

## Biocontrole da antracnose em frutos de mamoeiro por bactérias epifíticas formadoras de biofilme



OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
125**

Biocontrole da antracnose em frutos de mamoeiro  
por bactérias epifíticas formadoras de biofilme

*Laryssa Andrade da Luz Santos  
Luciano Ricardo Braga Pinheiro  
Leandro de Souza Rocha  
Carlos Augusto Dórea Bragança  
Harllen Sandro Alves Silva*

***Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Cruz das Almas, BA  
2021***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Mandioca e Fruticultura**  
Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 07  
44380-000, Cruz das Almas, Bahia  
Fone: 75 3312-8048  
Fax: 75 3312-8097  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente  
*Francisco Ferraz Laranjeira*

Secretário-Executivo  
*Maria da Conceição Pereira da Silva*

Membros  
*Ana Lúcia Borges, Áurea Fabiana Apolinário de  
Albuquerque Gerum, Cinara Fernanda Garcia  
Morales, Harllen Sandro Alves Silva, Herminio  
Souza Rocha, Jailson Lopes Cruz, José  
Eduardo Borges de Carvalho, Paulo Ernesto  
Meissner Filho, Tatiana Gôes Junghans*

Supervisão editorial  
*Francisco Ferraz Laranjeira*

Revisão de texto  
*Alessandra Angelo*

Normalização bibliográfica  
*Sônia Maria Sobral Cordeiro*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Anapaula Rosário Lopes*

Foto da capa  
*Laryssa Andrade da Luz Santos*

**1ª edição**  
Publicação digital: PDF (2021)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

---

Biocontrole da antracnose em frutos de mamoeiro por bactérias epifíticas  
formadoras de biofilme / Laryssa Andrade da Luz Santos...[et al.]. –  
Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2021.

30 p.: il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e  
Fruticultura, ISSN 1809-5003, 125)

1. Doença de planta 2. Mamão I. Santos, Laryssa Andrade da. II.  
Pinheiro, Luciano Ricardo Braga. III. Rocha, Leandro de Souza. IV.  
Bragança, Carlos Augusto Dórea. V. Silva, Harllen Sandro Alves. VI.  
Titulo VII. Série

CDD 632

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	7
Introdução.....	8
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão .....	14
Conclusão.....	28
Referências .....	28

# Biocontrole da antracnose em frutos de mamoeiro por bactérias epifíticas formadoras de biofilme

Laryssa Andrade da Luz Santos<sup>1</sup>

Luciano Ricardo Braga Pinheiro<sup>2</sup>

Leandro de Souza Rocha<sup>3</sup>

Carlos Augusto Dórea Bragança<sup>4</sup>

Harllen Sandro Alves Silva<sup>5</sup>

**Resumo** – A antracnose é uma das principais patologias pós-colheita do mamão. O manejo da doença é baseado no emprego de fungicidas sintéticos, e os riscos associados a este método motivaram a busca por uma estratégia de manejo que reduza ou substitua sua aplicação. Assim, o objetivo desse estudo foi selecionar bactérias epifíticas de mamoeiro antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* e avaliar a redução da severidade da doença em frutos de mamão. Entre 224 isolados de bactérias, 74 exibiram pelo menos um mecanismo de ação contra o patógeno, 13 isolados apresentaram dois mecanismos, quatro apresentaram três, e um isolado bacteriano exibiu todos, sendo eles: produção de compostos antimicrobianos voláteis e difusíveis, inibição da germinação de conídios do patógeno e produção de quitinase. Mediante a verificação da compatibilidade entre antagonistas, e a quantificação da formação de biofilme bacteriano, estabeleceram-se cinco “Mix” compostos por quatro isolados bacterianos. Em discos de frutos as bactérias foram avaliadas nas concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. À exceção do Mix 2, os demais reduziram significativamente a antracnose nos discos quando comparados ao controle. Os “Mix” 1, 3, 5, na concentração  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, reduziram a doença em até 75%, 89,78% e 90,8%, respectivamente. Os Mix 3 e 5, na concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, foram avaliados em frutos juntamente com o fungicida sintético Piraclostrobina.

---

<sup>1</sup> Engenheira-agrônoma, mestre em Microbiologia Agrícola, doutoranda da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA.

<sup>2</sup> Biólogo, mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

<sup>3</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

<sup>4</sup> Engenheiro-agrônomo, Professor da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA.

<sup>5</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Não se verificou diferença significativa entre os Mix e o fungicida, que atingiu níveis de redução da doença superiores a 97%, e as combinações com 98%, frente ao controle não tratado. O desenvolvimento de uma formulação com base em ambos os combinados avaliados poderia subsidiar a redução da aplicação do fungicida, ou ainda o substituir, no manejo da antracnose em frutos de mamão em pós-colheita.

**Palavras-chave:** *Carica papaya*. Controle biológico. *Colletotrichum brevisporum*.

## Biological control of anthracnosis in papaya fruits by Biofilm-forming epiphytic bacteria

**Abstract** – Anthracnose is one of the main postharvest pathologies in papaya fruits. Disease management is based on use of synthetic fungicides, and the risks associated with that method have motivated the search for a management strategy that reduces or replaces its application. Aiming to obtain biocontrol agents to control post-harvest anthracnose in papaya fruits, we searched for reduce the severity of postharvest anthracnose in papaya fruits by applying papaya epiphytic bacteria antagonistic to *Colletotrichum brevisporum*. Investigating 224 bacteria, 74 exhibited one mechanism of action against the pathogen, 13 strains had two mechanisms, four exhibited three, and one bacterium had all of them, which were: production of diffusible and volatile antimicrobial compounds, inhibition of conidial germination and chitinase synthesis. Through the verification of compatibility between antagonists, and biofilm quantification, five “Mix” were established, composed of four qualified bacteria. In fruit discs, bacteria were evaluated at concentrations  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. Excepting Mix 2, the others significantly reduced anthracnose in fruit discs compared to the control. Mix 1, 3, 5, at concentration  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> provide best performance, reducing disease severity by up to 75.0%, 89.78% and 90.8%, respectively. Mix 3 and 5, at concentration  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, and synthetic fungicide Pyraclostrobin were evaluated in fruits. There was no significant difference between the Mix and the fungicide, which reached levels of disease reduction greater than 97%, and the antagonist combinations 98% when compared to untreated control. The development of a formulation based on both evaluated combinations could subsidize the reduction of the fungicide application, or even replace it, in the management of anthracnose in papaya fruits in postharvest.

**Keywords:** *Carica papaya*. Biocontrol. *Colletotrichum brevisporum*.

## Introdução

O mamão é um fruto altamente perecível e suscetível a patologias pré e pós-colheita, incluindo as doenças e as podridões. Entre as doenças destacam-se mosaico, meleira, varíola e gomose, e entre as podridões, a antracnose se destaca por limitar a vida útil dos frutos. Ainda que os frutos não apresentem sintomas quando colhidos, a doença se manifesta na fase de embalagem, durante o armazenamento e o transporte, tornando os frutos imprestáveis para a comercialização (Figura 1).



Fotos: Laryssa Andrade da Luz Santos

**Figura 1.** Frutos de mamão com sintomas de antracnose (setas).

Na maioria das vezes, a doença é associada ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, como agente causal. No entanto, este gênero apresenta um complexo de espécies associadas à antracnose, que são morfológicamente semelhantes, mas geneticamente distintas, as quais provocam o mesmo quadro sintomatológico (LIU et al., 2015). A espécie *Colletotrichum brevisporum* é um exemplo.

No Brasil, apesar de haver a exportação de frutos de mamão, ainda persiste um desafio a ser superado no setor, pois menos de 10% do que é produzido é comercializado para outros países (INCAPER, 2018). Um dos principais entraves à expansão da comercialização internacional dos frutos são as barreiras impostas pelos importadores, tanto no sentido da presença de patógenos quanto de resíduos de defensivos químicos.

O manejo pós-colheita de doenças em mamão é baseado principalmente na utilização de fungicidas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013), o que gera riscos à saúde humana e ao meio ambiente, principalmente em caso de uso

indiscriminado. Somado ainda à perda de eficiência de alguns produtos, em razão do surgimento de populações resistentes, a cadeia produtora, fortemente estimulada pelo mercado consumidor, tem demandado a busca de outros métodos de controle de doenças.

O controle biológico é uma dessas estratégias e visa substituir e/ou minimizar o uso de defensivos. Dentre os agentes de biocontrole de doenças pós-colheita em mamão (SHI et al., 2011) e outras culturas, as leveduras (LIMA et al., 2012), os fungos (VALENZUELA et al., 2015) e as bactérias (OSMAN; SIVAKUMAR; KORSTEN, 2011) têm resultados promissores.

Bactérias associam-se às superfícies pela formação de biofilmes, que é definido como uma matriz de população microbiana aderente entre si e/ou às superfícies e interfaces (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1995). O biofilme pode atuar como barreira de natureza física, química e/ou biológica à colonização de fitopatógenos. Assim, isolados bacterianos que apresentam alta capacidade de formação de biofilme, associado a outros mecanismos de biocontrole, na superfície de um fruto de mamão, poderiam contribuir eficazmente para o controle de doenças pós-colheita. Assim, a capacidade de formação do biofilme pode ser uma característica a ser considerada na seleção de antagonistas bacterianos, uma vez que poderia influenciar o sucesso do biocontrole.

Com o trabalho, buscou-se selecionar bactérias epifíticas de mamoeiro antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* e avaliar a redução da severidade da doença em frutos de mamão.

## Material e Métodos

---

### **Seleção de bactérias antagonistas a *Colletotrichum brevisporum***

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram avaliados quanto ao antagonismo contra o fungo *Colletotrichum brevisporum*, 224 isolados bacterianos provenientes da superfície de folhas, pecíolos e frutos de mamoeiros sem histórico de doenças, preservados a -80 °C. O fungo supracitado pertence à micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura e foi inoculado tanto em discos quanto em frutos.

A seleção inicial dos isolados ocorreu *in vitro* e baseou-se na capacidade de inibição do crescimento micelial de *C. brevisporum* pelas bactérias antagonistas por meio da produção de compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis, síntese de quitinase e capacidade de inibição da germinação de conídios do patógeno.

## **Produção de compostos antimicrobianos difusíveis**

Discos de micélio de *C. brevisporum* com 5 mm de diâmetro, e com sete dias de crescimento em meio batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o mesmo meio. Foram depositadas 10 µL de suspensão de células das bactérias em quatro posições equidistantes na superfície do meio. As placas foram incubadas a 28 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. A presença de um halo de inibição entre o isolado e o patógeno caracterizou o antagonismo, permitindo sua seleção.

## **Produção de compostos antimicrobianos voláteis**

Empregou-se o método das placas sobrepostas conforme ROMEIRO (2007). Em cada placa contendo meio Nutriente Agar (NA), foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana, para cada isolado, de forma a produzir uma camada de células na superfície do meio. Após incubação por 24 horas a 28 ± 1 °C depositou-se um disco do micélio do patógeno com 5 mm de diâmetro sobre meio BDA em outra placa. As tampas foram removidas e as duas placas unidas, seladas com filme de PVC e incubadas a 28 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias, até que o micélio do controle atingisse o crescimento máximo em toda placa. Após, as placas foram fotografadas, e o crescimento micelial radial do patógeno foi mensurado com o software Assess 2.0 (Image analysis software for plant disease quantification). Placas contendo apenas o patógeno foram utilizadas como controle. Foram selecionados os isolados bacterianos que inibiram o crescimento do fungo acima de 50%, em comparação ao controle. O experimento foi conduzido em triplicata, cujas médias da inibição foram utilizadas para selecionar os isolados.

## Produção de quitinase

Para a seleção de isolados produtores de quitinase, a metodologia descrita por Renwick et al. (1991) foi utilizada. Os isolados foram multiplicados em meio caldo nutritivo por 24 horas a  $28 \pm 1$  °C. Alíquotas de 5  $\mu$ L da suspensão de células bacterianas foram semeadas pontualmente em meio sólido de sais minerais descrito por Tuite (1969), suplementado com quitina coloidal, como única fonte de carbono e, adicionalmente, 10 mL do corante fluorescente “Calcofluor White M2R” (1 g/L; Sigma-Aldrich®). Os isolados foram dispostos em 10 pontos distintos da superfície do meio seguindo-se incubação a  $28 \pm 1$  °C por 10 dias. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento. Decorrido este intervalo, foi verificada a produção de quitinase por meio da observação de um halo transparente ao redor da colônia, contrastando com o restante do meio em coloração azul. A presença do halo foi o fator de seleção do isolado bacteriano.

## Inibição de germinação de conídios

Todos os isolados bacterianos foram testados quanto à capacidade de inibirem a germinação de conídios de *C. brevisporum* em lâminas de microscopia. As lâminas foram preparadas adicionando-se 15  $\mu$ L da suspensão das bactérias ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e o mesmo volume de suspensão de conídios ( $10^6$  con mL<sup>-1</sup>), e mantidas a  $28 \pm 1$  °C com 100% de umidade relativa, e avaliadas após um período de 48 horas. Quantificou-se a porcentagem de conídios germinados em três lâminas por antagonista testado, contando-se os conídios em cinco campos. Foram considerados germinados os conídios cujos tubos germinativos apresentaram 50% do tamanho do conídio. O controle foi composto apenas pela suspensão dos conídios em água destilada. Foram selecionados os isolados que, em média, inibiram a germinação de no mínimo 80% dos conídios.

## Antibiose entre antagonistas

Vislumbrando o emprego dos antagonistas em combinações de isolados, foi realizado um ensaio de compatibilidade entre 18 isolados identificados pelos códigos LMS189, LMS214, LMS249, LMS257, LMS343, LMS347, LMS353, LMS360, LMS381, LMS385, LMS386, LMS396, LMS397 e LMS404. Estes foram selecionados por apresentarem pelo menos dois mecanismos de ação contra

*C. brevisporum*, à exceção dos isolados LMS241, LMS346, LMS260 e LMS363, que exibiram apenas um mecanismo de ação, entretanto, se destacaram por inibição de até 95% do crescimento in vitro do patógeno. Empregou-se o teste da dupla camada (ROMEIRO, 2007). A presença de halos caracterizou a incompatibilidade entre os isolados bacterianos, restringindo as combinações.

## Quantificação da formação de biofilme

Os 18 isolados utilizados no teste anterior foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno, de acordo com Conway, Venu e Speert (2002). As quantificações foram realizadas após 24/48/72 horas de incubação. O ensaio foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por isolado, e as médias comparadas pelo teste Skott-Knott (5%). As leituras das densidades ópticas obtidas foram relacionadas à adesão das células bacterianas ao poliestireno e, conseqüentemente, maior capacidade de formação de biofilme.

## Avaliação da redução da antracnose em discos de frutos

Quantificou-se a redução da antracnose em discos de frutos mamoeiro tratados com agentes bacterianos. Foram estabelecidas cinco combinações de isolados, a partir de 11 antagonistas selecionados nos ensaios anteriores. Às combinações deu-se a denominação de “Mix”. Cada Mix foi composto por quatro isolados, de forma a equilibrar os mecanismos de biocontrole, considerando ainda os antagonistas que apresentavam ao menos dois mecanismos de ação, compatibilidade para uso combinado e destacada quantificação de biofilme (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição dos “Mix” bacterianos aplicados em discos de frutos de mamão para controle da antracnose.

Mix 1	LMS381	LMS343	LMS257	LMS396
Mix 2	LMS381	LMS214	LMS386	LMS385
Mix 3	LMS381	LMS353	LMS404	LMS396
Mix 4	LMS381	LMS249	LMS386	LMS385
Mix 5	LMS381	LMS257	LMS396	LMS347

Foram utilizados frutos do grupo Formosa, variedade 'Tainung 01', sadios e colhidos em estágio de maturação comercial 1 (até 15% da casca amarela), que foram limpos em água corrente, imersos em álcool a 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio a 2%, por cinco minutos, lavados com água esterilizada, e secos ao ar. Discos de frutos de 2 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura foram retirados e colocados sobre papel de filtro umedecido, em caixas tipo "gerbox". Sobre os discos, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana nas concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , e o mesmo volume de uma suspensão de conídios a  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , concomitantemente. Após a inoculação, as caixas foram mantidas em incubadora a  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias.

Os discos foram fotografados, e a área lesionada foi mensurada por meio do software Assess 2.0 (Image analysis software for plant disease quantification). O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $5 \times 3$ , no qual foram cinco tratamentos, avaliados nas três concentrações diferentes, com cinco repetições por tratamento, cinco discos por repetição. O controle positivo foi composto por discos de frutos inoculados apenas com o patógeno, e o negativo, tratados com água destilada esterilizada. A comparação das médias de área lesionada foi realizada pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico Sisvar (versão 5.6).

## **Avaliação da redução da antracnose em frutos**

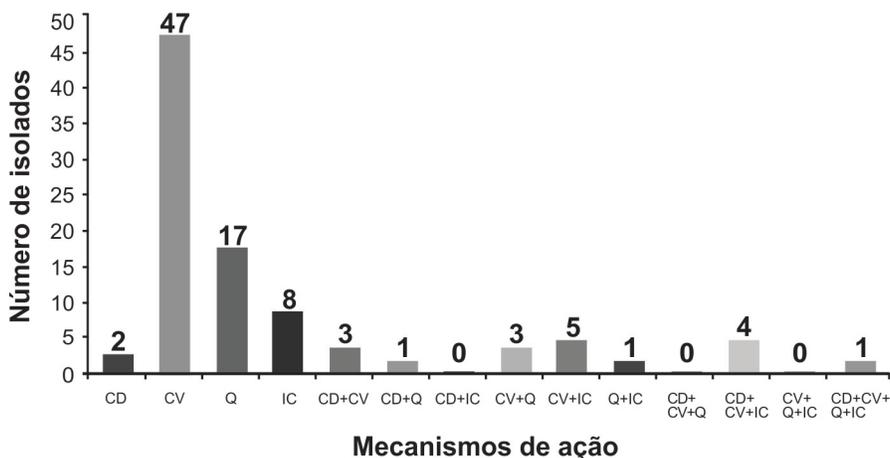
Empregaram-se frutos do grupo Formosa, variedade 'Tainung 01', sem incidência da antracnose, provenientes de cultivo em sistema orgânico de produção. Após serem lavados em água corrente, foram imersos em álcool a 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio a 2%, por três minutos, lavados com água destilada, e secos ao ar. Em seguida foram pulverizados com suspensão aquosa dos isolados antagonistas, na concentração ótima, obtida no ensaio anterior ( $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) até o ponto de escorrimento. Para fins de comparação com o controle químico da antracnose, o fungicida Piraclostrobina (250 g/L) foi empregado como tratamento. A seguir, procedeu-se à inoculação por pulverização de uma suspensão de conídios de *C. brevisporum* ( $10^6$  con  $\text{mL}^{-1}$ ). Após a inoculação, os frutos sofreram uma injúria longitudinal de 3 cm de comprimento em sua casca e foram acondicionados em caixas plásticas de

10 L, sobre papel de filtro umedecido, permanecendo a temperatura ambiente por sete dias. Decorrido este intervalo, a área lesionada foi mensurada nos frutos, por meio da análise de imagens, utilizando o software Assess 2.0. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, cada repetição composta por dois frutos. O controle positivo foi composto por frutos inoculados apenas com o patógeno, e o negativo por frutos tratados apenas com água destilada. A comparação das médias de área lesionada foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico Sisvar (versão 5.6). O ensaio foi repetido duas vezes.

## Resultados e Discussão

### Seleção de bactérias epifíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum*

Dentre as 224 bactérias epifíticas isoladas de tecidos de mamoeiro, 92 antagonistas foram selecionados, sendo que 76 deles apresentaram pelo menos um mecanismo de ação efetivo contra o patógeno no ensaio in vitro (Figura 2).



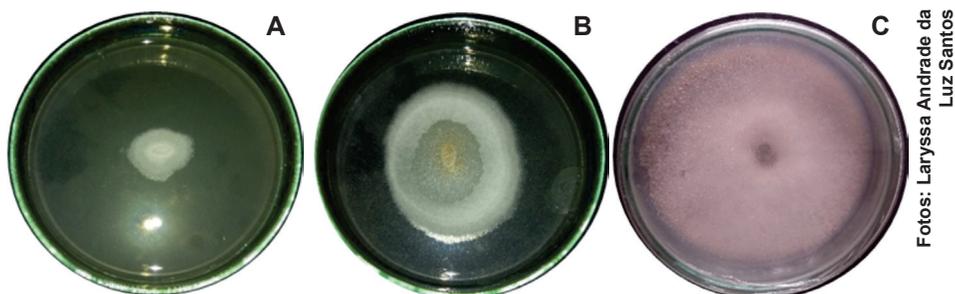
**Figura 2.** Mecanismos de ação presentes em antagonistas bacterianos epifíticos de mamoeiro. (CD – compostos difusíveis, CV – compostos voláteis, Q – quitinase, IC – Inibição da germinação de conídios).

A produção de compostos voláteis destacou-se dentre os mecanismos de biocontrole avaliados, pois 47 isolados apresentaram níveis de inibição do micélio do patógeno a partir de 50%, chegando a 92%. O segundo mecanismo mais presente entre os isolados foi a produção de quitinase, com 17 isolados.

A produção de compostos antimicrobianos difusíveis de forma isolada, inibindo o crescimento de *C. brevisporum*, foi constatada para dois isolados (Figura 2). Oito bactérias foram eficazes na supressão da germinação de conídios do patógeno, com valores acima de 80%. Porém, há que se destacar que uma baixa germinação do conídios foi observada em todos os isolados avaliados. Quais são os gêneros ou espécies dessas bactérias mais promissoras?

Dezoito isolados, ou seja, 8% do total avaliado apresentaram mais de um mecanismo de ação, o que é desejável na seleção de antagonistas, já que amplia as chances de sucesso no biocontrole. Dentre estes, quatro exibiram três mecanismos de ação e um deles, todos os mecanismos (Figura 2).

Verificou-se uma alta inibição *in vitro* do crescimento de *C. brevisporum* por meio da ação de compostos voláteis (Figura 3). A produção destes compostos foi constatada em 68,5% dos isolados selecionados. Uma possível explicação para supressão do crescimento fúngico por meio da produção dos compostos voláteis, se dá em decorrência da diversidade de metabolitos secundários como itaurinas, surfactina, dentre outros comumente produzidos por agentes de biocontrole (ANDRADE et al., 2016).

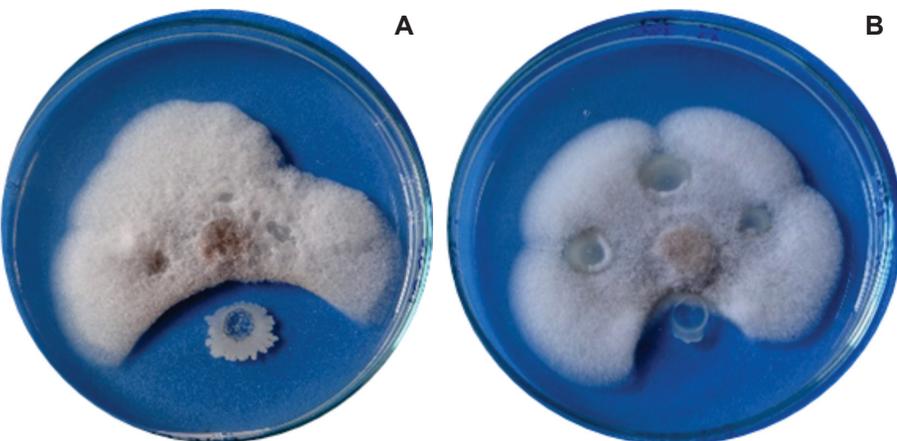


**Figura 3.** Inibição do crescimento de *Colletotrichum brevisporum* pela produção de compostos voláteis por bactérias epifíticas de mamoeiro. A, B: *C. brevisporum* inibido; C: controle.

Isolados de *Bacillus* spp. selecionados como produtores de compostos antimicrobianos voláteis foram relatados inibindo o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros, em até 76% in vitro e redução de 86% dos sintomas nos frutos in vivo (FUJIMOTO; KUPPER, 2016). Em outro estudo, Zheng et al. (2013) constataram que compostos voláteis de *B. pumilus* e *B. thuringiensis* reduziram as infecções por antracnose em mangas em 88,5%. É válido ressaltar a importância desses compostos, uma vez que a inibição do patógeno pode ocorrer em curtas ou longas distâncias, ou seja, com o antagonista presente ou ausente do sítio de infecção.

Quanto à produção de compostos antimicrobianos difusíveis (Figura 4), esse é um atributo vantajoso em um agente de biocontrole, pois estas substâncias que podem ser antibióticos como fengicinas e itaurinas, por exemplo, ou enzimas que podem difundir-se de forma acelerada no tecido-alvo, tornando dispensável o contato direto entre o fitopatógeno e o antagonista (GOUDJAL et al., 2014). Kim et al. (2010) verificaram o controle da antracnose em até 50% por *Bacillus subtilis* CMB32, por meio da produção de antibióticos como itaurina A, fengicina e surfactina A.

Fotos: Laryssa Andrade da Luz Santos



**Figura 4.** Seleção in vitro de bactérias inibidoras do crescimento de *Colletotrichum brevisporum* pela produção de compostos antimicrobianos difusíveis.

Embora as quitinases não sejam consideradas essenciais para a maioria das bactérias, sua produção lhes garante uma vantagem adaptativa, já que a quitina degradada pode ser utilizada como fonte de energia na ausência de outras fontes de carbono. Em se tratando de antagonistas a fungos fitopatogênicos, como *Colletotrichum* spp., a produção de quitinases pode desempenhar um papel de inibição, pois a parede celular é essencial para a sobrevivência fúngica, e são constituídas principalmente por quitina (HOWARD et al., 2003).

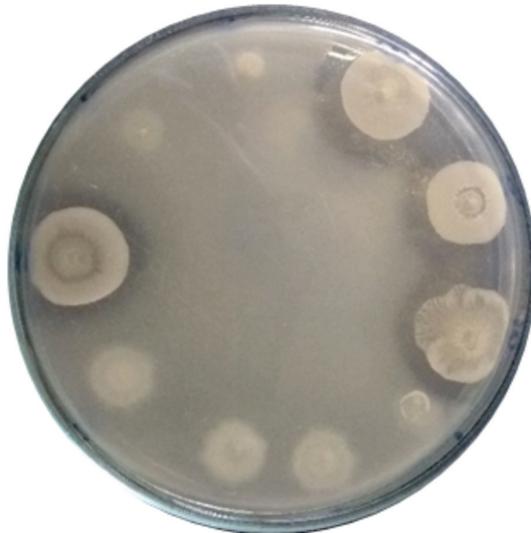
A baixa germinação de conídios do patógeno foi observada para todos os isolados avaliados. A presença desse mecanismo de ação em um antagonista destaca-se quando a ocorrência da doença está diretamente ligada à germinação dos conídios do patógeno no filoplano, como é o caso da antracnose. *Colletotrichum*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

Inicialmente 74 antagonistas foram selecionados pela produção de compostos antimicrobianos voláteis, entretanto, 27 desses isolados inibiram o crescimento fúngico frente ao controle, porém abaixo do nível mínimo estabelecido para a seleção. Dentre estes 74 isolados, ao todo, observou-se que para 64 produtores de voláteis houve uma relação direta com a porcentagem de inibição da germinação de conídios do *C. brevisporum* (dados não mostrados). Arrebola, Sivakumar e Korsten (2010), por meio de observações microscópicas de *Penicillium crustosum*, expostos a compostos voláteis de *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, observaram anormalidades morfológicas nos conídios do fungo, como a dilatação de hifas. Embora tal estudo não tenha sido realizado nesse trabalho, aventa-se a possibilidade do fato descrito ter ocorrido para explicar o resultado obtido.

## **Antibiose entre antagonistas**

Visando averiguar a compatibilidade dos antagonistas (Figura 5), a fim de utilizá-los de forma combinada, avaliaram-se 14 antagonistas que apresentavam pelos menos dois mecanismos de inibição do patógeno, e quatro com apenas um mecanismo (Tabela 2).

Foto: Larissa Andrade da Luz Santos



**Figura 5.** Ensaio de compatibilidade entre antagonistas selecionados.

Verificou-se que o isolado LMS404 inibiu as bactérias LMS343, LMS249, LMS214, que apresentaram três mecanismos de ação, e ainda a LMS381, com quatro (Tabela 3). Apesar disso, este foi selecionado para a etapa posterior do trabalho por inibir o patógeno por meio da produção de compostos voláteis e quitinase.

Adicionalmente ao fato de portarem apenas um mecanismo de inibição a *C. brevisporum*, os isolados LMS241, LMS346 e LMS260 foram incompatíveis com o isolado LMS381, que apresentou todos os mecanismos de ação (Tabela 3). Esse resultado fez com que os três antagonistas fossem excluídos do ensaio em discos de frutos.

**Tabela 2.** Bactérias epifíticas de mamoeiro, selecionados quanto à produção de compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis, quitinase e inibição da germinação de conídios de *Colletotricum brevisporum*.

Isolados	Compostos Difusíveis	Compostos Voláteis	Quitinase	Inibição de Conídios
LMS189	-	+	-	+
LMS214	+	+	-	+

continua...

**Tabela 2.** Continuação.

Isolados	Compostos Difusíveis	Compostos Voláteis	Quitinase	Inibição de Conídios
LMS241	-	-	+	-
LMS249	+	+	-	+
LMS257	-	+	+	-
LMS343	+	+	-	+
LMS346	+	-	-	-
LMS347	+	+	-	-
LMS353	+	+	-	+
LMS360	-	+	-	+
LMS260	+	-	-	-
LMS363	-	+	-	-
LMS381	+	+	+	+
LMS385	+	+	-	-
LMS386	-	+	+	-
LMS396	-	+	-	+
LMS397	-	+	-	+
LMS404	-	+	+	-

(+) Positivo para o mecanismo avaliado; (-) Negativo para o mecanismo avaliado.

É desejável em um microrganismo antagonista presente mais de um mecanismo contra fitopatógenos (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009). Porém, obter um isolado com tais características não é tarefa fácil, o que faz com o emprego de isolados combinados seja uma alternativa lógica e factível. Apesar dos antagonistas em teste apresentarem, na maioria das vezes, características múltiplas de inibição microbiana, o que gerou incompatibilidade entre eles, em alguns casos, foi possível obter um número considerável de combinações de isolados.

**Tabela 3.** Compatibilidade entre bactérias selecionadas como antagonistas a *Colletotrichum brevisporum*.

	1 8 9 *	2 1 4	2 4 1	2 4 9	2 5 7	3 4 3	3 4 6	3 4 7	3 5 3	3 6 0	2 6 0	3 6 3	3 8 1	3 8 5	3 8 6	3 9 6	3 9 7	4 0 4
1 8 9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 1 4	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 4 1	-	-		-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2 4 9	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2 5 7	-	-	-	-		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3 4 3	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 4 6	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
3 4 7	-	-	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 5 3	-	-	-	-	-	+	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	-
3 6 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
2 6 0	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-		+	-	-	-	-	-	-
3 6 3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-
3 8 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	+
3 8 5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	-	-	-
3 8 6	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
3 9 6	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-		-	-
3 9 7	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+		+
4 0 4	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	

\*(-) ausência de inibição; (+) inibição. Coluna à esquerda, inibidores; linha superior, inibidos. Todos os códigos numéricos são precedidos de "LMS".

Conhecer e explorar a diversidade de mecanismos inerentes a um ou a um grupo de agentes de biocontrole aumentará a eficácia de sua atuação, na redução de uma fitomoléstia (ALVINDIA; NATSUAKI, 2009). A ampliação do espectro da atividade microbiana resultando no controle de várias doenças, a formação de uma comunidade antagonística mais estável que possa excluir outros microrganismos, incluindo os patógenos, e o aumento da eficiência do biocontrole são algumas das características elencáveis quando se aplicam antagonistas combinados (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009).

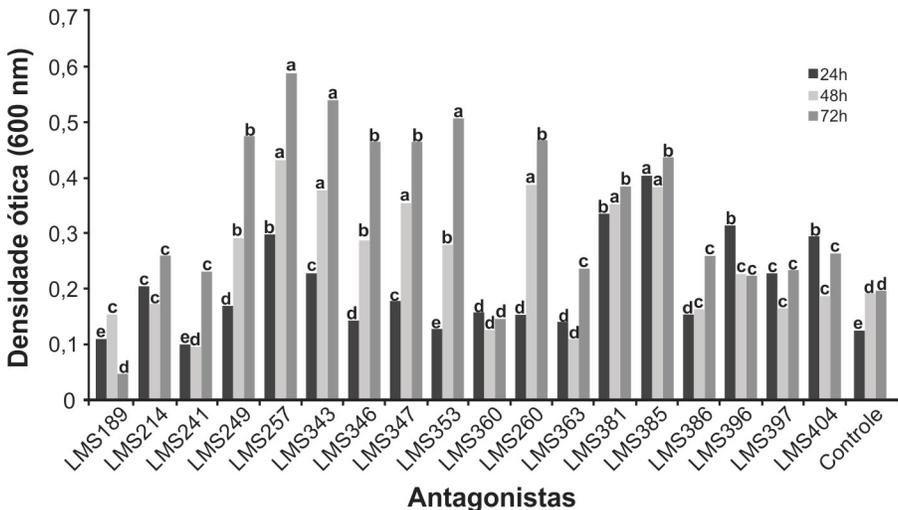
Outro ponto a ser discutido trata da origem dos isolados, todos obtidos de plantas de mamoeiro, sem histórico da aplicação de defensivos e sem sintomas de antracnose. Utilizar agentes de biocontrole oriundos do próprio ambiente nativo pode ser uma escolha acertada no controle de doenças pós-colheita, pois além de ser uma excelente fonte de ocorrência natural de antagonistas, são bem adaptados à superfície-alvo. As vantagens do emprego de antagonistas nativos, isolados do mesmo hábitat em que são eficazes para o biocontrole, já foram levantadas por Alvindia e Natsuaki (2008).

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

Todos os isolados avaliados demonstraram capacidade de adesão das células em poliestireno. Após 48 horas de incubação, a formação de biofilme foi crescente para todos os antagonistas avaliados, exceto para LMS189, LMS 360 e LMS 396. As bactérias LMS257, LMS343 e LMS353 apresentaram maior adesão de células nos poços, e a produção do biofilme aumentou progressivamente (Figura 6).

Os resultados com 72 horas de incubação sugerem que ocorreu maior agregação celular, e que a produção de biofilme tende a aumentar com o esgotamento dos nutrientes do meio. Destaca-se que os isolados LMS214, LMS241, LMS360, LMS260, LMS363, LMS385, LMS386, LMS397 e LMS404, após 24 horas, apresentaram baixos valores de produção do biofilme. No entanto, após 48 horas, a produção aumentou. O isolado LMS189 foi único que indicou possível desagregação do biofilme após 48 horas.

Após 72 horas de incubação, observou-se a formação de cinco grupos de antagonistas, quanto à produção de biofilme compostos por três isolados, com maiores níveis de produção de biofilme, seis com produção intermediária e seis com menor produção de biofilme (Figura 6).



**Figura 6.** Quantificação da formação de biofilme bacteriano por bactérias epifíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* em diferentes intervalos.

\*Tratamentos seguidos da mesma letra em barras da mesma cor não apresentam diferença significativa pelo Teste de Skott-Knott a 5%.

A associação por biofilme é uma estratégia comum de crescimento bacteriano em superfícies (JAYARAMAN; WOOD, 2008). A emissão de sinais químicos pelas bactérias é conhecida como autoindutores, por meio de um processo denominado de *quorum sensing*. Tal mecanismo permite que as bactérias captem a densidade populacional local e encadeiem a expressão gênica (DAVIES et al., 1998). Uma vez que os isolados, no trabalho, foram utilizados em "Mix", e a comunicação intercelular entre bactérias geralmente ocorre pela difusão de produtos bacterianos entre as células, infere-se que compostos produzidos pelas bactérias podem ter agido como sinalizadores químicos indutores à agregação em biofilme.

No caso de doenças causadas por patógenos que tenham estágio epifítico em seu ciclo de vida, como a antracnose, populações microbianas podem afetar o estabelecimento das interações planta-patógeno antes da infecção. Considerando que os biofilmes podem se desenvolver em diversas superfícies, em ambientes onde existem células viáveis, pode-se aventar a hipótese que a existência de um biofilme bacteriano, na superfície de um fruto, contribui para formação uma barreira biológica à colonização de *C. brevisporum*.

Neste ensaio, também foram obtidos maiores valores de adesão celular no tempo de 72 horas de incubação sugerindo que não houve desagregação das células do biofilme com o esgotamento de nutrientes, exceto para os isolados LMS214, LMS360, LMS397, LMS404 e LMS189. Diversos mecanismos favorecem a desagregação dos biofilmes, e como consequência, as células são dispersas em sentidos opostos, o que é vantajoso de certa forma, pois permite a colonização de outros nichos com condições mais favoráveis de crescimento (STEMBERG et al., 1999).

Os biofilmes são uma amostra da natureza agregada das populações microbianas nas superfícies das plantas. A agregação espacial tem implicações significativas para interações microbianas específicas ou interespecíficas, como antibiose, predação e competição (KINKEL; NEWTON; LEONARD *apud* LINDOW; HECHT-POINAR; ELLIOTT, 2002).

Com base nesse resultado, a presença de mais de um mecanismo de ação por antagonista e na compatibilidade entre isolados, selecionaram-se para os ensaios em discos de frutos os isolados: LMS214, LMS249, LMS257, LMS343, LMS347, LMS353, LMS381, LMS385, LMS386, LMS396 e LMS404.

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

Os Mix bacterianos foram combinados baseados nos diferentes mecanismos de ação inerentes a cada antagonista, cujos isolados foram dispostos de forma a equilibrar as combinações, além da compatibilidade entre isolados e capacidade de formação de biofilme.

Após sete dias da montagem do ensaio, observou-se que os Mix 3 e 5 apresentaram maior eficiência, pois reduziu a doença entre 80% e 90%, nas concentrações  $10^7$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente, quando comparado ao controle contendo apenas o patógeno. Nas mesmas concentrações, o Mix 4 também reduziu de forma significativa a doença, porém em nível inferior ao dos combinados anteriores. O Mix 1 proporcionou resultados significativos apenas na concentração  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, enquanto o Mix 2 não diferiu do controle em qualquer das concentrações utilizadas (Tabela 4).

Resultados semelhantes foram encontrados quando foi aplicada a concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, considerando os tratamentos entre si e o controle. Ao se avaliar a concentração dentro de cada tratamento, o Mix 3 foi o de melhor desempenho, sem variar os níveis de controle da doença.

**Tabela 4.** Porcentagem de área lesionada por antracnose em discos de frutos de mamão tratados com bactérias epifíticas antagonistas a *Colletotrichum brevisporum*.

Tratamentos	Concentrações (UFC mL <sup>-1</sup> )		
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
Mix 1*	25,22 Aa <sup>1</sup>	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

\*Mix 1 - LMS381, LMS343, LMS257, LMS396; Mix 2 - LMS381, LMS214, LMS386, LMS385; Mix 3 - LMS381, LMS353, LMS404, LMS396; Mix 4 - LMS381, LMS249, LMS386, LMS385; Mix 5 - LMS381, LMS257, LMS396, LMS347.

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

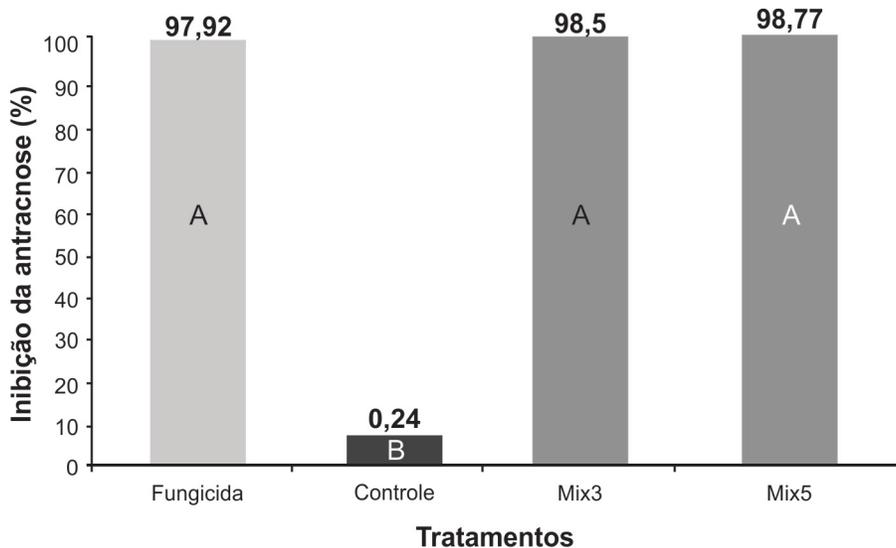
Pôde-se observar que, além do controle do patógeno, os discos tratados com os “Mix” 3 e 5 mantiveram-se consistentes, de forma semelhante aos discos do controle negativo, sugerindo que a aplicação dos antagonistas poderia retardar a maturação dos frutos, possivelmente pela atuação sobre a produção de etileno (SHI et al., 2011).

A interação entre os tratamentos e as concentrações utilizadas foi significativa, evidenciando que a concentração da suspensão dos antagonistas, influenciou na eficácia dos “Mix” no controle da antracnose. Os menores níveis de controle na concentração 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> podem ter ocorrido em virtude da equivalência entre as populações máximas dos antagonistas e do patógeno (VAN BRUGGEN et al., 2006).

Os resultados desse estudo deram subsídio para a seleção dos “Mix” 3 e 5 na concentração 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, que foram empregados no ensaio posterior, para verificar a redução da antracnose em frutos de mamão.

## Avaliação da redução da antracnose em frutos inteiros

Após sete dias de incubação dos frutos inoculados com os antagonistas e o fungo patogênico, verificou-se que os “Mix” dos antagonistas reduziram significativamente a doença. Sem diferença significativa do tratamento com aplicação de fungicida Piraclostrobina (250 g/L), que exibiu controle de 97,92% da doença, verificou-se nos tratamentos “Mix 3” e “Mix 5” uma eficácia de redução da doença de, respectivamente, 98,5% e 98,77% (Figura 7).

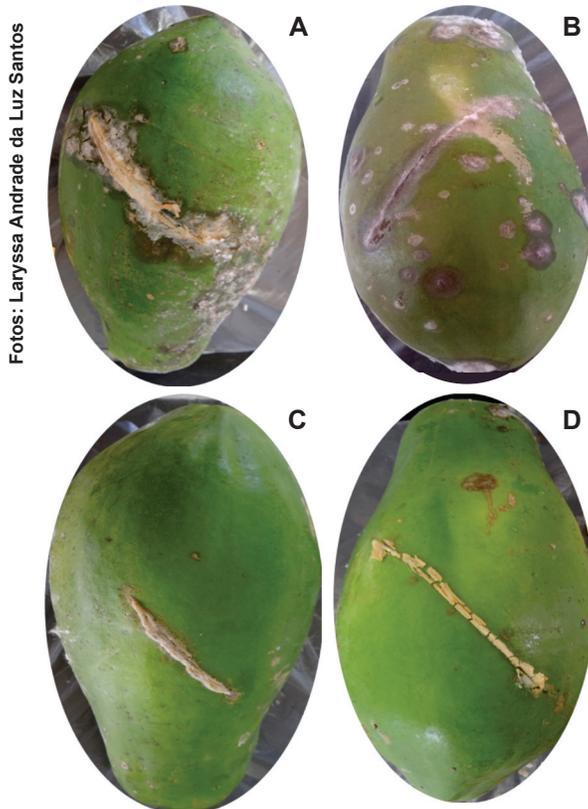


**Figura 7.** Percentagem de inibição da antracnose causada por *Colletotrichum brevisporum* em frutos de mamão do grupo Formosa, tratados com bactérias antagonistas. Tratamentos seguidos da mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey 5%.

Tanto nos ensaios em discos de frutos como em frutos, a conciliação de diferentes mecanismos de ação acionados por cada uma das bactérias epifíticas, expressados de forma conjunta pela associação na superfície do fruto em biofilme, pode ter contribuído para a redução da antracnose.

Notadamente, as combinações bacterianas aplicadas proporcionaram um efeito protetivo nos ferimentos dos frutos (Figura 8). Estudando leveduras para o controle de *Penicillium digitatum* em citros, Abraham, Laing e Bower (2010) inferiram que uma vez estabelecidos nos ferimentos dos frutos, os

microrganismos utilizam todos os nutrientes liberados a partir de ferimentos, inibindo assim o estímulo à germinação dos esporos fúngicos. Ainda, segundo Janisiewicz, Peterson e Bors (1993), a eficácia de agentes de biocontrole depende de sua capacidade de colonizar fontes de alimentos nas plantas, sem danificar as células. Considerando os fatores capacidade de colonização do ferimento com base na absorção de nutrientes liberados destes, e frente aos resultados obtidos nos ensaios, a aplicação dos antagonistas concomitante ao *C. brevisporum* pode ter favorecido a eficiência do biocontrole. Não se descartam as hipóteses quanto a efeitos preventivos e curativos, mas ensaios envolvendo a aplicação das bactérias em intervalos anteriores e posteriores à inoculação devem ser conduzidos para comprovar essas possibilidades.



**Figura 8.** Antracnose em frutos de mamão tratados com bactérias antagonistas a *Colletotrichum brevisporum* e fungicida. Controle (sem tratamento) (A); Pyraclostrobin (B); Mix 3 (C); Mix 5 (D).

O uso de agentes de biocontrole combinados apresenta com vantagens a adaptação aos estresses abióticos e bióticos, melhor desempenho na colonização do tecido-alvo da planta, proteção contra agentes patogênicos, além da supressão de mecanismos envolvidos no desenvolvimento do patógeno. Raupach e Kloepper (1998) averiguaram e confirmaram a eficiência da utilização de isolados combinados que exibiam distintos mecanismos de ação, como antibiose por produção de compostos antimicrobianos difusíveis e quitinase, com maior supressão de fitopatógenos quando antagonistas foram utilizados de forma combinada.

Um significativo número de trabalhos tem relatado o biocontrole de fitopatógenos com o uso de bactérias (SHI et al., 2010). Contudo, são escassos os relatos da quantificação de biofilme sendo utilizado como critério de seleção de antagonistas, tampouco no biocontrole em pós-colheita.

De acordo com os resultados obtidos, a capacidade de formação do biofilme por antagonistas pode desempenhar papel importante na prevenção de doenças na pós-colheita (CHEN et al., 2013). No entanto, isoladamente, não é suficiente para garantir o sucesso do biocontrole. Há que se levar em conta que as bactérias avaliadas produziam compostos antimicrobianos difusíveis e voláteis, além de quitinases. Ainda, deve-se confirmar a importância individual de cada característica, correlacionando com a capacidade ou não de formação de biofilme para cada isolado.

Vários relatos suportam que agentes de biocontrole podem reduzir as perdas por patógenos em frutos por meio da indução de resistência sistêmica em pós-colheita (ROMANAZZI et al., 2016). Não foram realizados testes envolvendo tal fenômeno biológico. Da mesma forma, a competição por nutrientes ou sítios de infecção é outra questão que pode ser estudada para elucidação do envolvimento desse mecanismo de ação por parte dos antagonistas avaliados.

O biocontrole em pós-colheita por agentes bacterianos, no “frutoplano”, é uma linha de estudo muito presente na literatura científica. A seleção de bactérias antagonistas como agentes de biocontrole da antracnose, por meio de ensaios *in vitro*, aliados à quantificação da produção de biofilme proporcionou significativos resultados quanto à redução da doença em frutos no presente trabalho. Neste estudo pôde-se verificar que o biocontrole bacteriano é um método viável e eficaz para o controle da antracnose em pós-colheita, uma vez que não houve diferença significativa entre os tratamentos Mix 3 e 5, quando comparados ao fungicida Piraclostrobina. Ressalta-se que em etapas

posteriores sejam realizados novos testes em que sejam analisados tempos distintos de aplicação destes nos frutos, já que no presente trabalho, antagonistas e patógeno foram aplicados concomitantemente.

Para ampliar e consolidar o emprego do biocontrole de fitopatógenos há que se promover estratégias, baseadas na integração de diferentes métodos de controle, de modo a se obter um efeito aditivo ou sinérgico. Assim, a compatibilidade entre microrganismos e fungicida é uma opção também a ser estudada, vislumbrando seu emprego combinado, em um contexto de manejo integrado da antracnose em pós-colheita.

## Conclusão

---

Os isolados de antagonistas bacterianos obtidos no presente estudo, em duas combinações denominadas Mix 3 e 5, atuando por meio de diferentes mecanismos – síntese de compostos antimicrobianos, produção da enzima quitinase, inibição da germinação de conídios e produção de biofilme – reduziram a severidade da antracnose em frutos de mamão, quando aplicados em pós-colheita, em nível similar ao tratamento com fungicida, podendo ser aplicados em substituição ou, possivelmente, em alternância ao tratamento químico, para o controle de *C. brevisporum*.

## Referências

---

- ABRAHAM, A. O.; LAING, M. D.; BOWER, J. P. Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. **Biological Control**, v. 53, n. 1, p. 32-38, 2010. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.12.009
- ALVINDIA, D. G.; NATSUAKI, K. T. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. **Crop Protection**, v. 27, n. 8, p. 1200-1207, 2008. Doi: 10.1016/j.cropro.2008.02.007
- ALVINDIA, D. G.; NATSUAKI, K. T. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. **Crop Protection**, v. 28, n. 3, p. 236-242, 2009. Doi: 10.1016/j.cropro.2008.10.011
- ANDRADE, C. J.; ANDRADE, L. M.; BUTION, M. L.; DOLDER, M. A. H.; BARROS, F. F. C.; PASTORE, G. M. Optimizing alternative substrate for simultaneous production of surfactin and 2,3-butanediol by *Bacillus subtilis* LB5a. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 6, p. 209-218, 2016. Doi: 10.1016/j.cbac.2016.04.004
- ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. **Biological Control**, v. 53, n. 1, p. 122-128, 2010. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.11.010

- BAUTISTA-BAÑOS, S.; SIVAKUMAR, D.; BELLO-PÉREZ, A.; VILLANUEVA-ARCE, R.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v. 49, p. 8-20, 2013. Doi: 10.1016/j.cropro.2013.02.011
- CHEN, Y.; YAN, F.; CHAI, Y.; LIU, H.; KOLTER, R.; LOSICK, R.; GUO, J. H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 848-864, 2013. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x
- CONWAY, B. A. D.; VENU, V.; SPEERT, D. P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5678-5685, 2002.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995. Doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
- DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, v. 280, n. 5361, p. 295-298, 1998. Doi: 10.1126/science.280.5361.295
- FUJIMOTO, A.; KUPPER, K. C. Production of antifungal compounds and hydrolytic enzymes by *Bacillus* spp. as mechanisms of action against *Phyllosticta citricarpa*. **IOSR JOURNAL OF AGRICULTURE AND VETERINARY SCIENCE**, v. 9, n. 11, p. 19-27, 2016. Doi: 10.9790/2380-0911021927
- GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 59-65, 2014. Doi: 10.1016/j.micres.2013.06.014
- HOWARD, M. B.; EKBORG, N. A.; WEINER, R. M.; HUTCHESON, S. W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627-635, 2003. Doi: 10.1007/s10295-003-0096-3
- INCAPER. **Polos de fruticultura**. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/fruticultura-mamao>. Acesso em: 23 jul. 2018.
- JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, R. Control of storage rots of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, v. 78, n. 5, p. 466-470, 1993. Doi: 10.1094/PD-78-0466
- JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K. **Bacterial quorum sensing**: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 10, p. 145-167, 2008. Doi: 10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536
- KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. T. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010. Doi: 10.4014/jmb.0905.05007
- KINKEL, L. L.; NEWTON, M. R.; LEONARD, K. J. Resource aggregation in the phyllosphere: implications for microbial dynamics across spatial scales. In: LINDOW, S. E.; HECHT-POINAR, E. I.; ELLIOTT, V. J. (Ed.). **Phyllosphere Microbiology. The American Phytopathological Society**, St. Paul, p. 317-340, 2002.
- LIMA, J. R.; VIANA, F. M. P.; LIMA, F. A.; LIMA, J. S.; PIENIZ, V.; GONÇALVES, L. R. B. **Biocontrole da antracnose pós-colheita do mamão com levedura killer**. Fortaleza:

Embrapa Agroindústria Tropical. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 59)

LIU, F.; WEIR, B. S.; DAMM, U.; CROUS, P. W.; WANG, Y.; LIU, B.; CAI, L. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 63-86, 2015. Doi: 10.3767/003158515X687597

OSMAN, S. M.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. **Crop Protection**, v. 30, n. 2, p. 173-178, 2011. Doi: 10.1016/j.cropro.2010.09.014

RAUPACH, G. S.; KLOPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v. 88, n. 11, p. 1158-1164, 1998.

ROMANAZZI, G.; SANZANI, S. M.; BI, Y.; TIAN, S.; MARTÍNEZ, P. G.; ALKAN, N. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 82-94, 2016. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2016.08.003

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2001.

SANTOS, L. A. L. **Bactérias epifíticas como agentes de biocontrole da antracnose do mamoeiro em pós-colheita**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.05.001

SHI, J.; LIU, A.; LI, X.; FENG, S.; CHEN, W. Identification of endophytic bacterial strain MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested papaya fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 227-232, 2010. Doi: 10.1002/jsfa.3798

SHI, J.; LIU, A.; LI, X.; FENG, S.; CHEN, W. Inhibitory mechanisms induced by the endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. **Biological control**, v. 56, n. 1, p. 2-8, 2011. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.09.012

STEMBERG, C.; CHRISTENSEN, B. B.; JOHANSEN, T.; TOFTGAARD, N. A.; ANDERSEN, J. B.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4108-4117, 1999. Doi: 10.1128/AEM.65.9.4108-4117.1999

TUITE, J. F. **Plant pathological methods. Fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess Pub. Co., 1969.

VALENZUELA, N. L.; ANGEL, D. N.; ORTIZ, D.; ROSAS, R. A.; GARCÍA, C. F. O.; SANTOS, M. O. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biological Control**, v. 91, p. 88-93, 2015. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.08.002

VAN BRUGGEN, A. H. C.; SEMENOV, A. M.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; DE VOS, O. J.; BLOK, W. J. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, n. 1, p. 105-122, 2006.

ZHENG, M.; SHI, J.; SHI, J.; WANG, Q.; LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 200-206, 2013. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.02.004



---

*Mandioca e Fruticultura*

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL

CGPE 017173