) estudaram o efeito de duas cepas de leveduras, *Hanseniaspora opuntiae* e *Metschnikowia pulcherrima* isoladas de frutos de figo, sobre *Penicillium expansum*, *B. cinerea* e *Monilinia laxa* e verificaram uma redução no crescimento micelial de 45,2%, 53,4% e 58,2%, respectivamente, quando utilizado *H. opuntiae* e 63,7%, 61,1% e 66,09%, respectivamente, quando utilizou-se *M. pulcherrima*.

Heling et al. (2017) testaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii* no controle de *Colletotrichum musae*, agente causal da antracnose em bananeira, e constataram em testes de compostos voláteis uma redução no número de conídios, demonstrando que as leveduras podem produzir compostos voláteis que afetam o desenvolvimento e a formação de conídios desse fungo fitopatígeno. Essas cepas também causaram a formação de halo de inibição de 0,28 e 0,44 cm do micélio, comprovando que as leveduras testadas produziram metabólitos com propriedades antagonicas a *C. musae*.

Cepas de *Meyerozym guilliermondii* e *Wickerhamomyces anomalus* apresentaram antagonismo contra *Colletotrichum gloeosporioides*, com redução no crescimento micelial entre 70% e 50%, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle (Lima, Gonçalves, Brandão, Rosa & Viana, 2013).

Estudo realizado por Kupper, Cervantes, Klein e Silva (2013) sobre a ação antagonica de 6 isolados de *S. cerevisiae* sobre o crescimento micelial de *P. digitatum*, mostrou que embora todos os isolados testados tenham afetado estatisticamente o desenvolvimento do fungo, os isolados ACB-CR1 e ACB-K1 apresentaram os melhores resultados, provocando inibições da colônia do fitopatígeno de 42% e 47%, respectivamente.

Lahlali, Hamadi, El Guilli e Haissam Kikakli (2011), utilizando *Pichia guilliermondii* estirpe Z1 a uma concentração de  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, obtiveram supressão relevante sobre *P. italicum*, reduzindo a incidência do bolor azul dos citros em 85%.

### Conclusão

Nas condições dos experimentos, os resultados indicam que as cepas de leveduras testadas apresentaram efeito antagonico *in vitro* contra patógenos que causam podridão em maçãs. Esse antagonismo foi maior por metabólitos difusíveis no meio do que por substâncias voláteis. Os isolados CCMA 0759 (*Pichia caribbica*) e CCMA 0760 (*Hanseniaspora opuntiae*) exerceram maior efeito inibitório sobre os patógenos e apresentam potencial para serem testadas no controle da podridão amarga e da podridão marrom em experimentos com maçãs em pós-colheita.

**Referências bibliográficas:**

- Bettiol, W. & Ghini, R. Controle biológico. In: *Manual de Fitopatologia: Princípios e Controle*. São Paulo, Editora Ceres, 1995. p.717-728.
- Bleicher, J. Doenças da macieira e outras pomáceas. In: Kimati, H. Amorim, L.; Rezende, J.A. M.; Bergamin, F.A.; Camargo, L.E.A. (Eds.). *Manual de Fitopatologia - Vol. 2. Doenças de Plantas Cultivadas*. 4. ed. São Paulo SP. Editora Agronômica Ceres. p. 440-451. 2005.
- Coelho, A. R., Celli, M. G., Ono, E. Y. S., Wosiacki, G., Hoffmann, F. L., Pagnocca, F. C. & Hirooka, E. Y. (2007). *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation *in vitro*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(4), 725-733. Doi: 10.1590/S1516-89132007000400019
- Cunha, T., Ferraz, L. P., Wehrb, P. P. & Kupper, K. C. (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 276(2), 20-27. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.019
- EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. *A cultura da macieira*. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina; 2002.
- Ferraz, L. P. (2014). *Estudo dos mecanismos de ação de leveduras envolvidos no biocontrole de doenças de pós-colheita em citros*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil. Retrieved <http://hdl.handle.net/11449/110646>.
- Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual review of Phytopathology*, 26(1), 75-91.
- Garcia, R. A., Juliatti, F. C., Barbosa, K. A. G. & Cassemiro, T. A. (2012). Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal*, 28(1), 48-57. Retrieved Ago 16, 2019. <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/8174>.
- Gouvea, A. (2007). *Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola culturas permanentes*. Rio de Janeiro. 2019. Retrieved <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>.
- Jacobs, C. J. & Van Vuoren, H. J. J. Effects of different killer yeast on wine fermentations. *Journal of Amsterdam Society Brewing*, Austrália, v. 42, n. 4, p. 295-299, 1991
- Heling, A. L., Kuhn, O. J., Stangarlin, J. R., Henkemeier, N. P., Coltro-Roncato, S. &



- Gonçalves, E. D. V. (2017). Controle biológico de antracnose em pós-colheita de banana “Maçã” com *Saccharomyces* spp. *Summa Phytopathologica*, 43, 49-51. doi: 10.1590/0100-5405/2105.
- Kupper, K. C., Cervantes, A. L. L., Klein, M. N. & Silva, A. C. (2013). Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 425-436. doi: 10.1590/S0100-29452013000200011
- Lahlali, R., Hamadi, Y., El Guilli, M. & Haissam Kikakli, M. (2011). Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. *Biological control*, 56(3), 217-224. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.12.001
- Lima, J. R., Gonçalves, L. R. B., Brandão, L. R., Rosa, C. A. & Viana, F. M. P. (2013). Isolation, identification, and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of basic microbiology*, 53(7), 590-599. doi: 10.1002/jobm.201200049.
- Moreira, R. R., Peres, N. A., May de Mio, L. L. (2019). *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes associated with apple in Brazil. *Plant disease*, 103(2) p. 268-275. doi: 10.1094/PDIS-07-18-1187-RE
- Oliveira, J. A. (1991). *Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativus L.) e pimentão (Capsicum annuum L.)*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura de Lavras. Retrived <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/33483>
- Pal, K. K., B. & Mcspadden Gardener, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* Doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Petri, J. F. & Leite, G. B. (2008) *Macieira*, *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(4). doi: 10.1590/S0100-29452008000400001
- Piati, A., Schneider, C. F. & Nozaki, M. H. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 32(3), 1033-1040. doi: 10.5433/1679-0359.2011v32n3p1033
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M. C., Calle, A., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G. & Hernández, A. (2016). Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food microbiology*, 57, 45-53. doi:10.1016/j.fm.2016.01.003
- Sanhueza, R. M. V. *Podridões de maçãs frigorificadas. Frutas do Brasil, Maçã: pós-colheita*. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica, p. 35-44, 2004.

Spadaro, D. & Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit disease. *International Journal of Food Microbiology*. 91, 185-194. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00380-5.

Valdebenito-Sanhueza, R. M., Nickel, O., Fajardo, T. V. M. & Seemueller, E. (2016) *Doenças da macieira*. In: *Manual de fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas*, V. 2, ed. 5, (pp. 485-497). Editora Ceres.

Wilson, C. L., Wisniewski, M.E. (1994). *Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice*. Boca Raton: CRC Press. doi: 10.1146/annurev.py.27.090189.002233

**Tabela 1.** Inibição de crescimento micelial (%) de patógenos de pós-colheita de maçã co-cultivados com isolados de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *P. manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

	Leveduras				Médias
	CCMA 0759 <i>P. caribbica</i>	CCMA 0760 <i>H. opuntiae</i>	CCMA 0762 <i>P. manshurica</i>	CCMA 0763 <i>L. thermotolerans</i>	
<b>Patógenos</b>					
<b>Alt 1</b> <i>Alternaria</i> sp.	45,24 aA	42,18 aA	36,73 aA	22,10 bB	36,56
<b>Col 745C</b> <i>C. fructicola</i>	31,35 bA	26,33 bA	29,15 abA	28,84 abA	28,92
<b>Col 133</b> <i>C. fructicola</i>	31,14 bA	31,44 bA	28,14 abA	32,94 aA	30,92
<b>Col 15</b> <i>C. nymphaeae</i>	36,57 abA	32,04 bAB	23,95 bAB	28,16 abB	30,18
<b>Col 143</b> <i>C. siamense</i>	32,42 bA	23,85 bAB	25,08 bAB	19,27 bB	25,16
<b>Col 144</b> <i>C. siamense</i>	33,64 bA	31,46 bA	24,92 bA	25,54 abA	28,89
<b>Médias</b>	35,06	31,05	28,00	26,48	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. C.V. 17,83%

**Tabela 2.** Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de patógenos de pós-colheita de maçã co-cultivados com isolados de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *P. manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

	Leveduras				Médias
	CCMA 0759 <i>P. caribbica</i>	CCMA 0760 <i>H. opuntiae</i>	CCMA 0762 <i>P. manshurica</i>	CCMA 0763 <i>L. thermotolerans</i>	
<b>Patógenos</b>					
<b>Alt 1</b> <i>Alternaria</i> sp.	0,43 cC	0,47 cBC	0,56 cB	0,66 cA	0,53
<b>Col 745C</b> <i>C. fructicola</i>	0,68 abA	0,70 abA	0,67 bA	0,69 bA	0,69
<b>Col 133</b> <i>C. fructicola</i>	0,68 abA	0,69 abA	0,71 abA	0,71 abA	0,70
<b>Col 15</b> <i>C. nymphaeae</i>	0,59 bB	0,61 bB	0,73 abA	0,67 bAB	0,65
<b>Col 143</b> <i>C. siamense</i>	0,69 aB	0,78 aAB	0,79 aA	0,81 aA	0,77
<b>Col 144</b> <i>C. siamense</i>	0,66 abB	0,69 abAB	0,77 aA	0,74 abAB	0,72
<b>Médias</b>	0,62	0,66	0,70	0,71	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. C.V. 8,02 %

**Tabela 3.** Halo de inibição (cm) de patógenos de pós-colheita de maçã co-cultivados com isolados de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *P. manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763).

	Leveduras				Médias
	CCMA 0759 <i>P. caribbica</i>	CCMA 0760 <i>H. opuntiae</i>	CCMA 0762 <i>P. manshurica</i>	CCMA 0763 <i>L. thermotolerans</i>	
<b>Patógenos</b>					
<b>Alt 1</b> <i>Alternaria</i> sp.	1,00 aA	1,00 aA	0,67 aB	0,30 abC	0,74
<b>Col 745C</b> <i>C. fructicola</i>	0,52 bA	0,25 bAB	0,08 bB	0,31 abAB	0,29
<b>Col 133</b> <i>C. fructicola</i>	0,45 bAB	0,43 bAB	0,13 bB	0,53 aA	0,39
<b>Col 15</b> <i>C. nymphaeae</i>	0,75 abA	0,50 bAB	0,34 abB	0,54 aAB	0,53
<b>Col 143</b> <i>C. siamense</i>	0,42 bA	0,21 bAB	0,21 bAB	0,01 bB	0,21
<b>Col 144</b> <i>C. siamense</i>	0,48 bAB	0,53 bA	0,19 bB	0,25 abAB	0,36
<b>Médias</b>	0,60	0,49	0,27	0,32	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. C.V. 46,75 %

**Tabela 4.** Inibição de crescimento micelial (%) de patógenos de pós-colheita de maçã co-cultivados com isolados de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *P. manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) em lados opostos de placas de petri bipartidas.

	Leveduras				Médias
	CCMA 0759 <i>P. caribbica</i>	CCMA 0760 <i>H. opuntiae</i>	CCMA 0762 <i>P. manshurica</i>	CCMA 0763 <i>L. thermotolerans</i>	
<b>Patógenos</b>					
Alt 1 <i>Alternaria</i> sp.	28,6	6,82	5,77	15,4	14,1 a
Col 745C <i>C. fructicola</i>	13,5	6,08	3,04	7,39	7,50 bc
Col 133 <i>C. fructicola</i>	13,1	5,84	3,50	8,88	7,83 abc
Col 15 <i>C. nymphaeae</i>	15,0	9,47	9,07	18,8	13,1 a
Col 143 <i>C. siamense</i>	16,1	5,90	11,8	13,3	11,8 ab
Col 144 <i>C. siamense</i>	11,7	3,94	1,13	12,1	7,22 c
<b>Médias</b>	16,3 A	6,34 B	5,72 B	12,6 A	

<sup>1</sup>Médias originais. Para análise os dados foram transformados por  $x^{0,46}$

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. C.V. 29,46 %

**Tabela 5.** Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia) de patógenos de pós-colheita de maçã co-cultivados com isolados de leveduras: *Pichia caribbica* (CCMA 0759) *Hanseniaspora opuntiae* (CCMA 0760), *P. manshurica* (CCMA 0762) e *Lachancea thermotolerans* (CCMA 0763) em lados opostos de placas de petri bipartidas.

	Leveduras				Médias
	CCMA 0759 <i>P. caribbica</i>	CCMA 0760 <i>H. opuntiae</i>	CCMA 0762 <i>P. manshurica</i>	CCMA 0763 <i>L. thermotolerans</i>	
<b>Patógenos</b>					
Alt 1 <i>Alternaria</i> sp.	0,60	0,85	0,89	0,74	0,77 d
Col 745C <i>C. fructicola</i>	0,96	1,00	1,10	1,03	1,02 c
Col 133 <i>C. fructicola</i>	1,35	1,37	1,45	1,50	1,42 a
Col 15 <i>C. nymphaeae</i>	1,11	1,23	1,25	1,14	1,18 b
Col 143 <i>C. siamense</i>	1,04	1,23	1,06	1,10	1,11 bc
Col 144 <i>C. siamense</i>	0,93	1,15	1,11	0,95	1,04 c
<b>Médias</b>	1,00 B	1,14 A	1,14 A	1,08 AB	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. C.V. (%) 10,86%