

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA**

**BACTÉRIAS EPIFÍTICAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE
DA ANTRACNOSE DO MAMOEIRO EM PÓS-COLHEITA**

LARYSSA ANDRADE DA LUZ SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
AGOSTO – 2018**

BACTÉRIAS EPIFÍTICAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DA ANTRACNOSE DO MAMOEIRO EM PÓS-COLHEITA

LARYSSA ANDRADE DA LUZ SANTOS

Engenheira Agrônoma, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Harllen Sandro Alves Silva

Co-Orientador: Leandro Souza Rocha

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
AGOSTO – 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

S237b

Santos, Laryssa Andrade da Luz.

Bactérias epifíticas como agentes de biocontrole da antracnose do mamoeiro em pós-colheita / Laryssa Andrade da Luz Santos. Cruz das Almas, BA, 2018.

86f.; il.

Orientador: Harllen Sandro Alves Silva.

Coorientador: Leandro Souza Rocha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

1.Mamão – Pós-colheita. 2.Mamão – Antracnose. 3.Doença das plantas – Avaliação. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.651

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus Orixás e mentores espirituais por toda proteção, amor, zelo e força pra enfrentar cada obstáculo e concretizar os meus objetivos.

Aos meus Pais Carlos Augusto e Mauricéa pela compreensão, amor, respeito e apoio em todos os momentos.

A minha família maravilhosa por todo apoio, amor e incentivo, em especial a minha madrinha Iracema pelo carinho e força.

Ao Professor Harllen Sandro Alves Silva pela orientação, suporte, paciência e confiança.

Ao meu co-orientador Leandro de Souza Rocha pelas contribuições, paciência, companheirismo e amizade.

Ao Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança, pelas valiosas contribuições.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura pela estrutura cedida para realização deste trabalho, bem como a equipe do laboratório de Fitopatologia.

Ao laboratório de microbiologia do solo, especialmente a Luciano Pinheiro, por toda paciência, atenção e valiosas contribuições.

Aos amigos que os mestrados me deu (Pedro, Danny, Aura, Jucy, Mary, Milena).

A Lucas Cunha pela concessão dos materiais, dedicação, amor e companheirismo.

Ao templo de Umbanda Aldeia Nova, por todo cuidado, zelo, apoio e suporte espiritual.

Aos meus amores amigos por todo apoio, amor e confiança (Tâmara, Jéssica, Bernardo, Fanny, Pimba, Gêisa, Aline).

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

Muito obrigada a todos.

À minha avó Milza Andrade (*in memoriam*), que se fez presente em todos os dias da minha vida, sei que mesmo cumprindo a sua jornada num outro plano olha, torce e continua acreditando em mim....

À minha família e amigos pelo amor, paciência, confiança e companheirismo.

Mas uma vez, dedico.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Objetivo geral.....	13
Objetivos específicos.....	13
CAPÍTULO I.....	14
Estado da arte.....	14
A cultura do mamoeiro	15
Antrnose.....	16
Controle Químico.....	18
Controle biológico.....	20
Bactérias no controle biológico.....	22
Biofilme.....	24
Referências.....	29
CAPÍTULO II.....	42
Seleção de bactérias epífitas do mamoeiro como agentes de biocontrole da antracnose em pós-colheita.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	48
Isolamento, seleção e preservação de bactérias epifíticas do mamoeiro.....	48
Produção de compostos antimicrobianos difusíveis	48
Produção de compostos antimicrobianos voláteis.....	49
Produção de quitinase.....	49

Inibição de germinação de conídios.....	50
Antibiose por difusão em dupla camada.....	50
Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de formação de biofilme.....	51
Avaliação da redução da antracnose em discos de frutos.....	52
Avaliação da redução da antracnose frutos inteiros.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
Isolamento e seleção de bactérias epifíticas antagonistas a <i>Colletotrichum</i> spp.	54
Antibiose por difusão em dupla camada.....	55
Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de formação de biofilme das bactérias epifíticas	56
Avaliação da redução da antracnose em discos de frutos.....	56
Avaliação da redução da antracnose em frutos inteiros.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
AGRADECIMENTOS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS.....	73

RESUMO

SANTOS, L.A.L **seleção de bactérias epífitas formadoras de biofilmes para o biocontrole da antracnose em pós-colheita de mamoeiro.** Cruz das Almas, 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Este trabalho teve como objetivos prospectar bactérias epifíticas a partir de folhas, frutos e sementes do mamão; avaliar o antagonismo *in vitro* a *Colletotrichum* spp. pela produção de compostos difusíveis, voláteis, quitinase e inibição da germinação de conídios; quantificar a produção de biofilme pelos selecionados como antagonistas e verificar a redução da severidade da antracnose em discos de frutos e em frutos de mamão. Inicialmente, 224 bactérias foram isoladas, dentre elas, 74 exibiram ao menos um mecanismo de ação contra o patógeno, 13 bactérias apenas dois, quatro apresentaram três e uma bactéria exibiu todos os mecanismos avaliados. Os “Mix” foram compostos por quatro isolados bacterianos, que foram distribuídos de forma a fim de equilibrar os mecanismos antagônicos dos isolados em cada combinação. O isolado 901 se fez presente em todos os “mix” por exibir todos os mecanismos avaliados, sendo eles: 1 (901,777,784,916), 2 (901,734, 905, 906), 3 (901, 794, 916, 924), 4 (901, 794, 905, 906) e 5 (901, 788, 777, 916), foram montados, mediante a verificação compatibilidade dos antagonistas pelo teste de antibiose recíproca, pela exibição de ao menos dois mecanismos de ação, somando ainda à produção de biofilme, e aplicados nas concentrações 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC mL⁻¹ nos discos de frutos. Todos os “Mix” reduziram significativamente a antracnose nos discos de frutos quando comparados ao controle. No entanto os “Mix” 1, 3, 5, na concentração 10^8 UFC mL⁻¹, proporcionaram melhores desempenhos reduzindo a doença até 75 %, 89,78 % e 90,8%, respectivamente. Os ‘Mix” 3 e 5 na concentração ótima de 10^8 , foram aplicadas nos frutos inteiros, e a eficiência dos tratamentos foi comparada ao fungicida sintético Comet (Piraclostrobina 250 g/L). Os “Mix” bacterianos não diferiram significativamente do fungicida, que atingiu níveis de redução da doença superiores a 97 %. A combinações utilizadas reduziram a severidade da antracnose acima de 98 %.

Palavras chave: *Colletotrichum* spp., biofilme, controle biológico

ABSTRACT

SANTOS, L.A.L **seleção de bactérias epífitas formadoras de biofilmes para o biocontrole da antracnose em pós-colheita de mamoeiro**. Cruz das Almas, 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

This work aimed to prospect for epiphytic bacteria from leaves, fruits and seeds of papaya; to evaluate the in vitro antagonism of *Colletotrichum* spp. by the production of diffusible, volatile compounds, chitinase and inhibition of conidial germination; quantify the biofilm production by the selected ones as antagonists and to verify the reduction of the anthracnose severity in fruit discs and in papaya fruits. Initially, 224 bacteria were isolated, among them 74 exhibited at least one mechanism of action against the pathogen, 13 bacteria only two, four had three and one bacterium exhibited all the evaluated mechanisms. The "Mix" were composed of four bacterial isolates, which were distributed in order to balance the antagonistic mechanisms of the isolates in each combination. The 901 isolate was present in all mixtures because it showed all the evaluated mechanisms, being: 1 (901,777,784,916), 2 (901,734, 905, 906), 3 (901, 794, 916, 924), 4 (901, 794, 905, 906) and 5 (901, 788, 777, 916) were assembled by testing the antagonism of the antagonists by the test of reciprocal antibiosis by displaying at least two mechanisms of action, further adding biofilm production, and applied at concentrations 10⁸, 10⁷ and 10⁶ CFU mL⁻¹ in the fruit discs. All "Mix" significantly reduced the anthracnose in the fruit discs when compared to the control. However, "Mix" 1, 3, 5, at concentration 10⁸ CFU mL⁻¹, provided better performances reducing the disease to 75%, 89.78% and 90.8%, respectively. Mixtures 3 and 5 at the optimum concentration of 10⁸ were applied to the whole fruits, and the efficiency of the treatments was compared to the synthetic fungicide Comet (Piraclostrobin 250 g / L). The bacterial mixtures did not differ significantly from the fungicide, which reached disease reduction levels above 97%. The combinations used reduced the anthracnose severity above 98%.

Key words: *Colletotrichum* spp., biofilme, controle biológico

1 INTRODUÇÃO GERAL

2
3
4 O Brasil é segundo maior produtor de mamão (*Carica papaya* L.) do mundo,
5 com 12,6 % da produção mundial, em uma área cultivada aproximada de 32 mil
6 hectares Fao (31). O volume de frutos produzido quase que em sua totalidade é
7 direcionado ao consumo interno, e o exportado não chega a 10 % do total Fao (31) e
8 Cepea (19).

9 Um dos principais entraves do setor são as perdas provocadas, em sua
10 grande maioria por fungos fitopatogênicos, que podem comprometer até 90 % da
11 produção Bautista-baños et al., (10). Entre as principais doenças que acometem os
12 frutos em pós-colheita a antracnose destaca-se por reduzir a vida útil dos frutos
13 durante o armazenamento, o transporte e a comercialização Casarrubias–carrillo et
14 al.,(18). Na maioria das vezes a antracnose é associada ao *Colletotrichum*
15 *gloesporioides* como agente causal, Bosland & Votava,(15).

16 O controle da antracnose, para os mercados de exportação, é realizado de
17 acordo com os regulamentos do exportador, enquanto que para o mercado nacional,
18 normalmente, são empregados fungicidas sintéticos. No entanto, a toxicidade dos
19 agroquímicos para os seres humanos, os riscos de contaminação do meio ambiente,
20 somado ainda ao declínio da eficiência dos agroquímicos, são fatores que
21 motivaram a busca do desenvolvimento de novas tecnologias, pré e pós-colheita,
22 que permitam a redução ou substituição do uso de agrotóxicos. (10, 43,70).

23 Deste modo, a restrição de tratamentos químicos é uma tendência crescente
24 nos mercados consumidores externos e internos, e características como ausência
25 de podridões, baixos teores residuais dos fungicidas, além do sabor, aroma e
26 aparência são quesitos indispensáveis na aceitação do produto (60).

27 O controle biológico de fitopatógenos, pela aplicação de bactérias epifíticas
28 antagonistas, surge como uma potencial tecnologia sem resíduos químicos no
29 controle de doenças na pós-colheita. Uma vez que estes microrganismos são de
30 ocorrência natural e estão adaptados à superfície alvo (44), podem oferecer controle
31 preventivo da antracnose e também durante o armazenamento e transporte dos
32 frutos (83).

33 Deste modo aventando-se a possibilidade da busca por bactérias
34 antagonistas a *Colletotrichum gloesporioides*, vislumbrando a capacidade da
35 formação de biofilmes como uma estratégia adicional na seleção dos isolados, além
36 dos mecanismos clássicos inerentes ao biocontrole, é possível aumentar a gama de
37 ação dos potenciais agentes de biocontrole de doenças, tornando palpável a
38 possibilidade de sucesso no emprego de tais microrganismos.

39 O biofilme é uma estratégia comum de crescimento das bactérias na natureza
40 Watnick & Kolter (98). As populações bacterianas encontram-se aderidas entre si ou
41 à a uma superfície imersas em uma matriz polimérica, que possui função tampão
42 conferindo proteção a seus membros denominado de biofilme (7, 47, 92).

43 Deste modo, a existência de um biofilme bacteriano, na superfície de um
44 fruto, atuaria como uma barreira biológica à colonização do fitopatógeno, impedindo
45 ou retardando o desenvolvimento do mesmo.

46 O controle biológico por sua vez, é um método capaz de promover o manejo
47 de doenças pós-colheita pelo aumento da atividade de microrganismos benéficos no
48 tecido alvo Alvindia & Natsuaki, (5). Assim sendo, são de suma importância estudos
49 que visem investigar a influência do biofilme bacteriano sobre a atividade antagônica
50 destes agentes, posto que, esta alternativa pode ser promissora para o manejo da
51 antracnose no mamoeiro.

52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79

Objetivo Geral

Prospectar bactérias coletadas da parte aérea do mamoeiro objetivando utiliza-las no biocontrole da antracnose causada por *Colletotrichum* spp. pós-colheita de mamão.

Objetivos Específicos

- Isolar bactérias associadas aos tecidos da parte aérea do mamoeiro;
- Selecionar bactérias antagonistas a *Colletotrichum* spp. por meio da produção de compostos antifúngicos difusíveis e voláteis, quitinase e pela capacidade de inibição da germinação dos conídios do patógeno;
- Quantificar a formação de biofilme bacteriano *in vitro* pelos isolados selecionados;
- Estabelecer combinações de isolados antagonistas;
- Verificar a redução da severidade da antracnose em discos de frutos e frutos inteiros;

80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111

CAPÍTULO I

Estado da Arte

112 **A cultura do mamão**

113

114 O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie herbácea perene, família
115 Caricaceae originária da América tropical (57). Adaptada ao clima tropical, a espécie
116 apresenta alta diversidade genética, provavelmente por apresentar como centro de
117 origem o noroeste da América do Sul, mais precisamente, a Bacia Amazônica
118 Superior Salomão et al.,(79). Nessas condições apresenta ciclo semi-perene, com
119 pico de produção entre dois a cinco anos, sendo uma das poucas fruteiras com
120 capacidade de produção durante todo o ano Ramos et al.,(74).

121 O Brasil é segundo maior produtor e exportador de mamão, atrás apenas da
122 Índia, com 12,6 % da produção mundial. Em 2016 foram produzidas 1.424.650
123 toneladas do fruto no país, em uma área plantada de 30.372 mil hectares em área
124 colhida da fruta, gerando uma receita superior a 43,6 milhões de dólares. Agrolink
125 (2); Cepea,(19), Ibge (37).

126 O mamoeiro é cultivado em praticamente todo território nacional, entretanto,
127 as maiores áreas de produção estão concentradas nos Estados da Bahia e do
128 Espírito Santo, Incaper (40). O estado da Bahia lidera a produção nacional com
129 rendimento superior a 753 mil toneladas, seguido do Espírito Santo com a 251.365.
130 A soma desses valores representa 71,33 % da produção brasileira, com um total
131 acima de um bilhão de frutos produzidos. Ibge, (37). A cultura apresenta grande
132 importância social, e econômica, uma vez que gera emprego e renda durante todo o
133 ano.

134 A União Europeia, devido à popularidade das frutas tropicais, tem assegurado
135 demanda constante no bloco. Assim sendo, é de suma importância que produtores
136 brasileiros voltem suas atenções aos padrões de comercialização internacional,
137 como baixo nível de resíduos de agrotóxicos aplicados nas fases pré e pós-colheita,

138 ausência de podridões, além da aparência, aroma e sabor como quesitos
139 indicadores de garantia de aceitação dos frutos, visando manter a boa reputação da
140 fruta brasileira no exterior Cepea(19); Nery e Silva et al., (73)

141 Apesar dessa posição de destaque, aproximadamente apenas 3 % dos frutos
142 produzidos no país são exportados, além das exigências do mercado exportador, a
143 ocorrência de problemas fitossanitários, na pré e pós colheita, comprometem a
144 qualidade final do produto e conseqüentemente a comercialização (KIST et al.,
145 2012),

146 O volume exportado pelo Brasil, de acordo com a Secex, em 2017 foi de
147 39,11 mil toneladas, 3,1% superior ao embarcado no ano anterior, entretanto, 1,7 %
148 inferior a 2015, que é considerado o ano recorde de exportações da fruta, quando
149 comparado apenas ao segundo semestre do mesmo ano, a queda das exportações
150 superam 20% Cepea (19).

151

152 **A antracnose no mamoeiro**

153 O mamoeiro apresenta um histórico de problemas fitossanitários responsáveis
154 por perdas significativas na produção. Dentre as doenças que acometem a cultura
155 destaca-se a antracnose, uma doença fúngica pós-colheita que geralmente é
156 associada ao *Colletotrichum gloesporioides*, teleomorfo *Glomerella cingulata*. Dantas
157 (26).

158 Esta doença é de comum ocorrência nas regiões produtoras em todo o
159 mundo. Os sintomas são expressados nos frutos maduros, nas fases de
160 embalagem, transporte, amadurecimento e comercialização Oliveira et al., (65) e um
161 dos fatores limitantes à exportação. Liberato & Tatagiba (53).

162 Embora a antracnose seja de suma importância na fase pós-colheita, a
163 infecção inicia-se geralmente no campo, ocorrendo normalmente após a floração,
164 favorecida pelas condições climáticas das regiões produtoras, resultante da entrada
165 do patógeno direta ou indiretamente por fissuras naturais e/ou por injúrias
166 mecânicas provocadas durante a colheita, transporte e armazenamento.
167 Agrios(01);Benato (12).

168 A penetração do fungo se inicia no estigma da flor, pelos ferimentos deixados
169 na emissão das pétalas e principalmente por lesões na superfície dos tecidos. A
170 infecção permanece latente, nas folhas e pecíolos. Nos frutos os sintomas são
171 visíveis na época do amadurecimento, quando haverá maior disponibilidade de
172 nutrientes. Freire (37).

173 Os conídios fixam-se à superfície da planta hospedeira onde germinam,
174 desenvolvendo um pequeno tubo germinativo, e este diferencia-se em apressório
175 que aderem à cutícula do hospedeiro Perfect et al.,(69). Uma vez aderido, o
176 apressório torna-se melanizado e secreta um conjunto enzimático, dentre as quais
177 enzimas hidrolíticas e pectinases, que são essenciais na sinalização, aderência e
178 consequente enfraquecimento da parede celular da planta hospedeira. O'connell et
179 al., (63).

180 *Colletotrichum gloeosporioides*, geralmente associado à antracnose, pertence
181 à ordem Melanconiales, família Melanconiaceae. Produz acérvulos subepidérmicos,
182 dispostos em círculos. Os conídios são hialinos e gutulados, uninucleados,
183 arredondados nas extremidades e levemente curvos, Dodd et al.,(28).

184 Em termos gerais, espécies de *Colletotrichum* são diferenciadas com base em
185 caracteres morfológicos e culturais. Características como a morfologia de conídios,
186 presença de setas, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de

187 crescimento, e a capacidade de se reproduzir sexualmente, tem sido empregadas
188 para diferenciar ou caracterizar espécies Sutton (87); Freeman et al., (36). No
189 entanto este gênero apresenta um complexo de espécies associadas à antracnose.
190 Esse “Complexo Gloesporioides” inclui fungos morfológicamente semelhantes,
191 porém que divergem geneticamente, mas induzem os mesmo sintomas Liu et
192 al.,(54).

193 A antracnose possui como característica marcante a ocorrência de lesões
194 necróticas grandes e arredondadas nos frutos, de bordos suspensos com uma leve
195 depressão no centro das lesões. Essa sintomatologia manifesta-se em plantas de
196 qualquer estágio de desenvolvimento. Entretanto, as injúrias provocadas pelo
197 patógeno são mais evidentes nos frutos e são geralmente expressos após a
198 colheita, quando os mesmos estão prontos para a comercialização Fernandes et
199 al.,(33). O patógeno penetra nos tecidos dos frutos ainda verdes e saudáveis.
200 Permanecendo quiescente até o início da maturação Bailey & Jeger, (08);
201 Fernandes et al., (33), Salomão et al.,(80).

202 A colonização do fungo é concentrada na parte central da lesão,
203 correspondente ao patógeno, que permanece em estado saprofítico reproduzindo-se
204 abundantemente, tanto nas folhas mais velhas quanto nos frutos mumificados que
205 caem no solo. A infecção nas folhas novas se inicia com lesões quase que
206 imperceptíveis, circulares, isoladas, translúcidas que, coalescem e tornam-se
207 marrons, causando necrose nos tecidos e o amarelecimento das folhas. Oliveira
208 (65); Reis et al.,(75).

209

210 **Controle químico**

211

212 O controle químico associado ao tratamento hidrotérmico é o principal
213 tratamento utilizado no controle das doenças pós-colheita, e integra uma série de
214 fungicidas pertencentes aos grupos imidazol, benzimidazóis e bisditiocarbamato, em
215 prol de garantir uma maior sobrevida ao fruto. Agprofit,(03); Bautista-banões,(10);
216 Robs (77); Sholberg & Conway,(84);

217 A utilização de fungicidas na pós-colheita do mamão depende do mercado a
218 qual mercado os frutos serão destinados. Os frutos para consumo nacional recebem
219 aplicação de fungicidas sintéticos, na maioria das vezes de forma indiscriminada, na
220 tentativa de sanar os problemas fitossanitários. Para fins de exportação as frutas
221 devem apresentar um padrão de qualidade definido pelas exigências do exportador.
222 Isso implica na obrigatoriedade da certificação de frutas.

223 A esse respeito, em alguns países como o Brasil, existem poucas ou
224 nenhuma regulamentações para o uso de produtos químicos. Já para o mercado de
225 exportação as normas quanto ao uso de fungicidas é protegido por legislações
226 específicas, com controle permanente de toda cadeia produtiva no país exportador.

227 A aplicação de produtos químicos promove sérios riscos para o meio
228 ambiente e à saúde humana, principalmente pela presença de resíduos tóxicos, que
229 são acumulativos no organismo. Além disso, alguns fungos patogênicos adquirem
230 resistência a fungicidas, quando empregados de forma indiscriminada, o que é um
231 fator limitante no uso desses produtos e exige o desenvolvimento de pesquisas que
232 visem a redução e /ou substituição desses produtos tóxicos, como a produção
233 integrada, que utiliza outros métodos para o controle de doenças pós-colheita.
234 Nesse sentido, a combinação de fungicidas em concentrações mais baixas, com
235 outros métodos, é um procedimento comum durante o manejo dos frutos no controle
236 das doenças pós-colheita. (81,100).

237

238 Controle Biológico

239 O controle biológico tem por definição a supressão do inóculo ou da atividade
240 de um patógeno por meio de um ou mais organismos, excluindo o homem que atua
241 de forma passiva no processo. Cook & Baker (21). O termo é empregado em
242 fitopatologia para o uso de microrganismos antagonicos no controle de doenças.
243 PAL (67).

244 Neste contexto, a aplicação de antagonistas é a principal estratégia utilizada
245 para suprimir a infecção por patógenos. Bertolini et al.,(13), Korsten et al.,(49)
246 ,Leibinger et al.,(52), Teixid'o et al.,(88). A atividade antagonica de diversos
247 microrganismos vem sendo amplamente utilizada no controle de doenças pós-
248 colheita em variadas culturas exibindo resultados promissores. Apresenta uma
249 complexa interação planta-patógeno-antagonistas-meio ambiente, além da produção
250 de substâncias capazes de inibir o crescimento do patógeno. Droby & Chalutz (29),
251 e no caso dos agentes bacterianos, a associação em biofilmes pode influenciar
252 diretamente no sucesso do biocontrole.

253 Segundo Pimenta et al., (70) o controle biológico clássico desenvolve-se
254 mediante o isolamento de cepas de ocorrência natural associadas ao vegetal-alvo,
255 para obtenção de uma ou mais espécies que possam expressar seu potencial
256 antagonico. Posteriormente, são realizados experimentos de seleção, multiplicação
257 desses agentes em laboratório e testes *in vivo*, a fim de comprovar a eficácia do
258 biocontrole.

259 A capacidade atuação de um agente de controle de doenças deve-se a uma
260 variedade de mecanismos de ação Lanna Filho et al., (34), dentre esses a
261 competição por nutrientes e espaço. Wang et al., (95); a indução de resistência

262 Araujo e Meneses, (06); Chalfoun et al., (20), a antibiose. LOUSADA et al., (56),
263 ocorrência de parasitismo KUPPER et al.,(50), produção de compostos
264 antimicrobianos voláteis ou não voláteis ASARI et al., (07), além da produção de
265 quitinases.

266 Embora os mecanismos de ação expressados pelos agentes de biocontrole
267 sejam distintos, um microrganismo pode agir por meio de mais de um recurso, sendo
268 o desejável na busca de um antagonista, pois, dessa forma, as chances de sucesso
269 no controle são elevadas. Bettiol e Ghini, (14).

270 Vários agentes de biocontrole como bactérias, leveduras e fungos foram
271 testados na supressão de diferentes patógenos em mamão pós-
272 colheita. Geralmente, os efeitos positivos dessa tecnologia podem diferir de acordo
273 com as espécies antagonistas aplicadas. Por outro lado, os níveis de controle
274 também podem variar em condições *in vitro* ou *in vivo*. Bautista-Baños et al., (10).

275 Viana et al., (93) observaram a inibição *in vitro* de *Colletotrichum*
276 *gloesporioides* por leveduras-killer em até 60%, além da redução em até 25 % da
277 ocorrência da antracnose em frutos de mamão em pós-colheita. Já Valenzuela et al.
278 (91) verificaram a capacidade antagônica de cepas de *Trichoderma* a *Colletotrichum*
279 *gloesporioides*. O micoparasitismo foi o mecanismo de ação identificado, somado
280 ainda à diminuição do número de lesões nos frutos.

281 Outros estudos também destacaram a associação de microrganismos
282 antagônicos com outras medidas de controle contribuindo na redução dos níveis de
283 doença do mamão. Neste quesito estudos com a cepa *Candida oleophila* na
284 concentração de 10^3 células / mL combinada com bicarbonato de sódio a 2 %
285 reduziram a incidência da doença em aproximadamente 60 % mais do que os
286 tratamentos aplicados isoladamente Gamagae et al., (38). Posteriormente a mesma

287 cepa, em concentração diferente, desta vez 10^8 células / mL incorporados
288 numa base de cera na formulação, associada a 2 % de bicarbonato de sódio reduziu
289 a incidência da doença em até 60 % Gamagae et al., (38).

290 A consistência e/ou eficiência dos resultados em condições reais de cultivo é
291 muito questionada quando o método utilizado é o controle biológico. Um dos motivos
292 para o insucesso do biocontrole é a instabilidade de controle é as condições
293 ambientais. Em pós-colheita, estas condições podem ser facilmente mediado,
294 facilitando a aplicação e atuação dos agentes antagonistas. Assim, pode-se dizer
295 que microrganismos antagonistas podem ser promissores como “fungicidas vivos”
296 para o controle de doenças pós-colheita de frutos (WILSON et al., 1999; Bautista-
297 Baños et al.,(10).

298

299 **Bactérias no controle de fitopatógenos**

300

301 Dentre os microrganismos com potencial antagônico a fitopatógenos já
302 comprovados citam-se as bactérias, em virtude da habilidade de crescimento em
303 superfícies da planta hospedeira, pela produção de metabólitos, além de apresentar
304 elevada taxa de reprodução, facilidade no cultivo, manipulação e baixo requerimento
305 nutricional.

306 *Bacillus subtilis* isolados da cultura alvo, ou de culturas distintas tem sido
307 reportada com sucesso no biocontrole de fitopatógenos em distintas culturas como
308 abacate, manga e citrus (06, 49, 50,51). Os microrganismos pertencentes a este
309 gênero apresentam a capacidade de formar endósporos tolerantes a variações de
310 pH e temperatura, fertilizantes, pesticidas, além dos múltiplos mecanismos
311 antagônicos, capazes de ultrapassar as defesas do patógeno (34, 47).

312 Neste quesito, também foi relatado a eficácia do controle da antracnose em
313 pós-colheita do mamão mediante a associação da cepa B23 de *Burkholderia*
314 *cepacia* em concentração 10^9 UFC / mL, com a quitosana a 0,75 %, combinada com
315 3 % de cloreto de cálcio Rahman et al., (72). Shi et al. (83) relatam *Pseudomonas*
316 *putida* biovar MPG1, aplicada também em pós-colheita, reduziu a incidência da
317 antracnose em mamão além de retardar a infecção do patógeno. No entanto, esse
318 controle não excedeu a efetividade do fungicida sintético Ridomil.

319 Ademais, há estudos que comprovam a eficácia de *Bacillus*
320 *amyloliquefaciens*, aplicado nos frutos de mamão após tratamento com
321 metilciclopropeno, no controle da antracnose. Essa combinação reduziu a incidência
322 da doença em 50 %, além de aumentar o tempo para a maturação dos frutos,
323 mantendo a firmeza e retenção de cor Osman et al., (66), ressaltando assim a
324 importância da associação dos agentes de biocontrole, com às práticas rotineiras de
325 controle de doença pós colheita Janisiewicz & Korsten (43).

326 Em outras culturas, estudos conduzidos quanto à potencialidade
327 Antagonística de isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus* spp. e um isolado de *B.*
328 *thuringiensis* a *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura no citrus
329 pela produção de metabolitos foram avaliados. Resultados significativos foram
330 obtidos, e a redução a cerca de 20 % do crescimento micelial do patógeno foi
331 verificada quando comparada ao controle químico (51).

332 Em Macieira altos níveis de supressão à fitobactéria *Erwinia amylovora*,
333 agente causal da queima da macieira, foi verificado por meio do antagonismo
334 exercido por de isolados bacterianos obtidos de flores da cultura alvo. Dentre os
335 gêneros avaliados, os melhores resultados foram obtidos pelas espécies bacterianas

336 pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Pantoea*, e leveduras pertencentes ao
337 gênero *Cryptococcus*. Pusey *et al.*,(71).

338 Existem duas formas básicas para o uso dos antagonistas microbianos para o
339 controle das doenças pós-colheita de frutas: a utilização de microrganismos
340 existentes no próprio ambiente alvo, ou aqueles que podem ser introduzidos
341 artificialmente na ação contra patógenos Sharman *et al.*, (81).

342 Mediante o exposto infere-se que a proposta mais viável para a utilização de
343 bactérias como agentes de biocontrole de doenças em pós-colheita de mamão seja
344 o emprego e manejo de antagonistas naturalmente existentes na cultura por serem
345 bem adaptados à superfície alvo Alvindia; Natsuaki (05). E em casos de doenças
346 como antracnose cujo patógeno possui estado epifítico no seu desenvolvimento,
347 populações microbianas podem causar interferência na interação patógeno/planta
348 antes mesmo da infecção Beattie; Lindow (11).

349 Trata-se de um método sustentável, eficiente, não residual, com baixos riscos
350 ao meio ambiente, e tampouco à saúde do consumidor. Deste modo, pode contribuir
351 para: redução das aplicações de agroquímicos; melhoria da qualidade e aceitação
352 dos frutos pelo mercado, minimizar a poluição ambiental, além de conferir menor
353 custo e riscos na sua utilização.

354

355 **Biofilme**

356 O biofilme é uma condição natural de crescimento das bactérias na natureza
357 em associação entre si e / ou a superfícies e interfaces. São comunidades de células
358 estruturadas aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, envolvidas numa matriz
359 polimérica extracelular. Em outras palavras, biofilmes são compostos por células
360 bacterianas, exopolissacarídeos (EPS), proteínas e DNA. (23,27,86,98).

361 O biofilme, além de seu papel no suporte de células, age como um tampão,
362 protegendo as células bacterianas de mudanças abruptas nas condições do
363 ambiente, além da ação de compostos antimicrobianos produzidos por outros
364 microrganismos Ramey *et al.*, (73), auxilia na colonização de fitopatógenos,
365 bloqueando o fluxo de nutrientes, protege a população bacteriana contra os
366 mecanismos de defesa das plantas, quando atacadas por patógenos Walker *et al.*,
367 (94), e também contra diferentes estresses ambientais Lindow & Monier, (59);
368 Danhorn e Fuqua, (25). Sua formação é desencadeada por condições externas
369 desfavoráveis resultantes de modificações na expressão gênica, que alteram o
370 microambiente de seus indivíduos, e conseqüentemente os genes envolvidos no
371 processo de formação, sinalização, maturação e desagregação do biofilme
372 Jefferson, (44).

373 A quantidade de EPS (Extracelular Polymeric substance) varia de acordo com
374 o gênero e espécie para formação do biofilme bacteriano. Apesar da composição
375 heterogênea, os EPS são compostos essenciais da matriz do biofilme, fornecendo a
376 estrutura na qual as células microbianas são inseridas Branda, *et al.*,(16). O EPS
377 confere a adesão à superfície ajusta a estabilidade mecânica ao biofilme, resguarda
378 as células contra ataques externos formando uma rede tridimensional que conecta e
379 imobiliza as células no biofilme. Flemming & Wingender, (35).

380 O processo de formação destas estruturas envolve passos sequenciais
381 compreendidos em nove etapas básicas: (1) células bacterianas (microrganismos
382 primários) na forma planctônica, que aderem a uma determinada superfície sólida
383 por meio das forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e força eletrostática
384 em meio aquoso; (2) multiplicação celular e produção de EPS, matriz polimérica,
385 (microrganismos secundários), essa matriz favorece a aderência das microcolônias,

386 nesta fase a adesão é irreversível; (3) estruturas de alta complexidade sendo
387 preparadas; (4) Formação de um biofilme mais elaborado contendo canais para fluxo
388 de nutrientes e excreções; (5) disseminação celular e colonização subsequente de
389 outras superfícies; (6) Sinalização moléculas célula/célula - *Quorum Sensing*; (7)
390 Transporte de substratos para dentro do biofilme; (8) Metabolismo das celular
391 ligadas ao biofilme e transporte de produtos para fora do biofilme; (9) Remoção do
392 biofilme por remoção ou desagregação. Nattress,(61) .

393 As bactérias associadas às plantas interagem com as superfícies do tecido do
394 hospedeiro durante a patogênese e a simbiose e nas relações de comensalismo. A
395 superfície do tecido da planta, a disponibilidade de nutrientes e água e as tendências
396 das estirpes colonizadoras influenciam fortemente a estrutura de biofilme resultante
397 Ramey et al.,(73).

398 Espécies de *Pseudomonas* formam densos biofilmes em superfícies abióticas
399 e bióticas, sendo um modelo primário na pesquisa de biofilme Parsek e Fuqua,
400 (68). A *Pseudomonas putida* pode responder rapidamente à presença de exsudatos
401 radiculares nos solos, convergindo nos locais de colonização radicular e
402 estabelecendo biofilmes estáveis que atuam na promoção de crescimento das
403 plantas (30).

404 Do mesmo modo *Azospirillum brasilense* e espécies relacionadas são
405 proteobactérias móveis e heterotróficas que interagem com raízes de uma variedade
406 de cereais, como trigo e milho, e frequentemente promovem o crescimento de suas
407 plantas hospedeiras Bais et al., (09). Ademais, relatos são referentes à aderência
408 em sementes e brotos e a atuação do biofilme na rizosfera. Tal estratégia utilizada
409 no biocontrole de doenças pós-colheita, não foi relatada.

410 As bactérias interagem fisicamente com as plantas de diversas
411 maneiras. Uma característica comum dessa interação é a colonização superficial, na
412 qual os microrganismos aderem aos tecidos vegetais externos e internos como
413 células individuais e grupos. As populações aderentes que são definidas como
414 biofilmes exibem uma gama de composições, dimensões e localizações. Cada
415 microambiente da planta possui níveis de saturação característicos, disponibilidade
416 de nutrientes e químicas de superfície, os quais influenciam diretamente na forma e
417 a atividade dos biofilmes Ramey et al., (73).

418 Dentro do contexto da busca por potenciais agentes bacterianos de
419 biocontrole, poucos estudos consideram a capacidade de formação de biofilme
420 como uma característica adicional na seleção de antagonistas, detendo-se nos
421 mecanismos clássicos. Assim, essa é uma característica que deve ser levada em
422 conta, uma vez que biofilmes bacterianos podem contribuir com o sucesso do
423 biocontrole de fitopatógenos.

424 Bais et al. (09) trabalharam com um isolado de *Bacillus subtilis*, selecionado
425 previamente como antagonico a *Pseudomonas syringae* em arabis. Os autores
426 puderam verificar em estudo preliminar, que a formação de biofilme pela cepa de *B.*
427 *subtilis* estudada dependia diretamente da produção de uma surfactina. E ao testar
428 mutantes deficientes na produção de surfactina contra *Pseudomonas syringae* a
429 cepa mutante não proporcionou nenhuma proteção à planta, obtendo elevados
430 níveis nas mesmas, podendo ser comparadas com plantas inoculadas apenas com a
431 bactéria fitopatogênicas. Dessa forma comprovaram que, a formação do biofilme
432 está diretamente relacionada no biocontrole apresentado pelo *B. subtilis*.

433 Em razão das perdas substanciais geradas pelas doenças na pré e pós
434 colheita, fazem-se necessário estudos sobre a influência do biofilme, nos

435 mecanismos de ação expressados pelos antagonistas bacterianos, uma vez que, o
436 biofilme, pode atuar como barreiras de natureza física, química e/ou biológica à
437 colonização de outros microrganismos, como fitopatógenos, impedindo o
438 desenvolvimento dos mesmos.

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464 **REFERÊNCIAS**

465 **1-** Agrios, G.N.; **Plant Pathology**. 5 Ed. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier
466 Academic Press, 2005.

467 **2-** AGROLINK. Produção e exportação do mamão brasileiro Disponível em :.
468 <https://www.agrolink.com.br/cotacoes/frutas/mamao/>. Acesso em: 23 de junho de
469 2018

470 **3-** AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:.
471 http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: 20
472 de junho de 2018.

473 **4-** Almeida, J.G.F.; Barreira às exportações de frutas tropicais. **Fitopatologia**
474 **Brasileira**, 27:sS7-S10, 2002.

475 **5-** Alwindia, D.G., Natsuaki, K.T.; Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana
476 fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. **Crop Protection**, 27:1200-
477 1207, 2008.

478 **6-** Araujo, F.F., Menezes, D.; Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro
479 por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa**
480 **phytopathologica**, 35:169-172, 2009.

481 **7-** Asari, S., Matzén, S., Petersen, M.A., Bejai, S., Meijer, J.; Multiple effects of
482 *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth
483 inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, 92: fis070, 2016.

484 **8-** Bailey, J.A., Jeger, J.M.; *Colletotrichum*: biology, pathology control. Oxford: British
485 Society for **Plant Pathology**, 1992.

- 486 **9-** Bais, H.P., Jorge, R.F., Vivanco, M.; *Biocontrol of Bacillus subtilis* against Infection
487 of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation
488 and Surfactin Production. **Plant Physiol.** 134(1): 307–319, 2004.
- 489 **10-**Bautista-banões, S., Sivakumar, D., Bello-pérez, A., Villanueva-arce, R.,
490 Hernández-lópez, M.; A review of the management alternatives for controlling fungi
491 on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Postharvest Biology and**
492 **Technology**, 2013.
- 493 **11-** Beattie, G.A., & Lindow, S.E.; The secret life of foliar bacterial pathogens on
494 leaves. **Annual Review of Phytopathology** 33:145-172, 2013.
- 495 **12-** Benato, E.A.; Controle de doenças pós-colheita em frutos tropicais. **Summa**
496 **Phytopathologica**, 25:90-93, 1999.
- 497 **13-** Bertolini, P., Sijmons, P.C., Guerzoni, M.E., Serra, F.; eds. Joint Workshop Non
498 Conventional Methods for the Control of Postharvest Disease and Microbial
499 Spoilage. Lux-embourg: Publ. **Eur. Community**, 1998.
- 500 **14-** Bettiol, W., Ghini, R.; 3ed.Controle biológico. In: bergamin filho, A Kimati,
501 H,Amorim, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. v.1: Princípios e conceitos. 3ed. São
502 Paulo: Agronômica Ceres, 1995.
- 503 **15-** Bosland, P.W., Votava ,E.J.; Pimentas: Vegetais e Spice Capsicums. **CAB**
504 **International**, Inglaterra, p.233, 2003.
- 505 **16-** Branda, S., S., Vik, A., Friedman, L., Kolter, R.; Biofilms: the matrix revisited.
506 **TRENDS in Microbiology**, 13: 20-26, 2006.

- 507 **17-** Campos Silva, J.R, Souza, R.M., Zacarone, A.B., Silva, L.H.C.P., Castro, A.M.S
508 Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv.
509 *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, 32:
510 1062-1072, 2008.
- 511 **18-** Casarrubias-carrillo, U., Cárdenas-soriano, E., Nieto-angel, D., Gutiérrez-alonso
512 ,G.; Histopatologia de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) infectados por
513 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Revista Mexicana de Patologia Plantia**,
514 Ciudad Obregón, 20:88-93, 2002.
- 515 **19-** CEPEA Disponível em: [https://www.hfbrasil.org.br/br/mamao-cepea-volume-](https://www.hfbrasil.org.br/br/mamao-cepea-volume-exportado-em-2018-pode-ser-proximo-ao-de-2017.aspx)
516 [exportado-em-2018-pode-ser-proximo-ao-de-2017.aspx](https://www.hfbrasil.org.br/br/mamao-cepea-volume-exportado-em-2018-pode-ser-proximo-ao-de-2017.aspx). Acesso em 15/06/2018.
- 517 **20-** Chalfoun, N.R., Castagnaro, A.P., Ricci, J.C.D.; Induced resistance activated by
518 a culture filtrate derived from an avirulent pathogen as a mechanism of biological
519 control of anthracnose in strawberry. **Biological Control**, 58:319–329, 2011.
- 520 **21-** Cook, R.J., Baker, K.F.; The nature and practice of biological control of plant
521 pathogens. St. Paul, **The American Phytopathology Society**. APS 539p, 1998.
- 522 **22-** Correa, É.B., Galvao, J.A.H., Bettiol, W.; Controle biológico da podridão radicular
523 e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microrganismos de
524 manguezais. **Pesq. Agropec. Bras.**, 46:130-136, 2011.
- 525 **23-** Costerton, J.W., Lewandowski Z, Caldwell, D, Korber DR.; **Critical Reviews in**
526 **Microbiology**, 35: 157-168. 2009.
- 527 **24-** Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.R.; Bacterial biofilms: a common
528 cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322, 1999.

- 529 **25-** Danhorn, T., Fuqua, C.; Formação de biofilme por bactérias associadas a
530 plantas. *Annual Revision Microbiol* 61: 401-422, 2007.
- 531 **26-** Dantas, S.A.F.; Doenças fúngicas pós-colheita em frutas de mamão e laranja:
532 ocorrência e indução de resistência com elicitores bióticos e abióticos. **Tese**
533 **(Doutorado em Fitopatologia)** -Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil,
534 2003.
- 535 **27-** Davey, M.E., O'Toole, G.A.; Biofilmes microbianos: da ecologia à genética
536 molecular. **Microbiol Mol Biol Rev** 64 : 847-867, 2005.
- 537 **28-** Dodd, J.C., Prusky, D., Jeffries, P.; Fruit Diseases. In: LITZ, r. e. (Ed.). The
538 Mango: botany, production and uses. Wallingford: **CAB Internacional**, cap 8, p. 357-
539 280, 1997.
- 540 **29-** Droby, S., Chalutz, E.; Mode of action of biocontrol agents of postharvest
541 diseases. In: Wilson CL Wisniewski ME (Ed.) **Biological control** of postharvest
542 diseases theory and practice. Boca Raton: CRC Press. pp. 63-75, 1994.
- 543 **30-** Espinosa, U.M., Kolter R, Ramos, J.L.; Root colonization by *Pseudomonas*
544 *putida*: love at first site. **Microbiology**. 148:341-342, 2002.
- 545 **31-** Falconi, C.J., Mendgen, K.; Epiphytic fungi on apple leaves and their value for
546 control of the postharvest pathogens *Botrytis cinérea* *Monilinia fructigena* and
547 *Penicillium expansum* and *Penicillium expansum* J. **Plant Pathol**. 101:38–47, 1994.
- 548 **32-** FAO. Statistics Division, (2016). Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/> E>
549 Acesso em: Jul.2018.

- 550 **33-** Fernandes, M.C.A., Sartori, A.S., Ribeiro, P,L,D. Adaptação patogênica de
551 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e
552 berinjela. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, 28: 325-330, 2002.
- 553 **34-** Lana Filho, R., Ferro, H.M., Pinho, R.S.C.; Controle biológico mediado por
554 *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, 4:12- 20, 2010.
- 555 **35-** Flemming, H.C.J., Wingender, G., Mayer, C.; Physico-chemicalproperties of
556 biofilms. *In*: Evans, L.V. (ed). *Biofilms:Recent advances in their study and control*.
557 **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam, pp 19-34, 2000.
- 558 **36-**Freeman, S., Katan, T., Shabi, E.; Characterization of *Colletotrichum* species
559 responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul,
560 82:596-605, 1998.
- 561 **37-**Freire, F.C.O.; Doenças atuais e Potenciais das principais fruteiras e flores
562 ornamentais do Nordeste. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 31, 2006.
- 563 **38-**Gamagae, S.U., Sivakumar, D., Wijesundera, R.L.C.; Evaluation of post
564 harvestapplication of sodium bicarbonate-incorporated wax formulation and *Candida*
565 *oleophila* for the control of anthracnose of papaya. **Crop Prot.**, 23:575-579, 2004.
- 566 **39-** IBGE. Área colhida, quantidade produzida, rendimento médio, participação no
567 total da produção nacional e valor da produção de mamão, segundo a importância
568 das unidades da federação produtoras. Disponível:<http://www.sidra.ibge.gov.br/>.
569 Acesso em: 13/06/2018.
- 570 **40-** Incaper. Polos de Fruticultura – Mamão. Disponível em:
571 <<https://incaper.es.gov.br/fruticultura-mamao>> /. Acesso em: 25/06/2018.

- 572 **41-** Infobios. Antracnose relacionada a furteiras. Disponível em:
573 <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/Antracnose/Index.htm>. Acesso em 20 de
574 junho de 2018.
- 575 **42-** Janisiewicz, W.J.; Postharvest biological control of blue mold on apples.
576 **Phytopathology** 77:481–85, 1987.
- 577 **43-** Janisiewicz, W. J., Korsten, L.; Biological control of postharvest diseases of fruits.
578 **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto 40:411- 441, 2002.
- 579 **44-** Jefferson, K.K.; What drives bacteria to produce biofilm. **FEMS Microbiol Lett**
580 236:163-173, (2004).
- 581 **45-** Kamil, Z., Rizk, M., Saleh, M., Moustafa, S.; Isolation and Identification of
582 Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol.
583 **Global Journal of Molecular Sciences**, 2 :7-66, 2007.
- 584 **46-** Kist, B.B, Vencato, A.C., Santos, C., Carvalho, C., Reetz, E.R., Poll, H., Beling,
585 B.R.; **Anuário brasileiro da fruticultura** ,Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa
586 Cruz,128p, 2012.
- 587 **47-** Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S.; Induced systemic resistance and
588 promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology** 94:1259– 1266, 2004.
- 589 **48-** Koerstgens, V, Flemming HC, WIngender, J., Borchard, W.; Influence of calcium
590 ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas*
591 *aeruginosa*. *Water Science Technology*, 43:49–57, 2001.

- 592 **49-** Korsten, L., Jager, E., Villiers, E., Lourens, A., Kotze, J., Wehner, F.; Evaluation
593 of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of
594 avocado postharvest diseases. **Plant Dis** 79:1149-56, 1995.
- 595 **50-** Kupper, K.C., Bellotte, J.A.M., Goes, A.; Controle alternativo de *Colletotrichum*
596 *acutatum* agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira**
597 **de Fruticultura**. Jaboticabal, 31:1004-1015, 2009.
- 598 **51-** Kupper, K.C., Gimenes-fernandes, N. & Goes, A.; Controle biológico de
599 *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos.
600 **Fitopatologia Brasileira** 28:251-257, 2003.
- 601 **52-** Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mend- Gen, K.; Control of postharvest
602 pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in
603 the field. **Phytopathology** 87:1103–1110, 1997.
- 604 **53-** Liberato, J.R. & Tatagiba, J.S.; Avaliação de fungicidas *in vitro* e em pós-colheita
605 para o controle da antracnose e da podridão peduncular em frutos de mamão.
606 **Summa Phytopathologica**. 26:409-414, 2001.
- 607 **54-** Liu, F., Weir, B.S., Damm. U., Crous, P.W., Wang, Y. Liu, B., Cai, L.; Unravelling
608 *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to
609 resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny*
610 **and Evolution of Fungi**, 2015.
- 611 **55-** Lodewyckx, C., Mergeay, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Van Der Lelie,
612 D.; Isolation, characterization and identification of bacteria associated to the zinc
613 hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. **Int. J. Phytorem.**
614 4:101–115, 2002.

- 615 **56-** Louzada, G.A.S., Carvalho, D.D.C., Mello, S.C.M., Lobo Júnior, M., Martins, I.,
616 Braún, L.M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. Originários de diferentes
617 agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrop**,
618 2009.
- 619 **57-** Manic, I., Martins, D.S., Ventura, J.A.; Mamão: Tecnologia de produção, pos-
620 colheita, exportação, mercados. Porto Alegre: Cinco **continentes**, 2006.
- 621 **58-** Meziane, H., Vande, S.I., Van Loon, L.C., Höft, M., Bakker, P.A.H.; Determinants
622 of *P. putida* WCS358 involved in induced systemic resistance in plants. **Molecular**
623 **Plant Pathology** 6, 177–185, 2005.
- 624 **59-** Monier, J.M., Lindow, S.E.; A sobrevivência diferencial de células bacterianas solitárias
625 e agregadas promove a formação de agregados em superfícies foliares, 2003.
- 626 **60-** Nery-Silva, F.A.; Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão
627 peduncular em mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p.1374-1379,
628 2007.
- 629 **61-** Nattress, F.M.; Biofilm formation, (2014).
630 Newman, K.L., Almeida, R.P.P., Purcell, A.H, Lindow, S.E.; Uso de uma cepa verde
631 fluorescente para análise da colonização por *Xylella fastidiosa* de *Vitis vinifera* . Appl
632 Environ **Microbiology** 69: 7319-7327, 2003.
- 633 **62-** Njoroge, J., Sperandio, J., Jamming.; Comunicação bacteriana: novas
634 abordagens para o tratamento de doenças infecciosas. **EMBO Molec Med** 1: 201–
635 210, 2009.

- 636 **63-** O'connell, R. J., Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib, M.; pathosystem for
637 the molecular dissection of plant-fungal interactions. **Molecular Plant-Microbe**
638 **Interactions**, v.17, p. 272-282, 2004.
- 639 **64-** O'toole, G.A., Kolter, R.; The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas*
640 *fluorescens* WSC365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a
641 genetic analysis. **Molecular Microbiology**, 28:449-461, 1998.
- 642 **65-** Oliveira, A.A.R.; *et al.* Mamão Produção: Aspectos Técnicos. Embrapa Mandioca
643 Fruticultura. Cruz das Almas, BA. – Brasília: **Embrapa** Comunicação para
644 Transferência de Tecnologia. Brasília. 2000.
- 645 **66-** Osman, S.M., Sivakumar, D., Korsten, L.; Effect of biocontrol agent *Bacillus*
646 *amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases
647 and maintenance of fruit quality. **Crop Prot.** 30:173e178, 2011.
- 648 **67-** Pal, K.K., Gardener, B.M.; Biological control of plant pathogens. **The Plant**
649 **Health Instructor**, v. 2, p. 111142, 2006.
- 650 **68-** Parsek MR, Fuqua C (2004) Biofilms : Emerging themes and challenges in
651 studies of surface-associated microbial life. *J Bacteriol* 186:4427-4440.
- 652 **69-** Perfect, S.E., Hughes, H. B., O'connell, R.J., & Green, J.R.; *Colletotrichum*: a
653 model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal genetics*
654 *and Biology*, **Integrated control** 27(2-3), 186-198, 1999.
- 655 **70-** Pimenta, R.S., *et al.* *Penicillium digitatum* by the predacious yeast
656 *Saccharomycopsis crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. **Brazilian**
657 **Journal Microbiology**, 41:404–410, 2010.

- 658 **71-** Pusey, P.L., Stockwell, V.O., & Mazzola, M.; Epiphytic bacteria and yeasts on
659 apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*.
660 **Phytopathology**, 99(5): 571-581, 2009.
- 661 **72-** Rahman, M.A., Mahmud, T.M.M., Kadir, J., Abdul Rahman, R.A., Begum, M.M.
662 Enhancing the efficacy of *Burkholderia cepacia* B23 with calcium chloride and
663 chitosan to control anthracnose of papaya during storage. **Plant Pathology**. J. 25:
664 361 e 368, 2009.
- 665 **73-** Ramey, B.E., Koutsoudis, M., Von Bodman, S.B., & Fuqua, C.; Biofilm 396
666 formation in plant–microbe associations. **Current opinion in microbiology**, 7(6),
667 602-609, 2004.
- 668 **74-** RAMOS, N.F. *et al.* Presença dos vírus da mancha anelar e do amarelo letal em
669 frutos de mamoeiro comercializados. **Tropical plant pathology**, v. 33, n. 6, p. 449-
670 452, dec. 2008 .
671
- 672 **75-** Reis, A., Boiteux, L., Henz, G.P.; Antracnose em Hortaliças da Família
673 Solanacea. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 9p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica
674 79), 2009.
- 675 **76-** Renwick, A., Campbell, R., Coe, S. Assessment of in vivo screening systems for
676 potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, 40:524-
677 532, 1991.
- 678 **77-** Robs, C.F.; Enfermidades de pós-colheita do mamão. In: Mendes, L.G., ANTAS,
679 J.L.L., Morales, C.F.G. (Eds.), Mamão No Brasil. EUFBA/ EMBRAPA-CNPMF, 1996.
- 680 **78-** Romeiro, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas** Viçosa: UFV, 279p, 2001.

- 681 **79-** Rosa, M.M., Tauk-Tornisielo, S.M., Rampazzo, P.E., Ceccato-Antonini, S.R.;
682 2010 valuation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against
683 *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World J. Microb. Biot.**, 26:1491-1502,
- 684 **80-** Salomão, L.C.C.; Cultivo do mamoeiro. Viçosa: Editora UFV, 74p, 2007.
- 685 **81-** Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R.; Extratos e óleos essenciais de plantas
686 medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S. et al. Indução de
687 resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: Fealq, 2005.
- 688 **81-** Sharman, R.R., Singh, D., Singh, R., Biological control of postharvest diseases of
689 fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control** 50,
690 205–221, 2009.
- 691 **82-** Shi, J., Liu, A., Li, X., Feng, S., & Chen, W.; Inhibitory mechanisms induced by
692 the endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. **Biological**
693 **control**, 56(1): 2-8, 2011.
- 694 **83-** Shi, J., Liu, A., Li, X., Feng, S., Chen, W.; Identification of endophytic bacterial
695 strain MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting
696 harvested papaya fruit. **J. Food Sci. Agric.** 90, 227e232, 2009
- 697 **84-** Sholberg, P.L., Conway, W.S.; **Postharvest pathology**, 2001.
- 698 **85-** Smolka, S.; Methods for in vitro- assessment of pesticide effects on micro-
699 organisms of the phyllosphere. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst.* 44:
700 252–64, 1992.
- 701 **86-** Sutherland, I.W.; Microbial polysaccharides from gram negative bacteria.
702 **International Dairy Journal**, 11:663-674, 2001.

- 703 **87-** Sutton, B.C.; The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey,
704 J.A.; Jeger, M.J.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Oxon: **CAB**
705 **International**, 1-26.
- 706 **88-** Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N., Control of Blue Mould of Apples by
707 Preharvest Application of *Candida sake* Grown in Media with Different Water
708 Activity , **Phytopathology** , 88 , 9 , (960), 1998.
- 709 **89-** Teodosio, A.E.M.M. Qualidade pós-colheita do mamão 'golden' (*Carica papaya*
710 L.) utilizando recobrimentos biodegradáveis. Trabalho de conclusão de curso
711 (Tecnologia de Alimentos) Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional,
712 Universidade Federal da Paraíba, Paraíba Brasil, 2014.
- 713 **90-** Tuite, J.; Plant pathological methods. Fungi and bacteria. Plant pathological
714 methods. **Fungi and bacteria**, 1969.
- 715 **91-** Valenzuela, N.L., Angel, D.N., Ortiz, D., Rosas, R.A., García, C.F.O., SANTOS,
716 M.O.; Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma*
717 spp. on maradol papaya fruit, **Biological Control**, 2015.
- 718 **92-** Viana, E.D.S., Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes
719 formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite. Tese doutorado Universidade
720 Federal de Viçosa, 176p, 2006.
- 721 **93-** Viana, F., Lima, F., Lima, J., Pieniz, V, & Gonçalves L Biocontrole da antracnose
722 pós-colheita do mamão com levedura killer. **Embrapa Agroindústria Tropical-**
723 **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2014.

- 724 **94-** Walker, T.S., Bais, H.P., Deziel, E., Schweizer, H.P., Rahme,
725 L.G.; *Pseudomonas aeruginosa*-raiz de plantas interações. Patogenicidade,
726 formação de biofilme e exsudação radicular. **Plant Physiol** 134: 320-331, 2004.
- 727 **95-** Wang, Y. F. *et al.* Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the
728 marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. **Biological Control**, v. 53, n. 2, p.178–
729 182, 2010.
- 730 **96-** Wilson, M., Hirano, S.S., Lindow, S.E., Location na survival of leaf-associated
731 bactéria in relation to pathogenicity and pontential for growth within the leaf Aplied
732 and environmental **microbiology**. 65:1435-1443, 1999.
- 733 **97-** Wirth, S.J., Wolf, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of
734 chitinase and lysozyme activity. **J. Microbiol. Meth.** 2:197-205, 1990.
- 735 **98-** Watnick, P., & Kolter, R. Biofilme, cidade dos micróbios. **Journal of**
736 **bacteriology** , 182 (10), 2675-2679, 2000.
- 737 **99-** Xavier, J.B., Picioreanu, C., Almeida, J.S., Van Loosdrecht, M.C.M.;
738 Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes, 2005. Boletim de
739 Biotecnologia,.Disponível em: <[http://](http://https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/biofilmes.pdf)
740 <https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/biofilmes.pdf> >. Acesso em: 01 de
741 dezembro de 2017.
- 742 **100-** Zambolim, L., Costa, H., Ventura, J.A., Vale, F.X.R.; Controle de doenças pós-
743 colheita de frutas tropicais. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras**
744 **tropicais – doenças e pragas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- 745

746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS EPÍFITAS DO MAMOEIRO COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DA ANTRACNOSE EM PÓS-COLHEITA

Artigo a ser submetido à Revista **Summa Phytopathologica**

784 **RESUMO**

785

786 **SANTOS, L.A.L seleção de bactérias epífitas formadoras de biofilmes para o biocontrole**
787 **da antracnose em pós-colheita de mamoeiro.** Cruz das Almas, 2018. Dissertação (Mestrado
788 em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

789

790 Um total de 224 cepas de bactérias, isoladas das folhas, fragmentos de frutos e sementes do
791 mamão, foram avaliados quanto à atuação como agentes de biocontrole *in vitro* contra
792 *Colletotrichum gloeosporioides*. Os isolados selecionados como antagonistas, foram avaliados
793 também quanto a capacidade de formação de biofilme, sendo esta última uma característica
794 adicional de seleção. Nas quais duas apresentaram capacidade de inibir o patógeno *in vitro*
795 apenas por meio da produção de compostos difusíveis, 47 por compostos voláteis, 17
796 produziram quitinase e oito inibiram a germinação de conídios. Destas, 18 exibiram dois ou
797 mais mecanismos, e apenas um isolado foi positivo para todos os mecanismos avaliados.
798 Dezoito bactérias que exibiram ao menos dois mecanismo de ação, com exceção da 803 e 883
799 foram submetidas ao teste de antibiose recíproca, e também avaliadas, quanto a produção de
800 biofilme *in vitro*, nos tempos de 24,48 e 72 horas. Destas, 11 foram selecionadas para o teste
801 *in vivo*, em discos de frutos de mamão dispostas em cinco combinações bacterianas
802 denominados “mix”, a fim de ampliar a eficácia do biocontrole e dispostos da seguinte forma:
803 “Mix” 1 (901,777,784,916), 2 (901,734, 905, 906), 3 (901, 794, 916, 924), 4 (901, 794, 905,
804 906) e 5 (901, 788, 777, 916). Estes foram avaliados em 3 diferentes concentrações de 10^8 , 10^7
805 e 10^6 UFC / mL₋₁ na redução da severidade da antracnose em discos e frutos inteiros de
806 mamão. Os “Mix” 1,3 e 5 exibiram eficiência superior a 75%, 89% e 90% respectivamente,
807 no controle da doença na concentração 10^8 UFC / mL⁻¹. Os “Mix” 3 e 5 foram avaliados
808 quanto a redução da doença em frutos inteiros de mamão, e comparados ao fungicida
809 (Piraclostrobina 250 g/L). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente
810 casualizado, considerando a presença de ferimentos nas cascas dos frutos. Os “Mix”
811 bacterianos não diferiram significativamente do fungicida, atingiram níveis de redução da
812 doença superiores a 98 %, enquanto o fungicida ultrapassou 97% no controle da antracnose.
813 Estes resultados indicam o uso potencial das bactérias isoladas a partir da cultura alvo como
814 agentes de biocontrole de *C. gloeosporioides* em mamoeiro.

815

816 **Palavras-chave:** *Carica papaya*; *Quorum sensing*; Controle biológico.

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828 **ABSTRACT**

829 **SANTOS, L.A.L seleção de bactérias epífitas formadoras de biofilmes para o biocontrole**
830 **da antracnose em pós-colheita de mamoeiro.** Cruz das Almas, 2018. Dissertação (Mestrado
831 em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

832

833 A total of 224 bacterial strains isolated from leaves, fruit fragments and papaya seeds were
834 evaluated for their performance as in vitro biocontrol agents against *Colletotrichum*
835 *gloeosporioides*. The isolates selected as antagonists were also evaluated for biofilm
836 formation capacity, the latter being an additional selection feature. In two of them they were
837 able to inhibit the pathogen in vitro only by the production of diffusible compounds, 47 by
838 volatile compounds, 17 produced chitinase and eight inhibited conidial germination. Of these,
839 18 exhibited two or more mechanisms, and only one isolate was positive for all evaluated
840 mechanisms. Eighteen bacteria that exhibited at least two mechanisms of action, except for
841 803 and 883 were submitted to the test of reciprocal antibiosis, and also evaluated, in vitro
842 biofilm production, in times of 24, 48 and 72 hours. Of these, 11 were selected for the in vivo
843 test, in disks of papaya fruits arranged in five bacterial combinations called "mix", in order to
844 increase the effectiveness of the biocontrol and arranged as follows: "Mix" 1
845 (901,777,784,916), 2 (901,734, 905, 906), 3 (901, 794, 916, 924), 4 (901, 794, 905, 906) and
846 5 (901, 788, 777, 916). These were evaluated in 3 different concentrations of 108,107 and 106
847 CFU / mL⁻¹ in reducing the severity of anthracnose in discs and whole papaya fruits.
848 Mixtures 1, 3 and 5 showed efficiency over 75%, 89% and 90%, respectively, in control of
849 the disease in the concentration 108 CFU / mL⁻¹. Mix 3 and 5 were evaluated for disease
850 reduction in whole fruits of papaya, and compared to the fungicide (Piraclostrobina 250 g /
851 L). The experiment was conducted in a completely randomized design, considering the
852 presence of wounds in the fruit peels. The bacterial mixes did not differ significantly from the
853 fungicide, reached disease reduction levels higher than 98%, while the fungicide exceeded
854 97% in anthracnose control. These results indicate the potential use of bacteria isolated from
855 the target culture as biocontrol agents of *C. gloeosporioides* in papaya.

856

857 **KEYWORDS:** *Carica papaya*; *Quorum sensing*; Controle biológico.

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872 **INTRODUÇÃO**

873 A cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) possui elevada importância
874 socioeconômica para a fruticultura brasileira, colocando o Brasil em destaque como segundo
875 maior produtor mundial e terceiro exportador do fruto. Cepea (09); Fao (15);

876 Apesar dos bons volumes exportados, ainda possuímos um desafio a ser superado no
877 setor, tendo em vista que o inferior a 10% do que é produzido, é comercializado para outros
878 países e cerca de 90% da produção é absorvida pelo mercado interno Kist et al., (25);
879 Fao,(15); Incaper,(23). Além das barreiras fitossanitárias rigorosas, a proteção exercida pelos
880 exportadores no setor é um dos entraves à expansão da comercialização internacional. Deste
881 modo, utilizar tecnologias que visem maximizar as exportações dentro do rigor do mercado
882 exportador, podem alavancar as exportações da fruta.

883 A fim de reduzir as perdas que giram em torno de 20 % da produção, um manejo
884 cauteloso é adotado por conta da alta perecibilidade e suscetibilidade dos frutos a injúrias
885 mecânicas e doenças na pré e pós-colheita Cepea (09).

886 Entre as principais doenças que acometem os frutos na pós-colheita, a antracnose
887 destaca-se por limitar a vida útil dos frutos durante o armazenamento, o transporte e a
888 comercialização Casarrubias–Carrillo et al., (08). Na maioria das vezes a doença é associada
889 ao *Colletotrichum gloesporioides* como agente causal. Entretanto este gênero apresenta um
890 complexo de espécies associadas à antracnose, que são morfológicamente semelhantes e
891 geneticamente distintas, e que exibem o mesmo quadro sintomatológico Liu et al.,(28).

892 O manejo pós-colheita de doenças em mamão é dependente do destino da
893 produção. Para exportação as etapas são bem definidas, as tecnologias são preventivas e os
894 fungicidas são aplicados mediante a regulamentação do mercado exportador. Já quando os

895 frutos são destinados ao mercado nacional, muitas vezes são empregadas práticas inadequadas
896 de manipulação que resultam em perdas elevadas, além do controle dos fitopatógenos ser
897 mediado, principalmente, pelo uso de fungicidas sintéticos Bautista-Bainos,(06).

898 Devido aos riscos oferecidos à saúde humana, ao meio ambiente, somado ainda, à
899 perda de eficiência dos fungicidas, em razão do surgimento de patógenos resistentes
900 Decapdeville et al., (13), a cadeia produtora, fortemente estimulada pela sociedade, tem
901 demandado a busca de outros métodos de controle de doenças. O controle biológico, por meio
902 da aplicação de microrganismos antagonistas, é uma dessas estratégias que visam substituir
903 e/ou minimizar o uso de defensivos na pré e pós-colheita. Bautista-Banões (06); Nery-Silva et
904 al., (29);

905 Dentre os estudos utilizando agentes de biocontrole de doenças pós-colheita em
906 mamão e outras culturas as leveduras, fungos e bactérias vem sido reportadas e com
907 resultados promissores. Pusey et al., (33); Rahman et al.,(34); Shi et al., (38); Valenzuela et
908 al.,(42); Viana, *et al.*. (93).

909 As bactérias apresentam alto potencial de uso como agentes de biocontrole de doenças
910 em pós-colheita. A elevada capacidade de multiplicação, facilidade para o cultivo e
911 manipulação, baixo requerimento nutricional, além dos mecanismos clássicos inerentes ao
912 biocontrole, como a produção de compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis,
913 micoparasitismo, competição por espaço, e nutrientes, inativação de enzimas envolvidas na
914 patogenicidade Alvindia & Natsuaki, (01); Lanna Filho et al.,(16), são algumas das
915 características inerentes a estes microrganismos.

916 Rahman et al. (34) relataram a eficácia da cepa B23 de *Bulkhoderia cepacia* em
917 concentração 10^9 UFC mL⁻¹ associada a quitosana 0,75% combinada com cloreto de cálcio a 3
918 %, na redução da antracnose pós-colheita em mamão. Shi et al. (2009) verificaram a redução
919 da incidência da antracnose, além retardar a infecção do patógeno nas mesmas condições

920 supracitadas, pela bactéria *Pseudomonas putida* biovar MPG1. No entanto, esse controle não
921 excedeu a efetividade do fungicida sintético Ridomil.

922 Além dos mecanismos clássicos de biocontrole, bactérias associam-se em superfícies
923 pela formação de biofilmes Bais et al., (04). O biofilme é definido como uma matriz de
924 população microbiana aderente entre si e / ou a superfícies e interfaces. Sua composição é
925 basicamente compostos extracelulares, como carboidratos, proteínas e até mesmo DNA.
926 Costerton et al., (11); Lasa, (27). Além de exercer função de suporte das células bacterianas
927 contra forças físicas, também auxilia na sobrevivência contra condições de estresse, como
928 mudanças abruptas de temperatura, pH, e ainda o efeito de compostos antimicrobianos
929 produzidos por outros microrganismos Park e Fuqua,(32).

930 Assim sendo, infere-se que a capacidade de formação do biofilme é uma característica
931 a ser levada em conta na seleção de antagonistas, uma vez que pode influenciar ao sucesso do
932 biocontrole. O biofilme pode atuar como barreiras de natureza física, química e/ou biológica à
933 colonização de fitopatógenos. Deste modo isolados bacterianos que apresentem alta
934 capacidade de formação de biofilme, associado a outros fatores antagonistas, na superfície de
935 um fruto, poderiam contribuir eficazmente para o controle de doenças pós-colheita em
936 mamão.

937 Diante do exposto, os objetivos do trabalho foram prospectar bactérias epífitas do
938 mamoeiro antagonistas a *Colletotrichum* spp., por meio da produção de compostos
939 antimicrobianos difusíveis, voláteis, quitinase e pela inibição da germinação do conídios. Os
940 agentes de biocontrole selecionados foram avaliados quanto à capacidade de formação de
941 biofilme, e ainda quanto a redução da severidade da antracnose pós-colheita em frutos de
942 mamão tratados com combinações de isolados, cuja eficiência foi comparada ao fungicida
943 sintético Piraclostrobina.

944

945 MATERIAL E MÉTODOS

946

947 Isolamento, seleção e preservação de bactérias epifíticas do mamoeiro

948 O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos
949 Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. As bactérias foram isoladas a partir de
950 material vegetal de mamoeiro com bom aspecto fitossanitário, provenientes de pomares
951 caseiros e do centro de abastecimento do município de Feira de Santana, além da unidade
952 experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, e Mamoeiros do Campus da UFRB em
953 Cruz das Almas, sem histórico da doença.

954 Amostras da casca, folhas, fragmentos do fruto e sementes foram coletadas e
955 cortadas em partes de 3 cm por 3 cm, à exceção das sementes que não fracionadas. Dez
956 gramas de cada amostra foram imersos em 20 mL de solução salina a 0,085 % esterilizada,
957 agitados por 20 minutos e filtrados com gaze. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram retiradas
958 seguindo diluição seriada fator 10. De cada diluição, 100 µL foram semeados em placas de
959 Petri contendo meio Agar Nutriente (AN), seguindo-se de incubação a 28 °C, por 24h.

960 As colônias de cada placa foram selecionadas com base em diferentes características
961 morfológicas e preservadas a -80 °C (ROMEIRO, 2009). Foi realizado ‘screening’ inicial *in*
962 *vitro* onde as bactérias isoladas foram avaliadas quanto à capacidade de inibir o crescimento
963 micelial de *Colletotrichum* spp. pela produção de compostos antimicrobianos difusíveis e
964 voláteis, síntese de quitinase e quanto à capacidade de inibição da germinação de conídios do
965 patógeno.

966

967 Produção de compostos antimicrobianos difusíveis

968 Discos de micélio com 5 mm de diâmetro, obtidos de culturas de *Colletotrichum*
969 spp., com sete dias de crescimento, foram transferidos para o centro de placas de Petri

970 contendo meio batata dextrose ágar (BDA). Em quatro diferentes regiões das placas foram
971 depositadas 10 µL de suspensão de células das bactérias, em posições equidistantes. As placas
972 foram incubadas a 28 °C por sete dias. A presença de um halo de inibição entre o isolado e o
973 patógeno caracterizou o antagonismo, permitindo a seleção do isolado em teste.

974

975 **Produção de compostos antimicrobianos voláteis.**

976 Empregou-se o método das placas sobrepostas conforme BHARAT et al. (1980).
977 Para isso, 100 µL de cada suspensão bacteriana foram semeados e espalhados sobre o meio
978 NA em placa de Petri, de forma a produzir uma camada de células na superfície do meio.
979 Após o crescimento das bactérias por 24 h a 28 °C, foi depositado um disco do micélio do
980 patógeno com 5 mm de diâmetro sobre meio BDA no fundo de outra placa. As tampas foram
981 removidas e as duas placas unidas, seladas com filme de PVC e incubadas a 28 °C, por 10
982 dias, até que o micélio do controle atingisse o crescimento máximo em toda placa. Todas as
983 placas foram fotografadas, e o crescimento micelial radial do patógeno foi mensurado com o
984 software Assess 2.0 (Image analysis software for plant disease quantification). Placas
985 contendo apenas o fungo *Colletotrichum* spp. foram utilizadas como controle. Foram
986 selecionados os isolados bacterianos que inibiram o crescimento do fungo acima de 50 %, em
987 comparação ao controle. O experimento foi conduzido em triplicata, cujas médias da inibição
988 foram utilizadas para selecionar os isolados.

989

990 **Produção de quitinase.**

991 Para a seleção de isolados produtores de quitinase, a metodologia descrita por
992 RENWICK et al. (1991) foi utilizada. Os isolados foram multiplicados em meio Caldo
993 Nutritivo por 24 horas a 28 °C. Alíquotas de 5 µL da suspensão de células das bactérias da
994 coleção foram semeadas em meio de sais descrito por (TUIITE, 1969), suplementado com
995 quitina coloidal, como única fonte de carbono e, adicionalmente, 10 mL do corante

996 fluorescente *calcofluor white* M2R (1 g/L; Sigma-Aldrich®). Os isolados foram dispostos em
997 10 pontos distintos da superfície do meio seguindo-se incubação a 28 °C por 10 dias. Foram
998 utilizadas quatro repetições por tratamento. Decorrido este intervalo, foi verificada a produção
999 de quitinase por meio da observação de um halo transparente ao redor da colônia,
1000 contrastando com o restante do meio em coloração azul. A presença do halo foi o fator de
1001 seleção do isolado bacteriano.

1002

1003 **Inibição de germinação de conídios**

1004 Todos os isolados bacterianos foram testados quanto à capacidade de inibirem a
1005 germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. em lâminas de microscopia. As lâminas foram
1006 preparadas adicionando-se 15 mL da suspensão das epífitas (10^8 UFC mL⁻¹) e o mesmo
1007 volume de suspensão de conídios (10^6 con mL⁻¹), e avaliadas após um período de 48 horas
1008 com 100 % de umidade relativa, a 28 °C. Quantificou-se a percentagem de conídios
1009 germinados em três lâminas por antagonista testado, contando-se os conídios em 5 campos.
1010 Foram considerados germinados os conídios cujos tubos germinativos apresentaram 50 % do
1011 tamanho do conídio. O controle foi composto apenas pela suspensão dos conídios em água
1012 destilada. Foram selecionados os isolados que, em média, inibiram a germinação de no
1013 mínimo 80 % dos conídios.

1014

1015 **Antibiose recíproca**

1016 Vislumbrando a possibilidade do uso dos antagonistas em combinações, foi realizado
1017 um ensaio de antibiose recíproca entre 18 isolados sendo eles: 628, 734, 769, 769, 777, 784,
1018 788, 794, 801, 901,905, 916,917 924. Selecionados por apresentarem pelo menos dois
1019 mecanismos de ação contra *Colletotrichum* spp., à exceção apenas dos isolados 761, 787,803
1020 e 883, que exibiram apenas um mecanismo de ação, no entanto se destacaram quanto o
1021 antagonismo *in vitro* a *Colletotrichum* spp. Empregou-se o teste da dupla camada, de acordo

1022 com metodologia de Romeiro (2007). Os isolados foram semeados em placas de Petri
1023 contendo meio NA. Foram distribuídos em 10 pontos equidistantes na superfície do meio de
1024 cultura, 5 μL de suspensão bacteriana, seguido de incubação a 28 °C por 24 horas. Em
1025 seguida adicionaram-se 1,0 mL de clorofórmio na tampa de cada placa por 20 minutos com as
1026 mesmas invertidas. Após este período, as placas foram entreabertas em fluxo laminar por 30
1027 minutos para evaporação de resíduos de clorofórmio. Sobre as colônias mortas 5 mL de meio
1028 NA semi-sólido, contendo 0,1 mL de suspensão aquosa de células do isolado foram
1029 adicionados. As placas foram incubadas a 28 °C e examinadas após 24 horas para verificação
1030 da presença de halos de inibição. A presença de halos caracterizou a incompatibilidade entre
1031 os isolados bacterianos, restringindo as combinações.

1032

1033 **Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de biofilme**

1034

1035 Os dezoito isolados utilizados no teste anterior, foram avaliados quanto à capacidade
1036 de formação de biofilme em microplacas de poliestireno contendo o meio MMS (K_2HPO_4 7 g
1037 L^{-1} ; KH_2PO_4 2 g L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g L^{-1} ; glicerol 4 g L^{-1} e CaCl_2 1
1038 mmol L^{-1}). Inicialmente, os isolados bacterianos foram cultivados por aproximadamente 18
1039 horas a 26 °C, sob agitação, em 10 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI),
1040 seguidos de centrifugação a 4300 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as
1041 células ressuspendidas em 1,5 mL de solução salina 0,85 % esterilizada, seguindo-se de nova
1042 centrifugação na mesma velocidade e tempo. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e
1043 a densidade óptica das células foi padronizada de forma a se obter uma população equivalente a
1044 10^8 UFC mL^{-1} . Aliquotas de 20 μL dessa suspensão foram adicionadas a 180 μL de meio
1045 mínimo de Sais – MMS contido em microplacas de poliestireno de 96 poços, em octuplicata.
1046 As microplacas foram incubadas a 26 °C, por 24/48/72 horas. E o meio de cultura contendo

1047 células não aderidas foi removido. As células aderidas às microplacas foram coradas por 30
1048 minutos com 200 µL de cristal violeta a 0,1 % (p/v) em água destilada. Em seguida, o corante
1049 foi removido e os pocinhos foram lavados delicadamente, por três vezes consecutivas, com
1050 200 µL de água destilada. As placas foram secas em estufa a 40 °C, por 15 minutos. O cristal
1051 violeta retido em cada poço foi dissolvido em 200 µL de etanol (95 %) e a absorbância (A)
1052 quantificada a 600 nm em Leitor de Elisa. O experimento foi conduzido utilizando-se o
1053 delineamento inteiramente casualizado em oito repetições por isolado. As leituras das
1054 densidades óticas obtidas foram relacionadas à adesão das células bacterianas ao poliestireno
1055 e, conseqüentemente, maior capacidade de formação de biofilme.

1056

1057 **Avaliação da redução da antracnose em discos de frutos**

1058

1059 Quantificou-se a redução da antracnose em discos de frutos mamoeiro tratados com
1060 agentes bacterianos. Foram montadas cinco combinações de isolados, a partir de onze
1061 antagonistas selecionados nos ensaios anteriores, que apresentavam ao menos dois
1062 mecanismos de ação, e compatibilidade para uso combinado. Às combinações deu-se a
1063 denominação de “Mix”. Cada “Mix” foi montado distribuindo os isolados de forma a
1064 equilibrar os mecanismos de biocontrole de cada um. A aplicação da suspensão aquosa de
1065 isolados nos discos se deu em três diferentes concentrações, 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC mL⁻¹. Foram
1066 utilizados frutos do grupo formosa, variedade Tainung 01, sadios e colhidos em estágio de
1067 maturação comercial 1, que foram limpos em água corrente, imersos em álcool 70% por 1
1068 minuto, em hipoclorito de sódio 2 %, por 3 minutos, lavados com água esterilizada, e secos ao
1069 ar. Discos de frutos de 2 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura foram retirados e colocados
1070 sobre papel de filtro umedecido, em caixas tipo “nal gene”. Sobre os discos, adicionaram-se
1071 20 µL de suspensão bacteriana nas concentrações 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC mL⁻¹, e o mesmo

1072 volume de uma suspensão de conídios a 10^6 conídios mL^{-1} , concomitantemente. Após a
1073 inoculação, as caixas foram mantidas em incubadora a $25\text{ }^\circ\text{C}$, por sete dias. Os discos foram
1074 fotografados, e a área lesionada foi mensurada por meio do software Assess 2.0 (Image
1075 analysis software for plant disease quantification) APS – American Phytopatological Society.
1076 O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5×3 ,
1077 no qual foram cinco tratamentos, avaliados nas 3 concentrações diferentes 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC
1078 mL^{-1} , com cinco repetições por tratamento, 5 discos por repetição. O controle positivo foi
1079 composto por discos de frutos inoculados apenas com o patógeno, e o negativo, tratados com
1080 água destilada esterilizada. A comparação das médias de área lesionada foi realizada pelo
1081 teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico Sisvar
1082 (versão 5.6; Universidade Federal de Lavras).

1083

1084 **Avaliação da redução da antracnose frutos inteiros**

1085

1086 Em frutos de mamão avaliaram-se os “Mix” que proporcionaram se obtiveram os
1087 melhores resultados e ainda o fungicida (Piraclostrobina 250 g/L), a fim de verificar o
1088 potencial de biocontrole dos “Mix” utilizados, e eficiência dos mesmos, quando comparados
1089 ao agroquímico. O ensaio foi realizado com frutos de mamão no estágio 1 de
1090 desenvolvimento, considerando a presença de ferimentos. Os frutos do grupo formosa,
1091 variedade Tainung 01, foram provenientes de pomares sem incidência da antracnose, e
1092 cultivados em sistema orgânico no município de Cruz das Almas. Foram lavados em água
1093 corrente, imersos em álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio
1094 2%, por 3 minutos, lavados com água destilada, e secos ao ar. Os frutos foram tratados
1095 pulverizando-se suspensão aquosa dos antagonistas (10^8 UFC mL^{-1}), em combinações de
1096 isolados, até o ponto de escorrimento. A seguir, procedeu-se à inoculação por suspensão de

1097 conídios de *Colletotrichum* spp. (10^6 con mL⁻¹). Os frutos sofreram uma injúria de 3 mm de
1098 diâmetro em sua casa. Após as operações descritas os frutos foram acondicionados em caixas
1099 plásticas de 10 L, sobre papel de filtro umedecido, e ficaram à temperatura ambiente por sete
1100 dias. Decorrido este intervalo, a área lesionada foi mensurada nos frutos, por meio da análise
1101 de imagens, utilizando o software Assess 2.0 (Image analysis software for plant disease
1102 quantification) APS – American Phytopathological Society. O ensaio foi montado em
1103 delineamento inteiramente casualizado, considerando a concentração 10^8 dos antagonistas
1104 obtidas na aplicação anterior com frutos com ferimentos. Foram utilizadas cinco repetições. O
1105 controle positivo foi composto por frutos inoculados apenas com o patógeno e negativo com
1106 frutos tratados apenas com água destilada. A comparação das médias de área lesionada foi
1107 realizada pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico
1108 Sisvar (versão 5.6; Universidade Federal de Lavras)

1109

1110 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

1111

1112 **Isolamento e seleção de bactérias epifíticas antagonistas a *Colletotrichum* spp.**

1113 Obtiveram-se 224 isolados bacterianos epifíticos a partir de tecidos de mamoeiro,
1114 envolvendo folhas, frutos e sementes. Todos os isolados foram avaliados quanto à capacidade
1115 de sintetizar compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis, quitinase e inibição da
1116 germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. Setenta e quatro apresentaram ao menos um
1117 mecanismo de ação contra *Colletotrichum* spp. (Figura 1). A produção de compostos voláteis
1118 foi o destaque dentre os mecanismos de ação avaliados, em que 47 isolados apresentaram
1119 níveis de inibição do micélio do patógeno a partir de 50 %, chegando a 92 %. Seguiu-se a
1120 produção de quitinase com dezessete isolados.

1121 A produção de compostos antimicrobianos difusíveis de forma isolada, inibindo
1122 *Colletotrichum* spp., foi verificada para duas bactérias (Inserir Figura 1). Oito isolados foram

1123 eficazes na supressão da germinação de conídios do patógeno. A baixa germinação do
1124 conídios foi observada em todos os isolados avaliados.

1125 Dentre os 74 isolados positivos para o ensaio de compostos voláteis, observou-se que
1126 para 64 destes houve uma relação direta entre a porcentagem de inibição do *Colletotrichum*
1127 spp. e a inibição da germinação de conídios. Em vista disso, pode-se especular que a
1128 composição química dos compostos, produzidos pelos antagonistas, pode influenciar
1129 diretamente no poder germinativo dos conídios a inibição do fitopatógeno, e este fator pode
1130 variar de acordo com a espécie do antagonista (Inserir Figura 1).

1131 Dezenove isolados, ou seja, 8,48 % do total apresentaram mais de um mecanismo de
1132 ação, o que é desejável na seleção de antagonistas, pois amplia as chances de sucesso no
1133 biocontrole. Dentre estes, quatro exibiram três mecanismos de ação e um deles, todos os
1134 mecanismos (Inserir Figura 1).

1135

1136 **Antibiose por difusão em dupla camada**

1137 Visando averiguar a compatibilidade dos prováveis antagonistas, a fim de utilizá-los
1138 de forma combinada, procedeu-se à antibiose recíproca. Foram selecionados 14 antagonistas
1139 que apresentavam pelos menos dois mecanismos de inibição do patógeno, e quatro com
1140 apenas um mecanismo (Inserir tabela 1). Verificou-se que o isolado com 924 inibiu o maior
1141 número de isolados (Inserir tabela 2). Apesar disso, o mesmo foi selecionado para a etapa
1142 posterior do trabalho por inibir o patógeno por meio da produção de compostos voláteis e
1143 quitinase.

1144 Adicionalmente ao fato de possuírem apenas um mecanismo de inibição de
1145 *Colletotrichum* spp., os isolados 761, 787 e 803 foram incompatíveis com o isolado 901, que
1146 apresentou todos os mecanismos de ação. Esse resultado fez com que os três antagonistas não
1147 fossem selecionados para o ensaio em discos de frutos (Inserir tabela 2).

1148

1149 Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de biofilme das bactérias epífitas

1150 Todos os isolados avaliados demonstraram capacidade de adesão das células em
1151 poliestireno, exceto os isolados 628 e 801. Os isolados foram agrupados em grupos quanto ao
1152 total de biofilme. Observou-se ainda que após 48 horas de incubação, a formação de biofilme
1153 foi crescente para todos os isolados avaliados exceto para o 628. As bactérias 777, 784 e 794
1154 apresentaram a maior quantidade de células aderidas nos poços de poliestireno, e a produção
1155 do biofilme foi aumentando progressivamente.

1156 Os resultados com 72 h de incubação sugerem que ocorreu maior agregação celular,
1157 e que a produção de biofilme tende a aumentar com o esgotamento dos nutrientes do meio.
1158 Curiosamente os isolados 734, 761,801,803,883,905,906,917 e 924 após 24 horas
1159 apresentaram, redução significativa nos valores de produção do biofilme, no entanto após 48
1160 horas essa produção foi reestabelecida. O isolado 628 foi único que indicou possível
1161 desagregação do biofilme após 48 horas.

1162 Os dados obtidos resultaram na seleção das bactérias para os experimentos
1163 subsequentes, baseada na exibição de mais de um mecanismo de ação pelos agentes, somado
1164 a participação dos isolados aos três melhores grupos quanto de formação do biofilme sendo
1165 eles: 777, 784, 794, 769, 788, 905, 901, 924, 734, 916, 906 (Inserir figura 2).

1166

1167 Avaliação da redução da antracnose em discos de frutos

1168

1169 Os “Mix” bacterianos foram montados baseados nos mecanismos de ação expressados
1170 “*in vitro*” dos agentes antagônicos, além da compatibilidade entre isolados e capacidade
1171 formadora de biofilme. Foram montados cinco “Mix”, cujos isolados foram dispostos a fim de
1172 equilibrar as combinações quanto aos mecanismos de ação dos agentes, dispostos de forma

1173 afim de equilibrar os isolados quanto aos mecanismos de ação, seguindo das aplicações destes
1174 em discos de frutos nas condições supracitadas.

1175 O isolado 901 foi utilizado em todos os “Mix” por expressar todos os mecanismos de
1176 ação avaliados (Inseri tabela 3).

1177 Após sete dias da montagem do ensaio, os discos foram avaliados quanto à área
1178 lesionada. Os “Mix” 3 e 5 apresentaram maior eficiência reduzindo a doença em entre 80 % e
1179 90 %, nas concentrações 10^7 e 10^8 UFC mL⁻¹, respectivamente, quando comparado ao
1180 controle com apenas o patógeno. Os demais “Mix” foram capazes de reduzir de forma
1181 significativa a doença com exceção do “Mix” 4, quando comparados ao controle, no entanto
1182 com menor eficiência do que os “Mix” 3 e 5. O “Mix” 1, na concentração 10^8 UFC mL⁻¹,
1183 proporcionou resultados semelhantes aos “Mix” 3 e 5 (Inserir tabela 4). Pôde-se observar que
1184 além do controle do patógeno, os discos dos frutos tratados como os “Mix” 3 e 5 mantiveram-
1185 se consistentes, de forma semelhante aos discos do controle negativo, sugerindo que os “Mix”
1186 3 e 5 poderiam retardar a maturação dos frutos possivelmente pela ativação de genes
1187 relacionados ao amadurecimento.

1188

1189 **Avaliação da redução da antracnose em frutos inteiros**

1190

1191 Após sete dias de incubação a 25 °C verificou-se que os “Mix” dos antagonistas
1192 reduziram significativamente a doença. Embora não tenham diferido do tratamento com
1193 aplicação de fungicida Piraclostrobina (250 g/L), que é o método mais utilizado no controle
1194 da antracnose em mamoeiro, que exibiu controle de 97,92 % da doença, nos tratamentos cujos
1195 “Mix 3” e “Mix 5” foram utilizados, verificou-se uma eficácia de redução da doença de,
1196 respectivamente, 98,5 % e 98,77 % (Inserir figura 3).

1197 Notavelmente as combinações bacterianas aplicadas nos frutos, proporcionaram um
1198 efeito curativo nos ferimentos. Acredita-se que a capacidade de formação do biofilme, pelos
1199 agentes bacterianos, influenciou nesse processo bem como na eficácia biocontrole da
1200 antracnose.

1201 Verificou-se uma alta inibição do crescimento de *Colletotrichum* spp. por meio da
1202 ação de compostos voláteis. Uma possível explicação para supressão do crescimento fúngico
1203 por meio da produção dos compostos voláteis, se dá em decorrência da diversidade de
1204 metabolitos secundários como itaurinas, surfactina, dentre outros produzidos por agentes de
1205 biocontrole produzidos pelos agentes de biocontrole Andrade et al., (02).

1206 É válido ressaltar a importância desses compostos, uma vez que a inibição do
1207 patógeno pode ocorrer em curtas ou longas distâncias. Isolados de *Bacillus* spp. selecionados
1208 como produtores de compostos antimicrobianos voláteis foram relatados inibindo o
1209 crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros, em
1210 até 76 % *in vitro*, e 86 % do sintomas nos frutos *in vivo* Fujimoto, (20).

1211 As quitinases são enzimas hidrolíticas produzidas por agentes de biocontrole, que
1212 podem ser liberadas no processo de micoparasitismo com a finalidade de degradar polímeros
1213 de quitina, que são constituintes da parede celular de fungos fitopatogênicos Bettiol, (08);
1214 Suryanto et al., (49) relataram a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos como
1215 *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* e *Ganoderma boninense* por bactérias produtoras de
1216 quitinase.

1217 Embora as quitinases não sejam consideradas essenciais para a maioria das bactérias,
1218 sua produção lhes garante uma vantagem adaptativa, já que a quitina degradada pode ser
1219 utilizada como fonte de energia na ausência de outras fontes de carbono. Em se tratando de
1220 antagonistas a fungos fitopatogênicos, como *Colletotrichum* spp., a produção de quitinases
1221 pode desempenhar um papel de inibição, pois a parede celular é essencial para a

1222 sobrevivência dos ascomicetos, e são constituídas principalmente por quitina Howard *et*
1223 *al.*,(23).

1224 Quanto a produção de compostos antimicrobianos difusíveis, esse é um atributo
1225 vantajoso em um agente de biocontrole, pois estas substâncias que podem ser antibióticos
1226 como fengicinas e itaurinas por exemplo, ou enzimas que podem difundir-se de forma
1227 acelerada no tecido alvo, tornando dispensável o contato direto entre o fitopatógeno e o
1228 antagonista Goudjal *et al.*, (21). Kim *et al.*, (27) verificaram o controle da antracnose em até
1229 50% pelo *Bacillus subtilis* CMB32, por meio da produção de antibióticos como itaurina A,
1230 fengicina e surfactina A.

1231 A baixa germinação dos conídios foi observada em todos os isolados avaliados. A
1232 presença deste mecanismo de ação em um antagonista destaca-se, quando a ocorrência da
1233 doença está diretamente ligada à germinação dos conídios do patógeno no filoplano, como é o
1234 caso da antracnose. É sabido que *Colletotrichum* spp. geralmente infecta o hospedeiro ainda
1235 no campo, e antagonistas que apresentam tal característica podem ser utilizados no controle
1236 biológico, a fim de retardar ou até inibir o desenvolvimento do patógeno.

1237 É desejável em um antagonista que ele atue por meio de mais de um mecanismo de
1238 ação contra fitopatógenos, a fim de ampliar a eficácia do biocontrole. No presente trabalho, o
1239 número de isolados selecionados com essas características, em torno de 8 %, pode ser
1240 considerado elevado, uma vez que, na maioria das pesquisas realizadas com bactérias
1241 epifíticas, menos de 1 % tem algum efeito antagonístico CHEN *et al.*(11).

1242 Apesar dos antagonistas em teste apresentarem, na maioria das vezes, características
1243 múltiplas de inibição microbiana, foi possível obter um número considerável de possíveis
1244 combinações de isolados. Utilizar agentes de biocontrole oriundos do próprio ambiente
1245 nativo, pode ser uma alternativa eficaz no controle de doenças pós-colheita, pois além de ser

1246 uma excelente fonte de ocorrência natural de antagonistas, são bem adaptados à superfície
1247 alvo Alvindia & Natsuaki (01), Janisiewicz (25);

1248 A associação por biofilme é uma estratégia como de crescimento bacteriano em
1249 superfícies. Os resultados obtidos quanto a produção e estabelecimento do biofilme
1250 corroboram com Costerton et al., (13), quando investigaram que a formação de biofilmes
1251 maduros, pode depender de uma soma de fatores como ajustes celulares e ciclos de
1252 crescimento influenciados pela difusão de nutrientes na comunidade. O estresse nutricional
1253 parece ser o sinal ambiental determinante a transição, entre os procariotos unicelulares a
1254 associações multicelulares, deste modo acredita-se que a formação de biofilmes seja uma
1255 resposta adaptativa a sobrevivência em condições adversas Webb et al.,(53).

1256 Neste ensaio, também foram obtidos maiores valores de adesão celular no tempo de 72
1257 horas de incubação sugerindo que não houve desagregação das células do biofilme com o
1258 esgotamento de nutrientes, exceto para os isolados 734, 802, 917, 924 e 628. Diversos
1259 mecanismos favorecem a desagregação dos biofilmes, e como consequência, as células são
1260 dispersas em sentidos opostos, o que é vantajoso, pois permite a colonização de outros nichos
1261 com condições mais favoráveis de crescimento Stemberg et al.,(45).

1262 Segundo O'Toole & Kolter (35) algumas condições ambientais favoráveis ao
1263 crescimento bacteriano podem não promover a formação de biofilmes. Acredita-se que,
1264 quanto maior o crescimento da população, maior o número de células, maior a adesão e
1265 consequentemente a produção de biofilme.

1266 O meio MMS usado nesse é quimicamente definido, ou seja, todos os seus
1267 constituintes são conhecidos. A presença dos cátions divalentes de cátions de Ca^{2+} e Mg^{2+} ,
1268 podem ter elevado a formação de biofilme diretamente por meio, das interações eletrostáticas,
1269 e indiretamente por desempenhar funções celulares importantes como cofatores enzimáticos,
1270 por exemplo Fletcher et al., (18), Koerstgens et al.,(30).

1271 Em discos de frutos, a conciliação de diferentes mecanismos de ação acionados por
1272 cada uma das bactérias epifíticas Sung & Chung,(47), expressados de forma conjunta pela
1273 associação na superfície do fruto em biofilme, pode ter contribuído para a redução da
1274 antracnose. Os menores níveis de controle na concentração 10^6 UFC mL⁻¹ podem ter ocorrido
1275 em virtude da equivalência entre as populações máximas dos antagonistas e do patógeno Van
1276 Bruggen et al., (51).

1277 A interação entre os tratamentos e as concentrações utilizadas foi significativa,
1278 evidenciando que a concentração da suspensão dos antagonistas, influenciou na eficácia dos
1279 “Mix” no controle da antracnose.

1280 A utilização de diferentes microrganismos com mecanismos antagônicos distintos
1281 pode elevar as chances de sucesso do biocontrole que quando usados individualmente
1282 Raupach & Kloepper, (40). Possivelmente este efeito é obtido pela combinação de distintos
1283 mecanismos de ação acionados por cada uma das antagonistas. Sung e Chung, (47), o que
1284 pôde ser verificado com os resultados obtidos *in vivo*.

1285 Fez-se interessante o uso de agentes de biocontrole combinados devido os benefícios
1286 que podem ser exibidos como: adaptação aos estresses abióticos e bióticos, melhor
1287 desempenho na colonização do tecido alvo da planta, proteção contra agentes patogênicos,
1288 além da supressão de mecanismos envolvidos no desenvolvimento do patógeno (Raupach &
1289 Kloepper, (40) .Sung & Chung (47) e Raupach & Kloepper (40) averiguaram a eficiência da
1290 utilização de isolados combinados que exibiam distintos mecanismos de ação, como antibiose
1291 por produção de compostos antimicrobianos difusíveis e quitinase, e maior supressão de
1292 fitopatógenos quando antagonistas foram utilizados de forma combinada.

1293 Tanto o Mix 3 quanto o Mix 5 apresentaram dois isolados bacterianos como fontes de
1294 produção de compostos antimicrobianos difusíveis. Faheem et al. (15) afirmaram que agentes
1295 de biocontrole que expressem algum mecanismo de ação *in vitro* podem *in vivo* apresentar

1296 eficácia no controle doenças. Tal característica é um atributo vantajoso em um agente de
1297 biocontrole, pois estas substâncias podem difundir-se de forma acelerada no tecido alvo
1298 tornando dispensável o contato direto entre o fitopatógeno e o antagonista Goudjal et al.,(21).

1299 Quanto à produção de compostos voláteis (Covs), todos os isolados utilizados
1300 exibiram tal característica. Os Covs microbianos são variados e produzidos por distintas
1301 espécies em diferentes proporções. Esses compostos podem ser agrupados em várias classes
1302 químicas como álcoois, aldeídos, cetonas, compostos de enxofre ésteres, lactonas e terpenos
1303 Wheatley (52).

1304 Primordialmente deve-se levar em conta o ciclo de vida do patógeno e o ambiente cuja
1305 doença esteja instalada. Mediante ao exposto é passível de entendimento a sensibilidade do
1306 patógeno aos COVs produzidos pelos antagonistas (33).

1307 Geralmente um patossistema estabelecido, além dos sintomas característicos,
1308 apresenta sinais do patógeno, que são expostos ao ambiente e caracterizados como fonte de
1309 inóculo, fator este que determina uma relação superfície/volume elevada. Deste modo existe
1310 um interação via aérea eficiente entre os compostos antimicrobianos voláteis produzidos
1311 pelos antagonistas, e as estruturas do patógeno, uma vez que estes são liberados diretamente
1312 no ar, e podem ser acumulados rapidamente na membrana da célula receptora por exemplo
1313 Fries, (19); Stotzky et al., (46).

1314 Arrebola et al. (04) avaliaram e verificaram a redução significativa esporulação do
1315 *Penicilium crustosum*, quando exposto aos COVs produzidos e liberados por *Bacillus subtilis*
1316 e *Bacillus amyloliquefaciens* aplicados em forma combinada.

1317 Quanto à produção de quitinases e a eficácia das combinações selecionadas entende-se
1318 que, como a quitina é o principal componente da parede celular do patógeno, e está
1319 diretamente ligada à germinação dos conídios, provavelmente a enzima quitinase atuou como
1320 medida preventiva da doença. Sua atuação pode incluir o rompimento da parede celular, que é

1321 considerado um invólucro protetor das células fúngicas, possibilitando assim a ação dos
1322 demais compostos produzidos pelos agentes de biocontrole Hamid et al., (22).

1323 E embora a quitina seja insolúvel, conservada e de difícil degradação, por conta da sua
1324 estrutura cristalina, um grande número de bactérias possuem um arsenal enzimático capaz de
1325 degradar esse biopolímero, consumir e usá-lo como fonte energética Itoh et al., (25).

1326 Suryanto et al. (48) isolaram e caracterizaram bactérias quitinolíticas e verificaram o
1327 potencial desses isolados na inibição do crescimento de fungos patogênicos de plantas. Do
1328 mesmo, modo Kim et al. (26) em combinações bacterianas verificaram a ação quitinolítica de
1329 *Serratia plymuthica* cepa C-1, *Chromobacterium* sp. cepa C-61 e *Lysobacter enzymogenes*
1330 cepa C-3 na inibição do crescimento de *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium*
1331 spp., quanto à inibição da germinação de conídios. Os isolados dispostos nas combinações,
1332 quando testados *in vitro*, inviabilizaram a germinação dos conídios como supracitado.

1333 Os resultados obtidos no ensaio são promissores uma vez que o desenvolvimento da
1334 doença está diretamente relacionado à germinação dos conídios, e em se tratando do
1335 impedimento dessa etapa o ciclo da doença não é iniciado, e os sintomas e sinais do patógeno
1336 não são visualizados.

1337 Além dos mecanismos de ação estudados, a estratégia adicional de associação por
1338 formação de biofilme pode ter contribuído para o sucesso dos combinados antagonísticos,
1339 uma vez que todos os isolados utilizados apresentaram essa característica. As bactérias
1340 quando crescem em biofilme passam a comportar-se de forma conjunta. Chen et al. (11)
1341 confirmaram que a formação do biofilme de *Bacillus subtilis* desempenhou um papel crítico
1342 no biocontrole da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum*, correlacionando
1343 positivamente com a eficácia do controle biológico expressado pelo agente bacteriano.

1344 Os resultados desse teste deram subsídio para a seleção dos “Mix” 3 e 5 na
1345 concentração 10^8 UFC mL⁻¹, para a realização do ensaio posterior, para verificar a redução da
1346 antracnose em frutos de mamão.

1347 Vários trabalhos tem relatado o controle do patógeno com o uso de bactérias Baños-
1348 Guevara et al., (06), Shi et al.,(43,44) ; LIU et al., (32). Contudo, não se tem relatos do
1349 biofilme sendo utilizado como critério de seleção, nem tampouco no biocontrole em pós-
1350 colheita.

1351 Os biofilmes são uma amostra da natureza agregada das populações microbianas nas
1352 superfícies das plantas. A agregação espacial tem implicações significativas para interações
1353 microbianas específicas ou interespecíficas, como, antibiose, predação e competição (28).

1354 De acordo com os resultados obtidos, a capacidade de formação do biofilme por
1355 antagonistas desempenha papel importante na prevenção de doenças na pós-colheita. No
1356 entanto, isoladamente, não é suficiente para garantir o sucesso do biocontrole. Há que se
1357 levarem em conta que as bactérias avaliadas produziam compostos antimicrobianos difusíveis
1358 e voláteis, além de quitinases. Há que se confirmar a importância individual de cada
1359 característica, correlacionando com a capacidade ou não de formação de biofilme para cada
1360 isolado. Chen *et al.*,(11).

1361

1362 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1363 Um dos focos do trabalho foi verificar a influência e importância do biofilme dentre
1364 características de agentes de biocontrole da antracnose do mamoeiro. Especula-se que
1365 compostos produzidos por bactérias, como antibióticos, podem atuar de duas formas: como
1366 agente antimicrobiano e um estímulo para a formação de biofilme Chen et al.,(11).

1367 Bais et al. (05) e Chen et al. (11) verificaram que a produção de surfactina por
1368 *Bacillus subtilis* está relacionada ao antagonismo, a formação do biofilme, e a eficácia do do

1369 biocontrole de *Pseudomonas syringae* e *Ralstonia solanacearum* em arábida e tomateiro
1370 respectivamente.

1371 Em suma, verifica-se a partir dos resultados, a hipótese que a formação de
1372 biofilmes pelas cepas avaliadas aumenta a eficiência da colonização celular, bem como
1373 aumenta as concentrações locais de compostos antimicrobianos na superfície dos frutos.
1374 Supõe-se ainda que alguns dos compostos produzidos pelas bactérias possam agir como
1375 sinalizadores químicos, que por sua vez estimulem ainda mais a formação do biofilme. A
1376 comunicação química entre os agentes bacterianos e o fruto pode induzir a formação inicial
1377 do biofilme e estabelecer uma relação simbiótica entre as cepas e os frutos Chen et al.,(11).

1378 Deste modo, faz-se necessária a identificação das bactérias antagonistas a
1379 *Colletotrichum* spp. empregadas nos ensaios, caracterizar as moléculas sinalizadoras para
1380 formação do biofilme, bem como os compostos antimicrobianos produzidos. Ainda, a
1381 inocuidade desses agentes, vislumbrando a formulação de um bioproduto acessível, eficaz e
1382 não residual químico para o controle da antracnose no mamão.

1383

1384 **AGRADECIMENTOS**

1385 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
1386 (CAPES), e a Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo apoio financeiro a este trabalho.

1387

1388

1389

1390

1391

1392

1393

1394 **REFERÊNCIAS**

- 1395 **1-** Alvindia, D. G.; Natsuaki, K. T.; Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit
1396 surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection*, v. 27 p. 1200-1207,
1397 2008.
- 1398
- 1399 **2-** Andrade, J. P., de Souza, H. G., Bragança, C. A. D., Neto, A. G., de Souza, J. T., &
1400 Marbach, P. A. S. Inibição do Crescimento Micelial de *Aspergillus Niger* Por Compostos
1401 Voláteis Produzidos Por Isolados de *Burkholderia* Sp. *Ciência & Tecnologia Fatec-*
1402 *JB*, 8(esp.), 2016.
- 1403 **3-** Araujo, F. F., Menezes, D.; Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por
1404 indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa phytopathol*, v.
1405 35, n. 3, p. 169-172, 2009.
- 1406 **4-** Arrebola e Sivakumar, D. Korsten, L.; Effect of volatile compounds produced by *Bacillus*
1407 strains on postharvest decay in citrus. **Biological Control**, St Paul, In press. 2009.
- 1408 **5-** Bais, H.P., Jorge, R.F., Vivanco, M.; *Biocontrol of Bacillus subtilis* against Infection of
1409 Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and
1410 Surfactin Production. **Plant Physiol.** 134(1): 307–319, 2004.
- 1411 **6-** Baños Guevara, P.E., Zavaleta Mejía, E., Colinas León, M. T., Luna Romero, I., &
1412 Gutiérrez Alonso, J.G.; Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) ,Penz.
1413 y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos
1414 infectados. **Revista Mexicana de Fitopatología**, 22(2), 2004.
- 1415 **7-** Bautista-banões, S. Sivakumar, D., Bello-pérez, A. Villanueva-arce, R., Hernández-lópez,
1416 M.; A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the
1417 postharvest supply chain. **Postharvest Biology and Technology**, 2013.
- 1418 **8-** Bettiol, W.; **Controle biológico de doenças do filoplano**, (1991).

- 1419 9- Casarrubias-carrillo, U., Cárdenas-soriano, E., Nieto-angel, D., Gutiérrez-alonso, G.;
- 1420 Histopatologia de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum*
- 1421 *gloeosporioides* Penz. **Revista Mexicana de Patologia Plantia**, Ciudad Obregón, 20:88-93,
- 1422 2002.
- 1423 10- CEPEA Disponível em: [https://www.hfbrasil.org.br/br/mamao-cepea-volume-exportado-](https://www.hfbrasil.org.br/br/mamao-cepea-volume-exportado-em-2018-pode-ser-proximo-ao-de-2017.aspx)
- 1424 [em-2018-pode-ser-proximo-ao-de-2017.aspx](https://www.hfbrasil.org.br/br/mamao-cepea-volume-exportado-em-2018-pode-ser-proximo-ao-de-2017.aspx). Acesso em 15/06/2018
- 1425 11- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. H.; Biocontrol of
- 1426 tomato wilt disease by *B. subtilis* isolates from natural environments depends on
- 1427 conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental microbiology**, 15(3), 848-864,
- 1428 2013.
- 1429 12- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D.R.; **Critical Reviews in**
- 1430 **Microbiology**, 35:157-168, 1995.
- 1431 13- Costerton, J.W., Stewart PS, Greenberg, E.R.; Bacterial biofilms: a common cause of
- 1432 persistent infections. **Science**, 284: 1318-1322, 1999.
- 1433 14-De Capdeville, G., Wilson, C. L., Beer, S.V., Aist, J.R.; Alternative disease control agents
- 1434 induce resistance to blue mold in harvest 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathology**,
- 1435 92:900-908, 2002.
- 1436 15-Faheem, M., Raza, W., Zhong, W., Nan, Z., Shen, Q., Xu, Y.; Evaluation of the biocontrol
- 1437 potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*.
- 1438 **Biological Control**, v. 81, p. 101-110, 2015.
- 1439 16- FAO. Statistics Division, 2016. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/> E> Acesso
- 1440 em: Jul.2018.

- 1441 17- Filho, R.L., Ferro, H.M., Pinho, R.S.C.; Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*.
1442 **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, 4:12- 20, 2010.
- 1443 18- Fletcher.; Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes
1444 on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*, 170:2027-2030, 1988.
- 1445 19- Fries, N.; Efeitos de compostos orgânicos voláteis no crescimento e desenvolvimento de
1446 fungos. **Transações da British Mycological Society** , 60 (1): 1-21, 1973.
- 1447 20- Fujimoto, A.; Identificação de compostos orgânicos voláteis e antibióticos produzidos por
1448 *Bacillus* spp. envolvidos no controle da mancha preta dos citros, 2017, 74f. **Tese (Doutorado**
1449 **em Microbiologia)** - Universidade Estadual Paulista – Unesp Câmpus De Jaboticabal.
- 1450 21- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., & Zitouni, A.;
1451 Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by
1452 endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological**
1453 **research**, 169(1), 59-65, 2014.
- 1454 22- Hamid, R.; Khan, M. A.; Ahmad, M.; Ahmad, M. M.; Abdin, M. Z.; musarrat, J.; javed,
1455 S. Chitinases: An update. **J Pharm Bioallied Sci.**, v. 5, p. 21–29, 2013.
- 1456 23- Howard, M.B., Ekborg, N.A., Weiner, R.M., Hutcheson, S.W., Detection and
1457 characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **J Ind Microbiol**
1458 **Biotechnol.** 30: 627-635, 2003.
- 1459 24- Incaper. Polos de Fruticultura – Mamão. Disponível em:
1460 <<https://incaper.es.gov.br/fruticultura-mamao>> /. Acesso em: 25/06/2018.
- 1461 25- Itoh, T., Hibi, T., Fujii ,Y., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Suzuki, F., Iwasaki, Y., Kim, J.,
1462 Taketo, A., Kimotoa, H.; Cooperative Degradation of Chitin by Extracellular and Cell

- 1463 SurfaceExpressed Chitinases from Paenibacillus sp. Strain FPU-7. *Applied and*
1464 *Environmental Microbiology*, 79:482–7490, 2013.
- 1465 **26-** Janisiewicz, W.J., Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology*
1466 77:481–85,1987.
- 1467 **27-** Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H., Chi, Y.T.; Produção de lipopeptídeos biossurfactantes
1468 Iturina A, fengicina e surfactina A de Bacillus subtilis CMB32 para o controle de
1469 Colletotrichum gloeosporioides. *J Microbiol Biotechnol* , 20(1), 138-145, 2010.
- 1470 **28-** Kinkel, L.L., Newton, M.R., & Leonard, K.J.; Resource aggregation in the phyllosphere:
1471 implications for microbial dynamics across spatial scales. *Phyllosphere microbiology*. **The**
1472 **American Phytopathological Society, St. Paul**, 317-340, 2002.
- 1473 **29-** Kist, B.B., Vencato, A.C., Santos, C., Carvalho, C., Reetz, E.R., Poll, H., Beling, B.R.;
1474 Anuário brasileiro da fruticultura , Santa Cruz do Sul: **Editora Gazeta Santa Cruz**,128p,
1475 2012.
- 1476 **30-** Koerstgens, V., Flemming, H.C., Wingender, J., Borchard, W.; Influence of calcium ions
1477 on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Water**
1478 **Science Technology**, 43:49–57, 2001.
- 1479 **31-** Lasa, I., & Penadés, J.R.; Bap: a family of surface proteins involved in biofilm
1480 formation. *Research in microbiology*, 157(2), 99-107, 2006.
- 1481 **32-** Liu, F., Weir, B.S., Damm, U., Crous, P.W., Wang, Y., Liu, B., Cai, L.; Unravelling
1482 Colletotrichum species associated with Camellia: employing ApMat and GS loci to resolve
1483 species in the C. gloeosporioides complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution*
1484 **of Fungi**, 2015.

- 1485 **33-** Morath, S.U., Hung, R., Bennett, J.W.; Fungal volatile organic compounds:a review with
1486 emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, 26:73-83, 2012.
- 1487 **34-** Nery-Silva, F.A.; Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão
1488 peduncular em mamão. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 31, n. 5, p.1374-1379, 2007.
- 1489 **35-** O'toole, G.A., Kolter, R.; The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens*
1490 WSC365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis.
1491 **Molecular Microbiology**, 28:449-461, 1998.
- 1492 **36-** Osman, S.M., Sivakumar, D., Korsten, C.; Effect of biocontrol agent *Bacillus*
1493 *amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and
1494 maintenance of fruit quality. *Crop Prot.* 30:173e178, 2011.
- 1495 **37-** Parsek, M.R., Fuqua, C.; Biofilms : Emerging themes and challenges in studies of
1496 surface-associated microbial life. **J Bacteriol** 186:4427-4440, 2004.
- 1497 **38-** Pusey, P.L., Stockwell, V.O., & Mazzola, M. Epiphytic bacteria and yeasts on apple
1498 blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, 99(5):
1499 571-581, 2009.
- 1500 **39-** Rahman, M.A., Mahmud, T.M.M., Kadir, J., Abdul Rahman, R.A., Begum, M.;
1501 Enhancing the efficacy of *Burkholderia cepacia* B23 with calcium chloride and chitosan to
1502 control anthracnose of papaya during storage. **Plant Pathol. J.** 25: 361 e 368, 2009.
- 1503 **40-** Raupach, G.S., & Kloepper, J.W.; Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria
1504 enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, 88(11), 1158-
1505 1164, 1998.
- 1506 **41-** Romeiro, R.S.; Métodos em Bacteriologia de Plantas Viçosa: UFV, 279p, 2001.

- 1507 **42-** Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Chung, C., Cronan, J.E., Rinehart, K.L., Farrand, S.K.;
- 1508 Detection and characterizing N-acil-homoserine lactone signal molecules by thin-layer
- 1509 chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
- 1510 **America**, 94:6036-6041, 1997.
- 1511 **43-** Shi, J., Liu, A., Li, X., Feng, S., Chen, W.; Identification of endophytic bacterial strain
- 1512 MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested
- 1513 papaya fruit. **J. Food Sci. Agric.** 90, 227e232, 2009;
- 1514 **44-** Shi, J., Liu, A., Li, X., Feng, S., & Chen, W.; Inhibitory mechanisms induced by the
- 1515 endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. **Biological control**, 56(1):
- 1516 2-8, 2011.
- 1517 **45-** Stenberg C, Christensen BB, Johansen T, Toftgaard NA, Andersen JB, Givskov M,
- 1518 Molin S (1999) Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Applied*
- 1519 *and Environmental Microbiology*, 65:4108-4117.
- 1520 **46-** Stotzky, G., Schenck, S., e Papavizas, G.C.; Compostos orgânicos voláteis e
- 1521 microorganismos. **Revisões críticas de CRC em microbiologia** , 4 (4): 333-382, 1976.
- 1522 **47-** Sung, K. C.; Chung, Y. R. Enhanced suppression of rice sheath blight using combination
- 1523 of bacteria which produce chitinases or antibiotics. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON
- 1524 PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA, 4, Sapporo. **Proceedings...Sapporo:**
- 1525 Nakanishi Printing, 1997, p. 370-372, 1997.
- 1526 **49-** Suryanto, D., Irawati, N., Munir, E.; Isolation and Characterization of Chitinolytic
- 1527 Bacteria and Their Potential to Inhibit Plant Pathogenic Fungi. **Microbiol Indones**, 5:144-
- 1528 148, 2011.

- 1529 **50-** Valenzuela, N.L., Angel, D.N., Ortiz, D., Rosas, R.A., García; C.F.O., SANTOS, M.O .; ;
1530 Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol
1531 papaya fruit, **Biological Control**, 2015.
- 1532 **51-** Viana, F., Lima, F., Lima, J., Pieniz, V., & Gonçalves, L.; Biocontrole da antracnose pós-
1533 colheita do mamão com levedura killer. Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa
1534 e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2012.
- 1535 **52-** VAN BRUGGEN, A. H. C.; SEMENOV, A. M.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; DE VOS,
1536 O. J.; BLOK, W. J. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial
1537 populations, and soil-borne plant disease management. **European Journal of Plant**
1538 **Pathology**, v. 115, p. 105-122, 2006.
- 1539 **53-**Wheatley, R.E.; The consequences of volatile organic compound mediated
1540 bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81:357-364, 2002.
- 1541 **54-**Webb, J.S., Givskov, M. e Kjelleberg, S.; Biofilmes bacterianos: aventuras procarióticas
1542 em multicelularidade. **Opinião atual em microbiologia** , 6 (6), 578-585, 200
- 1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555

ANEXOS

1556

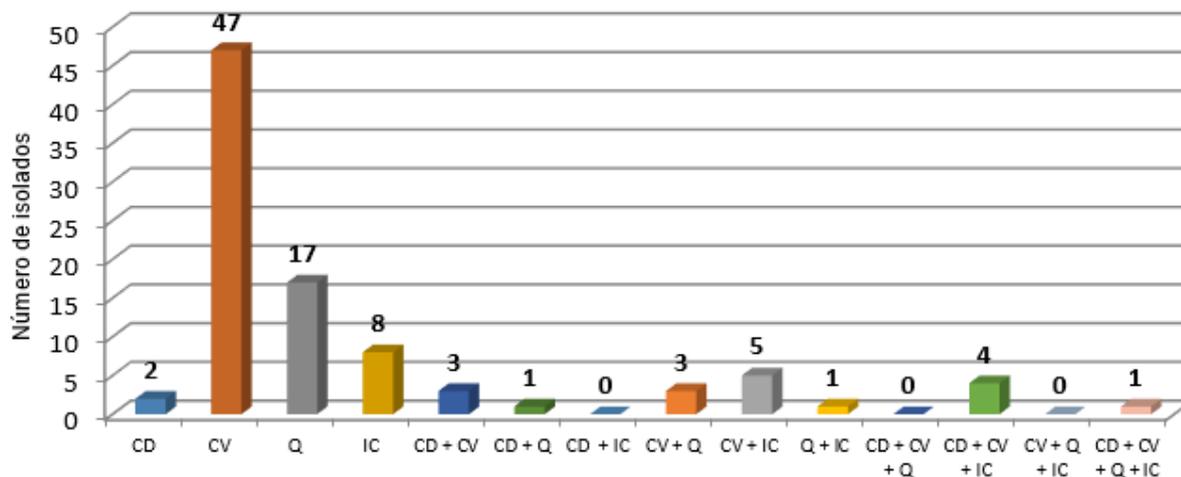
1557

1558

1559 Anexo 1- Figuras e Tabelas

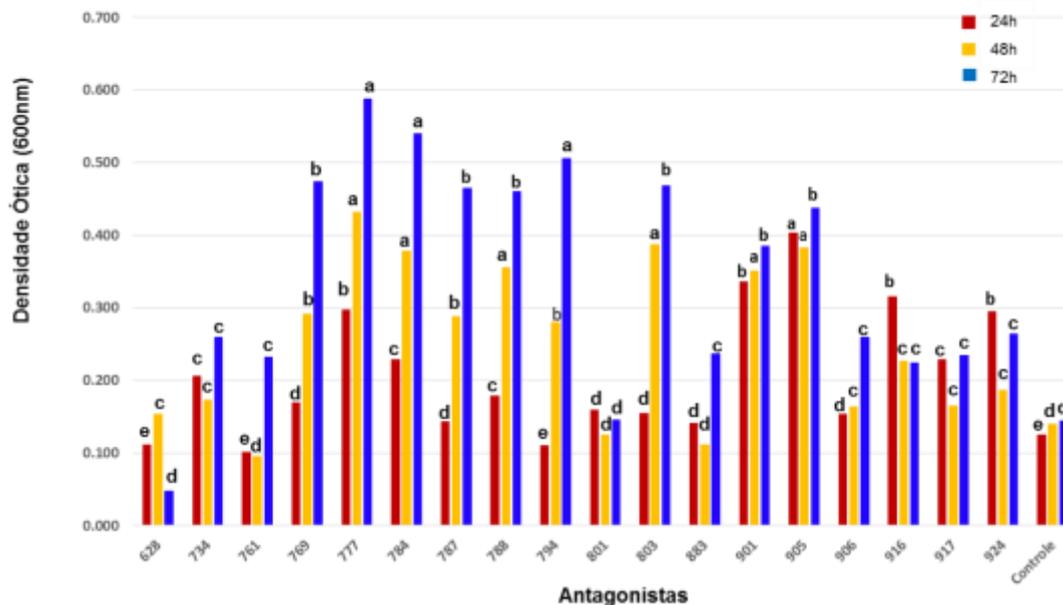
1560

1561



1562

1563 **Figura 1:** Disposição dos mecanismos de ação presentes em antagonistas bacterianos epifíticos de mamoeiro.
 1564 (CD; compostos difusíveis, CV; compostos voláteis, Q; quitinase, IC; Inibição da germinação de
 1565 conídios).
 1566



1567

1568 **Figura 2 -** Formação de biofilme bacteriano por isolados epifitas antagonistas a *Colletotrichum* spp.,

*Tratamentos seguidos da mesma letra não apresentam diferença significativa.

1569

1570

1571

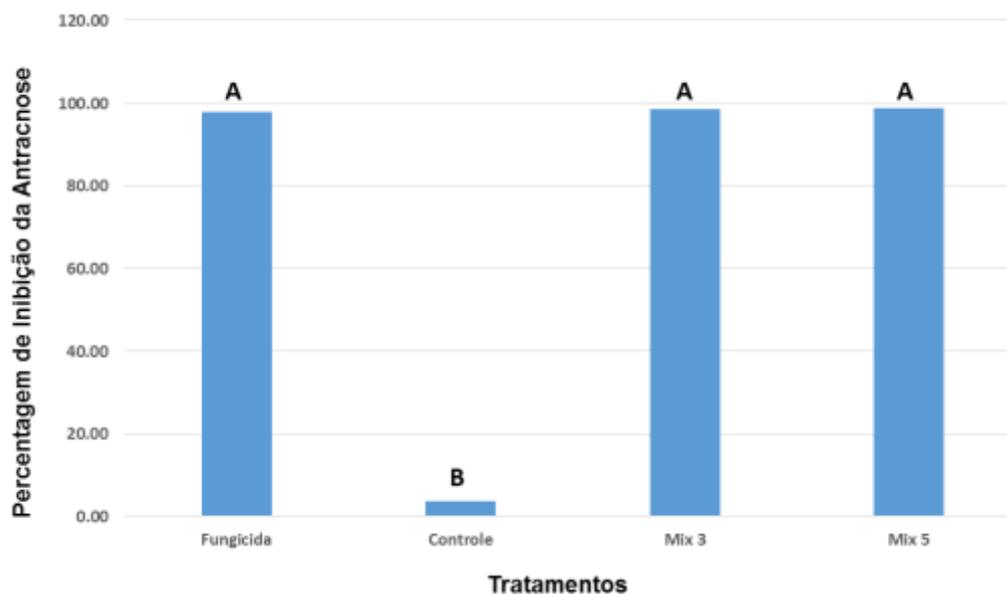


Figura 3 - Área lesionada por *Colletotrichum* spp. em frutos de mamão. Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey 5 %.

1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579

Tabela 1 - Isolados epífitas de mamoeiro, selecionados quanto à produção de compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis, quitinase e inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.

ISOLADOS	COMP. DIFUSÍVEIS	COMP. VOLÁTEIS	QUITINAS E	INIBIÇÃO DE CONÍDIOS	FRAGMENTO	LOCAL
628	-	+	-	+	Folha	Embrapa
734	+	+	-	+	Folha	Pomar caseiro
761	-	-	+	-	Folha	Pomar caseiro
769	+	+	-	+	Fruto verde	Pomar caseiro
777	-	+	+	-	Fruto verde	Pomar caseiro
784	+	+	-	+	Fruto Maduro	Ceasa Fsa*
787	+	-	-	-	Fruto Maduro	Ceasa Fsa
788	+	+	-	-	Fruto Maduro	Ceasa Fsa
794	+	+	-	+	Fruto Maduro	Ceasa Fsa
801	-	+	-	+	Fruto Maduro	Ceasa Fsa
803	+	-	-	-	Fruto Maduro	Ceasa Fsa
883	-	+	-	-	Fruto maduro	Embrapa
901	+	+	+	+	Semente	Embrapa
902	-	+	-	+	Semente	Embrapa
903	-	+	-	+	Semente	Embrapa
904	-	+	-	+	Semente	Embrapa
905	+	+	-	-	Semente	Embrapa
906	-	+	+	-	Semente	Embrapa
907	-	+	-	+	Casa	Embrapa
912	-	+	+	-	Casa	Embrapa
916	-	+	-	+	Casa	Embrapa
917	-	+	-	+	Casa	Embrapa

919	-	+	+	-	Polpa	Embrapa
924	-	+	+	-	Polpa	Embrapa

1580

1581

*Centro de abastecimento de Feira de Santana

1582

1583

1584

1585

Tabela 2 - Compatibilidade entre antagonistas a *Colletotrichum* spp.

628*	734	761	769	777	784	787	788	794	801	803	883	901	905	906	916	917	924
628	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
734	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
761	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
784	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
787	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
788	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
794	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
803	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
883	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
905	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
906	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
916	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
917	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
924	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

1586

1587

*(-) ausência de inibição; (+) inibição. Coluna à esquerda, inibidores; linha superior, inibidos.

1588

1589

1590

1591

1592

1593

Tabela 3 - Composição dos "Mix" bacterianos aplicados em discos de frutos de mamão.**TRATAMENTOS**

T1- MIX 1	901	784	777	916
T2- MIX 2	901	734	906	905
T3- MIX 3	901	794	924	916
T4- MIX 4	901	769	906	905
T5- MIX 5	901	777	916	788

1594

1595

1596

Tabela 4 - Porcentagem área lesionada por antracnose em discos de frutos de mamão tratados com bactérias epifíticas.

1597

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÕES (UFC mL ⁻¹)		
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶
MIX 1	25,22 Aa*	99,07Cb	99,30 Cb
MIX 2	93,23 Ca	87,65 Ca	99,73 Ca
MIX 3	10,88 Aa	18,56 Aa	17,80 Aa
MIX 4	64,81 Ba	61,11 Ba	64,73 Ba
MIX 5	9,22 Aa	1,92 Aa	40,00 Ab
CONTROLE	99,27 Ca*	99,25 Ca	99,76 Ca

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5 %.

1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624

1625 **Anexo 2- Normas da revista Summa Phytopathologica**

1626

1627 Escopo e política

1628

1629 Summa Phytopathologica (SP) é um periódico direcionado para publicações de
1630 trabalhos de pesquisa, originais na área de fitopatologia, publicado trimestralmente,
1631 desde 1975. Atualmente está no volume 32.

1632

1633 SP é uma publicação oficial do Grupo Paulista de Fitopatologia, (GPF) que possui
1634 cerca 500 associados de vários estados do Brasil e países da América Latina. Os
1635 trabalhos de pesquisadores não associados também são aceitos, uma vez que,
1636 respeite as normas de publicação, aspectos éticos, legislação vigente e normas da
1637 biossegurança.

1638 Forma e preparação de manuscritos

1639

1640 MODALIDADES DE PUBLICAÇÃO

1641

1642 1. Artigos científicos: trabalhos de pesquisa científica inédita e conclusiva. Grafado
1643 em português, inglês ou espanhol. Deverá ter, no máximo, vinte laudas digitadas em
1644 espaço duplo. Não deverá ultrapassar trinta referências bibliográficas. O texto
1645 deverá conter os seguintes itens:

1646

1647 Português: Resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e
1648 discussão, agradecimentos, referências bibliográficas.

1649

1650 Inglês: Abstract (in english and in portuguese), material and methods, results and
1651 discussion, acknowledgments, references.

1652

1653 Espanhol: Resumen (en español y en portugués), abstract, material y métodos,
1654 resultados y discusión, agradecimientos, referencias bibliográficas.

1655

1656 2. Revisões: texto sobre assunto específico o qual enfoca novos conceitos,
1657 hipóteses, discussões ou que promova a integração da Fitopatologia com outras
1658 ciências, atendendo, preferencialmente, a solicitação da Comissão Editorial. Deverá

1659 ter no máximo vinte laudas digitadas em espaço duplo e não ultrapassar sessenta
1660 referências. O texto deverá conter os seguintes itens:

1661
1662 Português: Resumo, abstract, texto, referências bibliográficas.

1663
1664 Inglês: Abstract (in english and in portuguese), text, references.

1665
1666 Espanhol: Resumen (en español y en portugués), abstract, texto, referências
1667 bibliográficas.

1668
1669 3. Notas científicas: trabalhos de pesquisa científica inédita, que seja recente e de
1670 interesse para uma rápida divulgação. Deverá ter no máximo seis laudas digitadas
1671 em espaço duplo, uma tabela e uma figura. Não deverá ultrapassar dez referências
1672 bibliográficas. O texto deverá conter os seguintes itens:

1673
1674 Português: Resumo, abstract, texto, agradecimentos, referências bibliográficas.

1675
1676 Inglês: Abstract (in english and in portuguese), text, acknowledgments, references.

1677
1678 Espanhol: Resumen (en español y en portugués), abstract, texto, agradecimientos,
1679 referencias bibliográficas.

1680
1681 4. Notas técnicas: técnicas novas, produtos e patentes. Deverá apresentar resumo,
1682 abstract, texto sem divisão de tópicos, referências bibliográficas. Deverá ter no
1683 máximo seis laudas digitadas em espaço duplo, uma tabela e uma figura. Não
1684 deverá ultrapassar dez referências bibliográficas.

1685
1686 Português: Resumo, abstract, texto, agradecimentos, referências bibliográficas.

1687
1688 Inglês: Abstract (in english and in portuguese), text, acknowledgments, references.

1689
1690 Espanhol: Resumen (en español y en portugués), abstract, texto, agradecimientos,
1691 referencias bibliográficas.

1692

1693 5. Comunicações: a) constatação de uma nova doença ou de novo patógeno. Caso
1694 trate da primeira detecção no país, deve constar o parecer técnico do Ministério da
1695 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, autorizando a divulgação. b) resultados dos
1696 testes de controle de doenças (químico ou biológico) desde que não efetuados " in
1697 vitro". Sem resumo, abstract ou divisão em tópicos, contendo no máximo duas
1698 laudas, digitados e uma figura ou tabela, sem citação bibliográfica.

1699
1700 6. Serviços: a) divulgação de notícias, que tenham interesse para os fitopatologistas;
1701 b) resenha de livros; c) abstracts de teses e dissertações defendidas por sócios do
1702 GPF; d) notícias dos congressos e resoluções das assembleias.

1703
1704 7. Cartas ao editor: documento encaminhado para publicação, sobre tema de
1705 relevância para apresentar sugestões ou incitar discussões. Podem ser publicadas a
1706 réplica e a tréplica.

1707
1708
1709
1710 Envio de manuscritos

1711
1712 O trabalho deve conter o nome completo dos autores, sem abreviação. Um dos
1713 mesmos deverá ser nomeado para se responsabilizar pelas correspondências e
1714 troca de informações com a Comissão Editorial (CE) e Conselho Editorial (CO), cujo
1715 nome e endereço completo da instituição constará no cabeçalho do trabalho
1716 publicado. No caso de nenhum dos autores pertencer à Associação Paulista de
1717 Fitopatologia (APF), deverá ser recolhida uma taxa correspondente a cem reais (R\$
1718 100,00), para a tramitação do manuscrito, em cheque nominal à APF.

1719
1720 Os artigos para publicação poderão ser submetidos à Comissão Editorial da Summa
1721 Phytopathologica (SP), eletronicamente, ou gravados em CD, juntamente com a
1722 impressão em quatro vias acompanhadas de uma declaração de exclusividade do
1723 trabalho à SP e a anuência de todos os autores. Após o recebimento e exame do
1724 manuscrito, pela CE, quanto a adequação do tema ao periódico, às normas
1725 propostas e inovação. Os autores serão notificados por carta sobre a aceitação ou
1726 da necessidade de readequação do texto, ou mesmo de alterações na modalidade

1727 de publicação, para nova submissão. Após o aceite para tramitação, cópias do
1728 trabalho apócrifas, serão encaminhadas a três assessores ad hoc (AH) ,
1729 especialistas da área, previamente selecionados pela Comissão Editorial (CE) e
1730 Conselho Editorial (CO). Estes AHs preencherão uma ficha de avaliação,
1731 encaminhada junto com o trabalho, aceitando ou negando a publicação e fazendo
1732 sugestões para a melhoria do texto quanto a forma, estrutura, atualização
1733 metodológica e bibliográfica. Enviando tudo para a CE e CO, em 45 dias. Após o
1734 recebimento dos três pareceres e o trabalho ter sido aceito, por pelo menos dois
1735 assessores, uma das cópias será submetida à correção do "abstract" e adequação
1736 às normas de citação bibliográfica. Após todas as correções, o autor receberá esse
1737 material e os pareceres dos assessores, também sem o nome dos mesmos,
1738 juntamente com o disquete ou CD, para conhecimento e tomada de providências na
1739 readequação do texto e novo encaminhamento. Este deverá ser feito através de
1740 duas cópias atualizadas impressas e o CD, para a Comissão Editorial (CE) e
1741 Comissão Editorial (CO), que após averiguação quanto às correções, propostas
1742 pelos assessores, e análise das justificativas dos autores, encaminharão o trabalho
1743 para a editoração e o mesmo será considerado aceito para publicação. Caso
1744 contrário o trabalho será devolvido, mais uma vez, aos autores para as devidas
1745 correções.

1746

1747 O(s) autor(es) que não tiver(em) seu texto aprovado, receberá(ão) todas as cópias
1748 de volta, juntamente com o disquete ou CD.

1749

1750 No que se refere às ilustrações no trabalho, se estas forem em preto e branco não
1751 onerarão o(s) autor(es). Porém, se forem coloridas, estes devem cobrir o custo
1752 adicional das páginas publicadas em cores, após receber o aviso da aceitação do
1753 trabalho para publicação.

1754

1755 No caso de haver conflitos de interesse, os autores devem se manifestar por carta,
1756 através do autor responsável pela correspondência, a qual será analisada pela
1757 Comissão Editorial (CE) e se necessário submetida ao Conselho Editorial (CO).

1758

1759

1760

1761 Prova tipográfica

1762

1763 Após a editoração e primeira impressão, uma cópia do trabalho será encaminhada
1764 aos autores, para a prova tipográfica, ou revisão do texto, que assinalarão as
1765 correções em tinta vermelha e devolverão em cinco dias úteis à Comissão Editorial
1766 (CE).No caso de ultrapassar este prazo, o trabalho será arquivado para ser
1767 publicado em números posteriores do periódico.

1768

1769

1770

1771 Normas da Redação

1772

1773 Todos os trabalhos deverão ser digitados em folha tamanho A4 (210 x 297 mm),
1774 espaço duplo, com margens de 3 cm, numerando-se as linhas e páginas. As letras
1775 devem seguir padrão "Times New Roman" tamanho 12.

1776

1777 Ao final do resumo e do abstract deverão conter, no idioma correspondente,
1778 palavras chaves adicionais (não mais que cinco e diferentes do título).

1779

1780 Tabelas, figuras, desenhos, fotografias e gráficos, deverão ser apresentados
1781 separadamente no final do manuscrito. O local de inserção no texto deverá conter a
1782 chamada: Inserir Figura 1; inserir Tabela 1, etc.

1783

1784 O título da tabela constará na parte superior e o da figura na parte inferior, ambos
1785 ocupando toda a largura das mesmas. As palavras Figura e Tabela, conjuntamente
1786 com o número correspondente devem ser escritas em negrito. As notações
1787 (números, letras e símbolos) constantes nas tabelas e figuras, deverão ter tamanho
1788 não inferior a 10. As figuras, na forma de gráficos, deverão ter fundo branco e com
1789 bordas.

1790

1791 Fotos e montagens fotográficas deverão ser fornecidas em papel brilhante no
1792 tamanho A4 (210 x 297 mm), em JPEG, 300 dpi.

1793

1794 As citações bibliográficas no texto deverão ser:

1795
1796 a) expressas na forma numérica. Uma vez os autores fazendo parte de contexto da
1797 frase devem ser grafados com somente as iniciais em maiúsculas, seguindo-se o
1798 número da citação entre parênteses. Exemplo: Figueiredo (6).

1799
1800 b) quando o trabalho tiver mais de dois autores citar o primeiro seguido de et al.;
1801 quando forem dois autores utilizar o & (e comercial). Exemplo: Figueiredo &
1802 Coutinho (7).

1803
1804 c) comunicação pessoal deve constar como nota de rodapé, contendo dados sobre o
1805 informante e a data (mês e ano) da informação.

1806
1807 d) quando tiver mais de uma citação, colocar no texto em ordem numérica crescente
1808 (6, 7, 18).

1809
1810 e) na numeração da citação não utilizar zero antes da unidade.

1811
1812 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1813
1814 As referências bibliográficas no fim do texto deverão ser apresentadas em ordem
1815 alfabética e numeradas, nos seguintes formatos:

1816
1817 **ARTIGO DE PERIÓDICO**

1818
1819 **FORMATO:** Autor(es). Título do artigo. Título do periódico, cidade, volume, número,
1820 paginação inicial-final, ano. Exemplos:

1821
1822 1. Costa, A.S. História da fitopatologia no Brasil. Summa Phytopathologica,
1823 Campinas, v.1, n.3, p.155-163, 1975.

1824
1825 2. Leite, R.M.V.B.C.; Amorim, L. Elaboração e validação de escala diagramática para
1826 mancha de *Alternaria* em girassol. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.28, n.1,
1827 p.14-19, 2002.

1828

1829 3. Micheref, S.J.; Mariano, R.L.R.; Padovan, I.; Menezes, M. Observações
1830 ultraestruturais das interações entre Colletotrichum graminicola e agentes
1831 biocontroladores no filopiano de sorgo. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, v.19,
1832 n.2, p.99-101, 1993.

1833

1834 ARTIGO DE PERIÓDICO EM MEIO ELETRÔNICO

1835

1836 FORMATO: Autor(es). Título do artigo. Título do periódico, cidade, volume, número,
1837 paginação inicial-final, data. Disponível em: <http: endereço eletrônico>. Acesso em:
1838 dia mês (abreviado). ano. Exemplos:

1839

1840 1. Lamari, L. Assess: Image analysis software for plant disease quantification. St.
1841 Paul: APS Press, 2002. 1CD-ROM.

1842

1843 2. São Paulo. (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações
1844 ambientais em matéria de meio ambiente. In: Entendendo o meio ambiente. São
1845 Paulo, 1999. v.1 Disponível em: <http://www.dbt.org.br/sma/entendendo/atual.htm>.
1846 Acesso em: 8 mar. 1999.

1847

1848 LIVRO

1849

1850 FORMATO: Autor(es). Título: sub-título. Edição. Local de publicação: Editora, ano de
1851 publicação. nº do volume e/ou total de páginas (nota de série). Exemplos:

1852

1853 1. Kimati, H.; Gimenes-Fernandes, N.; Soave, J.; Kurozawa, C.; Brignani Neto, F.;
1854 Bettioli, W. Guia de fungicidas agrícolas: recomendações por cultura. 2.ed.
1855 Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997. v.1, 224p.

1856

1857 2. Lucas, J.A. Plant pathology and plant pathogens. 3rd ed. Oxford: Blackwell
1858 Science, 1998. 274p.

1859

1860 CAPÍTULO DE LIVRO

1861

1862 FORMATO: Autor(es) do capítulo. Título do capítulo ou parte referenciada. In: Autor
1863 ou Editor. Título da publicação no todo. Edição. Local de publicação: Editora, ano de
1864 publicação. volume, nº do capítulo e/ou página inicial-final da parte referenciada.

1865

1866 Exemplo:

1867

1868 1. Reis, E.M.; Casa, R.T. Cereais de inverno. In: Vale, F.X.R.; Zambolim, L. Controle
1869 de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa,
1870 1997. v.1, cap.5, p.231-287.

1871

1872 LIVRO EM MEIO ELETRÔNICO

1873

1874 FORMATO: Autor(es). Título: subtítulo. Edição. Local de publicação: Editora, ano de
1875 publicação. nº do volume e/ou total de páginas. (nota de série). Número de CD-
1876 ROM.

1877

1878 Exemplo:

1879

1880 1. Lamari, L. Assess: Image analysis software for plant disease quantification. St.
1881 Paul: APS Press, 2002. 1 CD-ROM.

1882

1883 FORMATO: Autor(es). Título: subtítulo. Edição. Local de publicação: Editora, ano de
1884 publicação. nº do volume e/ou total de páginas. (nota de série). Disponível
1885 em:<endereço eletrônico>. Acesso em: dia. mês abreviado. Ano.

1886

1887 Exemplo:

1888

1889 2. São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações
1890 ambientais em matéria de meio ambiente. São Paulo, 1999. v. 1: Entendendo o meio
1891 ambiente. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/sma/entendendo/indic1>>.
1892 Acesso em: 26 abr. 2006.

1893

1894 DISSERTAÇÃO E TESE

1895

1896 FORMATO: Autor. Título. Data. Número de folhas ou volumes. Categoria da Tese
1897 (Grau e Área de Concentração) – Nome da Faculdade, Universidade, cidade.

1898 Exemplo:

1899

1900 1. Izioka, E.E.K. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de
1901 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)Penz. & Sacc., agente causal da podridão
1902 floral do citros. 1995. 138f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências
1903 - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

1904

1905 PARTE DE EVENTOS EM ANAIS

1906

1907 FORMATO: Autor(es) do trabalho. Título do trabalho. In: Nome do evento, número.,
1908 ano, cidade de realização. Título. Cidade de publicação: Editora, ano. página inicial-
1909 final do trabalho. Exemplo:

1910

1911 1. Melo, I.S. de. Controle biológico de doenças de raiz. In: Reunião sobre controle
1912 biológico de doenças de plantas, 1., 1986, Piracicaba. Anais. Campinas: Fundação
1913 Cargill, 1986. p.7-12.

1914

1915 PARTE DE EVENTOS EM MEIO ELETRÔNICO

1916

1917 FORMATO: Autor. Título do trabalho. In: Nome do evento, número do evento, ano,
1918 cidade de realização. Título. Cidade de publicação: Editora, ano. número de CDs.

1919

1920 Exemplo:

1921

1922 1. Jerba, V.F.; Rodella, R.A.; Furtado, E.L. Análise pré-infeccional do
1923 desenvolvimento de *Glomerella cingulata* na superfície foliar de cultivares de
1924 feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: Reunion Latinoamericana de Fisiologia Vegetal,
1925 11., 2002, Punta del Este. Actas. Córdoba: Ediciones del Copista, 2002. 1 CD-ROM.

1926

1927 PARTE DE EVENTO EM PERIÓDICO

1928

1929 FORMATO: Autor(es). Título do artigo. Título do periódico, cidade, volume, número,
1930 paginação inicial-final, ano. (Resumo). Exemplo:

1931
1932 1. Kitajima, E.W.; Coletta Filho, H.D.; Machado, M.A.; Novas, Q.S. Escaldadura das
1933 folhas em Hibiscos schizopetalus associada à infecção por Xylella fastidiosa em
1934 Brasília, DF. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.25, supl., p.323-323, 2000.
1935 (Resumo).

1936
1937 ABSTRACTS

1938
1939 FORMATO: Autor(es) do artigo. Título do artigo. Título do Periódico, cidade, volume,
1940 número do fascículo, página inicial-final do artigo, ano. In: Título do Abstract, cidade,
1941 volume, número, ano. (Abstract número de referência). Exemplo:

1942
1943 1. Katis, N.; Gibson, R.W. Transmission of potato virus y by cereal aphids. Potato
1944 Research, Wageningen, v.28, n.1, p.65-70, 1985. In: Review of Plant Pathology,
1945 London, v.65, n.8, p.445, 1986. (Abstract 4038).

1946
1947 DESCRITORES

1948
1949 Nos nomes científicos utilizar a nomenclatura binomial latina, com o nome genérico
1950 e específico por extenso. Acrescentar a autoridade, ou descritor, na primeira vez que
1951 for feita a citação no corpo do trabalho. Nas vezes subseqüentes em que for escrito
1952 no texto, poderá fazê-lo na forma abreviada para o gênero. Exemplo: Colletotrichum
1953 gloeosporioides (Penz.) Sacc., na primeira vez e C. gloeosporioides, nas
1954 subsequentes.

1955
1956 Os Vírus devem ser designados pelo nome das respectivas espécies (normas do
1957 ICTV) em inglês, itálico e primeira letra maiúscula para espécies reconhecidas pelo
1958 ICTV, seguido das siglas. Nas vezes subseqüentes usar apenas a sigla
1959 correspondente. Exemplo: Cucumber mosaic virus, CMV.

1960
1961 ABREVIACIONES

1962

1963 Peso molecular expresso em Daltons (Da) ou Kilo Dalton (KDa). Sistema métrico:
1964 usar L (litro), mL (mililitro), μ L (microlitro), não usar ppm (parte por milhão) e sim
1965 mg/mL, não usar ton. (toneladas) e sim megagramas.

1966

1967 Unidades de tempo: segundos (s), minutos (min) e horas (h).

1968

1969 Unidades de temperatura expressos em graus Celsius. Exemplo: 25 °C.

1970

1971 Produtos químicos: utilizar nomes técnicos (princípio ativo) com iniciais minúsculas.

1972

1973 CASOS OMISSOS

1974

1975 Orientações não previstas nestas normas serão dadas pela Comissão Editorial (CE),
1976 após ouvido o Conselho Editorial (COE) e assessores "ad-hoc"(AHs).

1977

1978

1979