



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Leveduras e extratos aquosos de plantas da Caatinga no  
controle da mancha aquosa do meloeiro**

**Claudeana Souza da Conceição**

**Recife-PE**

**2019**

**CLAUDEANA SOUZA DA CONCEIÇÃO**

**LEVEDURAS E EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS DA  
CAATINGA NO CONTROLE DA MANCHA AQUOSA DO  
MELOEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa de Lima Ramos Mariano

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Marco Aurélio Siqueira da Gama

**RECIFE-PE**

**FEVEREIRO - 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C7441 Conceição, Claudeana Souza da.

Leveduras e extratos aquosos de plantas de caatinga no controle da mancha aquosa do meloeiro / Claudeana Souza da Conceição. – Recife, 2019.  
93 f.: il.

Orientador(a): Elineide Barbosa de Souza.

Coorientador(a): Rosa de Lima Ramos Mariano, Marco Aurélio Siqueira da Gama.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. *Acidovorax citrulli* 2. *Rhodotorula aurantiaca* 3. Adaptabilidade 4. Biofilme  
5. Biotecnologia 6. Controle alternativo I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Mariano,  
Rosa de Lima Ramos, coorient. III. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, coorient. IV. Título

CDD 632

**Leveduras e extratos aquosos de plantas da Caatinga no controle da  
mancha aquosa do meloeiro**

**CLAUDEANA SOUZA DA CONCEIÇÃO**

Tese defendida e Aprovada pela Banca Examinadora em 27 de Fevereiro de 2019.

**ORIENTADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza**

**EXAMINADORES:**

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Adriano Márcio Freire Silva

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

---

Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Sant'Anna da Silva

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lilian Margarete Paes Guimarães

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2019**

*“A imaginação sonha, as metas dirigem, o entusiasmo impulsiona, mas só a perseverança produz os resultados.”*

I Timóteo 1:20

*Aos meus queridos irmãos, Clauderson Leandro e Clauberson Leonardo, ao meu amigo-irmão Uerbson Coutinho, à minha querida tia Maria Lúcia de Leão, e aos demais amigos e familiares, pelo apoio, incentivo, amor e compreensão em todos os momentos. E, às minhas sobrinhas: Grazielly (meu alecrim dourado) e Yohanna (minha moreninha), por hoje, serem mais uma das razões do meu viver!*

### **OFEREÇO**

*Aos amores da minha vida, meus pais Cléo Pinheiro e Maria Cláudia da Conceição, pelo exemplo de vida, caráter, dedicação e amor; e por serem a força que me mantém em movimento, meu eterno agradecimento.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e força suprema, por estar comigo nas horas mais solitárias do dia, por me mostrar mais uma vez, que os sonhos DEle, são maiores que os meus.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela estrutura cedida para estudos, pesquisas e demais atividades, e pela oportunidade de realização do doutorado. E a Coordenação de Apoio e Pesquisa (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza, pela dedicação, amizade, orientação acadêmica e valiosos ensinamentos, que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Às Professoras Dr<sup>a</sup>. Rosa de Lima Ramos Mariano, Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanusa da Silva e Dr<sup>o</sup>. Marco Aurélio Siqueira da Gama, pela co-orientação acadêmica que muito contribuíram para minha formação profissional.

Aos Professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso.

À Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Sant'Anna, por dedicar tanto tempo à mim, pela valiosa colaboração e disponibilidade durante a execução de parte deste trabalho.

Ao Dr. André Xavier, pela valiosa contribuição para que este trabalho fosse concluído.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Laboratório de Produtos Naturais (Departamento de Bioquímica) pela estrutura cedida para partes de minhas pesquisas.

À empresa Alltech Crop Science por doarem o produto as sementes de melão.

Meu enorme agradecimento à toda equipe que compõe o Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) por todo companheirismo durante a execução deste trabalho: Adriano, Ana Dulce, Ana Karolina, Bárbara, Beatriz, Bruno, Géssyka, Greecy, Leandro, Leandro Velez, Lucas Lucena, Lucas, Pedro, Roberto e Willams.

Aos amigos Joelma, Alba, Fábio Júnior, Kledson, Leandro Reis, Jefrejan, Daniela, Carmem, Bárbara, Adriana, Elizabeth, Grazielle, Ana, Lucas, Risoneide, Tiago, Iwanne, Willie e Josiene minha imensa gratidão, pelo companheirismo de todos os momentos dessa trajetória, amizade e toda força recebida.

Ao meu amigo, Emanuel Feitosa, sem a sua ajuda, eu não teria concluído esse trabalho. Obrigada por tudo, você foi meu braço direito.

À Darcy Martins e Romildo Angeiras, pela amizade e presteza, ao longo do curso.

Ao Sr. Luis Coelho (Lula) e ao Sr. Luiz Silva, pela atenção, conselhos e disposição ao me ajudarem na casa de vegetação. Obrigada pela força e amizade!

À minha família Parque-Caxangá 101, Leandro Moreira, Abdias e Keila, obrigada pelo carinho, paciência e motivação em todos os sentidos.

Finalmente, a todos que, de uma forma ou de outra, participaram de todos os momentos vividos nessa jornada, minha eterna gratidão.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>10</b>
Introdução Geral.....	11
A cultura do meloeiro.....	11
A mancha aquosa e <i>Acidovorax citrulli</i> .....	12
Leveduras biocontroladoras.....	15
Extratos de plantas da Caatinga.....	17
Biofilme.....	19
Referências Bibliográficas.....	22
<b>CAPÍTULO II – Adaptabilidade de leveduras e colonização de <i>Rhodotorula auratiaca</i> em tecido de meloeiro.....</b>	<b>32</b>
Resumo.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	41
Discussão.....	44
Conclusões.....	48
Agradecimentos.....	48
Referências Bibliográficas.....	49
<b>CAPÍTULO III - Extratos aquosos de plantas da Caatinga no controle da mancha aquosa do meloeiro.....</b>	<b>65</b>
Resumo.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	68
Resultados.....	73
Discussão.....	76
Conclusões.....	78
Agradecimentos.....	79
Referências Bibliográficas.....	79
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>93</b>

## RESUMO GERAL

A mancha aquosa causada por *Acidovorax citrulli* é uma das principais doenças para a cultura do meloeiro nas áreas produtoras do Nordeste brasileiro. Este trabalho avaliou: (a) a adaptabilidade das leveduras biocontroladoras *Rhodotorula aurantiaca* (LMA1), *R. glutinis* (LMS) e *Pichia anomala* (CC-2) em relação a diversas condições ambientais e formação de biofilme, e a dinâmica de colonização do isolado LMA1 em tecidos de plantas de meloeiro; (b) a atividade de cinco extratos aquosos de plantas da Caatinga, como extrato bruto e concentração mínima bactericida (CMB), no controle da mancha aquosa e na formação de biofilme pelo patógeno, realizando-se ainda a análise microscópica dos tecidos de plântulas tratadas. As leveduras apresentaram melhor crescimento entre 27 e 30 °C e rápido decréscimo a partir de 35 °C, resultando em um comportamento mesófilo, diferindo quanto a temperatura ótima de crescimento. Em relação ao pH, 8 e 9 foram os melhores níveis para o crescimento das leveduras. Com a elevação dos níveis de salinidade, o crescimento dos isolados foi reduzido significativamente, sendo que LMA1 apresentou maior tolerância. Quanto ao potencial osmótico, o maior crescimento ocorreu no  $\Psi_s$  mais elevado (-1 Mpa), sendo o isolado CC-2 o mais sensível a diminuição do  $\Psi_s$ . Na produção de biofilme, LMA1 e LMS foram fortes produtores, já o CC-2, foi moderado produtor. No estudo de colonização transformantes de LMA1 resistentes a higromicina B (Lt2 e Lt14) foram inoculados em sementes, e observou-se a colonização de raízes, hipocótilos, cotilédones, folhas e ramos, e quando inoculados no 1º par de folhas, foram detectados até o 6º par. No experimento com tratamento de sementes de melão, os extratos brutos de *Ximenia americana*, *Maytenus rigida* e *Schinopsis brasiliensis* e extrato de *Libidibia ferrea* na CMB (6,25 mg mL<sup>-1</sup>) reduziu em 76% o índice da doença (ID). Na proteção de plântulas, se destacaram os extratos de *S. obtusifolium* (bruto) e *S. brasiliensis* (CMB = 0,024 mg mL<sup>-1</sup>) com redução do ID em níveis superiores ao indutor ASM. Todos os tratamentos apresentaram atividade antibiofilme em superfície foliar. Os extratos de *X. americana* e *S. obtusifolium* tornaram melhor estruturado o comprimento da epiderme superior das células da folha, além de apresentaram estômatos totalmente fechados. Com base nos resultados, os extratos de *L. ferrea*, *Maytenus rigida*, *Schinopsis brasiliensis*, *S. obtusifolium* e *X. americana*, revelaram-se promissores no controle da mancha aquosa.

**Palavras-chaves:** *Acidovorax citrulli*, *Rhodotorula aurantiaca*, adaptabilidade, biofilme, biotecnologia, controle alternativo.

## GENERAL ABSTRACT

The bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax citrulli* is one of the main diseases for the melon crop in the producing areas of the Northeast of Brazil. This work evaluated the adaptability of yeast (*Rhodotorula aurantiaca* (LMA1), *R. glutinis* (LMS) and *Pichia anomala* (CC-2) as biocontrol agents in relation to several environmental conditions and biofilm formation, and the colonization dynamics of the LMA1 isolate in tissues of melon plants and the activity of extracts of Caatinga plants in the control of the (BFB). The yeasts presented better growth between 27 and 30 ° C and fast decrease from 35 ° C, resulting in a mesophilic behavior, differing in the optimal temperature of growth. Regarding pH, 8 and 9 were the best levels for yeast growth. With the elevation of salinity levels, the growth of the isolates was significantly reduced, and LMA1 showed a higher tolerance. As for the osmotic potential, the highest growth occurred in the highest  $\Psi_s$  (-1 MPa), the isolate CC-2 being the most sensitive to the  $\Psi_s$  decrease. In biofilm production, LMA1 and LMS were strong producers, while CC-2 was a moderate producer. In the colonization study, LMA1 from hygromycin B resistant transformants (Lt2 and Lt14) was inoculated into seeds, and the colonization of roots, hypocotyls, cotyledons, leaves and branches was observed, and when inoculated on the first pair of leaves, it was detected until the 6th pair. In the study of aqueous extracts of plants of the Caatinga were evaluated incubation period and the reduction of disease severity in seeds and seedlings; the antibiofilm activities to *A. citrulli in vivo*; and tissue microscopy of treated seedlings. All treatments presented antibiofilm activity on leaf surface, except Bion. In the experiment with treatment of melon seeds, *Libidibia ferrea* in MBC (6,25 mg mL<sup>-1</sup>) reduced the disease index (ID) by 76%. In the protection of seedlings, *Sideroxylon obtusifolium* extract reduced the ID by 99%. The extracts of *Ximenia americana* and *S. obtusifolium* made the upper epidermal length of the leaf cells larger and better structured, in addition to presenting totally closed stomata. Based on the results, the extracts of *L. ferrea*, *Maytenus rigida*, *Schinopsis brasiliensis*, *S. obtusifolium* e *X. americana* showed to be promising in the control of the bacterial fruit blotch.

**Keywords:** *Acidovorax citrulli*, *Rhodotorula aurantiaca*, adaptability, biofilm, biotechnology, alternative control.

# Capítulo I

---

## Introdução Geral

# LEVEDURAS E EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS DA CAATINGA NO CONTROLE DA MANCHA AQUOSA DO MELOEIRO

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A cultura do meloeiro

Pertencente à família das Cucurbitáceas, o meloeiro (*Cucumis melo* L.), não tem o centro de diversidade genética claramente estabelecido, sendo indicado por alguns autores como originário na África, enquanto que para outros no oeste da Ásia (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1998; HARLAN; WET; STERMLER, 1997; TRENTIN, 1998;). A produção de melão está entre as olerícolas de destaque nacional, e mesmo o Brasil não sendo um grande produtor mundial foi classificado entre os 10 principais exportadores do fruto (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018). O melão impulsiona a representatividade brasileira através do principal polo produtivo, o nordeste brasileiro, nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco. Notadamente, o Vale do Jaguaribe, no estado do Ceará, Mossoró-Assú, no estado do Rio Grande do Norte; e a chapada do Apodi, que fica na divisa desses dois estados, são as principais áreas produtoras de melão no país (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018; PAULA *et al.*, 2017).

Em 2017 o Rio Grande do Norte produziu 250 mil toneladas de frutos, seguido do Ceará, com 200 mil toneladas, e juntos foram responsáveis por 90% da produção brasileira. O melão é a segunda fruta mais exportada pelo Brasil em valor, e a primeira em volume. (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018).

A grande adaptação do meloeiro a região Nordeste é devido às condições edafoclimáticas, em que o clima semi-árido favorece o desenvolvimento e a produtividade da planta, e também a qualidade dos frutos de melão (MOURA *et al.*, 2011).

A produção do melão no Nordeste é caracterizada pela sua importância socioeconômica, por ser uma cultura de alto valor comercial, tendo a participação de empresas de médio e grande porte que lideram este agronegócio, além de muitos pequenos produtores, a partir da agricultura familiar, que escoam a produção via grandes empresas, significativa contribuição na geração de emprego e renda (BUAINAIN; BATALHA, 2007; MOURA *et al.*, 2011). As grandes empresas adotam um alto nível tecnológico para o desenvolvimento da cultura, como por exemplo, manta térmica tecido não tecido (TNT), uso de irrigação localizada por gotejamento e cobertura plástica de polietileno (mulch), a formação e a capacitação de mão de obra, a instalação de empresas aduaneiras, brokers, entre outros (ARAÚJO; CAMPOS, 2011; SANTOS *et al.*, 2001). Todavia, mesmo com toda tecnologia aplicada, há peculiaridades na

cultura do meloeiro que dificultam o controle fitossanitário, como o plantio de forma escalonada e o ciclo curto, cerca de 60 dias em média, favorecendo a migração de pragas e fitopatógenos de uma cultura mais velha para uma recém-plantada (FERNANDES; FERREIRA; MONTAGNA, 2000).

As bacterioses vêm assumindo uma importância crescente dentre as doenças que ocorrem nessa cultura, destacando-se no Brasil a mancha aquosa causada por *Acidovorax citrulli* (Schaad *et al.*) Schaad *et al.*, como a mais importante, além de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones); *Pseudomonas syringae* (Van Hall); *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith) ; *Pseudomonas cichorri* (Swingle) Stapp; *Pseudomonas* sp. (Migula); e *Xanthomonas campestris* pv. *curcubitae*(Bryan) Dye (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001).

A mancha aquosa causada por *A. citrulli* [Sin: *A. avenae* subsp. *citrulli* Schaad *et al.* (Willems *et al.*)], é uma das principais e importantes doenças para a cultura do meloeiro nas áreas produtoras do Nordeste, principalmente nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, na estação das chuvas (SANTOS; VIANA, 2000).

## **2. A mancha aquosa e *Acidovorax citrulli***

Em melão, a primeira ocorrência da mancha aquosa foi nos Estados Unidos da América em 1996, com incidência em mais de 50% dos frutos em campos agrícolas no Texas (ISAKEIT, 1997). Atualmente a doença encontra-se distribuída em 10 países da Ásia, dois da América do Norte, três da América central e Caribe (sendo que na Nicarágua a doença foi erradicada), um na América do Sul, quatro na Europa e três na Oceania (CABI, 2015). Recentemente, foi relatada na Turquia, Sérvia, Califórnia e Guadalupe (HORUZ *et al.*, 2014; KUMAGAI *et al.*, 2014; POPOVIC; IVANOVIC, 2015; CUNTY *et al.*, 2018). Devido aos relatos em 2014 e 2015, a mancha aquosa foi adicionada à lista de alerta A1 da EPPO, a qual relaciona as doenças de grande impacto econômico mundial (CABI, 2015). *A. citrulli* foi relatada como uma séria ameaça para cucurbitáceas, em particular, meloeiro e melanciaeira (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai) (EPPO, 2015).

No Brasil, a mancha aquosa foi assinalada em 1997, no estado do Rio Grande do Norte (ASSIS *et al.*, 1999). Em seguida, no Ceará (SANTOS; VIANA, 2000), no Rio Grande do Sul (UENO; COUTO; UESUGI, 2003), em Pernambuco (MARIANO; SILVEIRA, 2004), na Bahia (MARIANO *et al.*, 2004) e no Piauí (CONCEIÇÃO, 2017). As perdas causadas por essa doença no Rio Grande do Norte já foram assinaladas entre 40 a 50%, atingindo até 100% em períodos chuvosos (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001).

Os hospedeiros mais suscetíveis dentre as cucurbitáceas são o meloeiro e a melancia, nos quais os sintomas se desenvolvem em folhas e frutos (EPPO, 2010). Os sintomas da doença podem se manifestar em qualquer fase de desenvolvimento da planta. Sobre as folhas podem se desenvolver entre as nervuras, não muito distintivos, e podem ser confundidos com sintomas de outras doenças. As lesões variam do marrom claro ao marrom avermelhado. Os sintomas foliares não resultam em desfolhamento, o que as tornam importantes reservatórios da bactéria para a infecção do fruto (HOPKINS, 1994). Nos frutos, os sintomas da doença são mais típicos. As lesões são inicialmente pontos oleosos com 1 a 5 mm de diâmetro (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001), as quais se expandem e se tornam manchas marrons, necróticas com ou sem rachadura no centro (VIANA *et al.*, 2000). Geralmente, a bactéria coloniza a polpa do fruto, onde causa podridão seca, podendo assim contaminar as sementes externa e internamente (MARIANO; SILVEIRA, 2007). Em estudos de microscopia eletrônica, Dutta *et al.* (2016) concluíram que a localização no embrião/endosperma aumenta a sobrevivência de *A. citrulli* nas sementes.

*Acidovorax citrulli* pertence ao Domínio Bactéria, Filo Proteobacteria, Classe Betaproteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Comamonadaceae, Gênero *Acidovorax*, Espécie *Acidovorax citrulli*. É uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete, aeróbica e móvel por um flagelo polar. Apresenta bom crescimento no meio de cultura ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose (NYDA), onde forma colônias pequenas com 0,7 a 1,0 mm, brancas ou cremes. Não apresenta pigmento fluorescente em meio King B (SCHAAD *et al.*, 1978). Cresce a temperatura de 41°C, mas não a 4°C, com máximo desenvolvimento a 35°C; nas concentrações de 1, 2, 3 e 4 % de NaCl, com crescimento máximo a 2 % e mínimo a 4 %; e na faixa de pH de 5,0 a 9,0, com máximo em pH 7,0 (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

A mancha aquosa inicia seu ciclo com sementes infectadas ou infestadas originando plântulas doentes. O patógeno dissemina-se para novas folhas e plantas vizinhas à medida que as plantas vão crescendo no campo. A principal fonte de inóculo para frutos imaturos são as lesões nas folhas (HOPKINS, 1994). Alves *et al.* (2010) demonstraram a capacidade de *A. citrulli* colonizar diferentes partes do meloeiro ao longo do tempo, dependendo da localização do inóculo inicial. A partir da inoculação das sementes a bactéria colonizou efetivamente o hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, folhas e ramos, e a partir da inoculação no 1º par de folhas, foi detectada até o 10º par de folhas e no ramo subsequente. Os resultados confirmaram o que tem sido observado nas condições de campo, ou seja, que folhas expandidas e ramos são fontes de inóculo para flores e frutos de melão dando, portanto, suporte científico para o desenvolvimento de estratégias mais efetivas de manejo da mancha-aquosa do meloeiro.

Medidas de manejo para evitar a doença em cultivos estabelecidos consistem na proteção das plantas através de aplicações quinzenais ou semanais com fungicidas cúpricos, iniciando-se na floração, ou antes, e se prolongando até a maturação dos frutos (WALCOTT *et al.*, 2001) e quatro aplicações com intervalos semanais de acibenzolar-S-metil (SALES JÚNIOR *et al.*, 2007). Como medidas culturais, principalmente após a entrada de *A. citrulli* no campo são indicadas: manter temperatura e umidade em níveis baixos em casa de vegetação e estufa; erradicar plântulas/plantas com sintomas de mancha aquosa (DIAS *et al.*, 1998); destruir restos de culturas, principalmente em campos infectados; evitar plantio direto (ISAKEIT, 1999; O'BRIEN; MARTIN, 1999); diminuir a movimentação de pessoas ou implementos no campo quando as plantas estiverem molhadas (orvalho, irrigação, chuva); evitar plantio em áreas úmidas ou em períodos de muitas chuvas; fazer rotação de culturas por pelo menos três anos, não utilizando hospedeiros alternativos de *A. citrulli*; efetuar adubação equilibrada, sem excesso de nitrogênio; eliminar cucurbitáceas silvestres, como melão-pepino (*Solanum muricatum* Ait.), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), bucha (*Luffa cylindrica* M. Roemer) e cabaça (*Lagenaria vulgaris* Ser.) (VIANA *et al.*, 2000).

Trabalhos de seleção para obtenção de fontes de resistência à mancha aquosa em meloeiro foram realizadas por Bahar *et al.* (2009) e em melancia por Carvalho *et al.* (2012). No entanto variações frequentes têm sido encontradas nos resultados, em decorrência das diferenças nas condições experimentais (CARVALHO *et al.*, 2013) e a alta variabilidade dos isolados selecionados (HOPKINS, 1993).

Controle biológico também tem sido testado no controle da mancha aquosa. Os endofíticos ENM5 (*Bacillus* sp.), ENM9 (*Bacillus cereus* Frankland e Frankland), ENM13 (*Bacillus* sp.), ENM16 (*B. cereus*), ENM32 (*Bacillus subtilis* Cohn) e ENM43 (*Bacillus* sp.) quando aplicados em sementes artificialmente infectadas com *A. citrulli* revelaram potencial para o controle da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Líquidos fermentados com ou sem presença das células de *B. subtilis* (R14), *B. megaterium* de Bary pv. *cerealis* (Hosford) (RAB7), *B. pumilis* (Meyer e Gottheil) (C116) e *Bacillus* sp. (MEN19) reduziram a incidência e severidade da doença (SANTOS *et al.*, 2006). Medeiros *et al.* (2009) testaram 50 isolados de bactérias endofíticas e epifíticas obtidas de melão e outras culturas e selecionaram o isolado RAB9 (*Bacillus* sp.) como eficiente no controle da mancha aquosa pela bacterização de sementes infectadas e o isolado MEN2 (*Paenibacillus lentimorbus* Dutky) pela pulverização em plântulas para proteção das folhas. Já existem pesquisas que evidenciam a eficiência de leveduras no controle dessa doença (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2009).

Extratos de plantas também é uma alternativa para o controle da mancha aquosa, com alguns resultados de eficiência na inibição do crescimento de *A. citrulli in vitro* (MALAFAIA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2016).

### 3. Leveduras biocontroladoras

O uso de defensivos químicos, ao longo dos anos, tornou-se um dos principais fatores de contaminação de alimentos e impacto ambiental no cenário agrícola. A crescente preocupação com as consequências relacionadas à quantidade residual de produtos químicos presente nesses alimentos tem impulsionado o desenvolvimento e a valorização das produções orgânicas, ganhando assim, mais espaço no mercado, devido à demanda dos consumidores. Neste contexto, o controle biológico de doenças de plantas destaca-se como um método de controle seguro e ambientalmente adequado, podendo ser inserido nos sistemas de manejo fitossanitários agrícolas (MORANDI *et al.*, 2014).

Ao se tratar de proteção de plantas, tem crescido o interesse pelo uso de leveduras no controle biológico. As leveduras apresentam capacidade de se desenvolverem rapidamente nas superfícies foliares, flores e frutos, especialmente em habitats ricos em açúcar. Colonizam o ambiente e excluem o crescimento de outros microrganismos por meio de competição por espaço e nutrientes, parecendo essa ser a forma mais comum de controle biológico das leveduras (VALDEBENITO SANHUEZA, 2000). Sem atuar diretamente sobre o patógeno, podem agir por indução de resistência (BETTIOL; MORANDI, 2009; CONCEIÇÃO *et al.*, 2014); e promoverem o crescimento de plantas (SHALABY; EL-NADY, 2008).

As pesquisas com leveduras no biocontrole de doenças fúngicas em frutas, vegetais e cereais pós-colheita já estão bem estabelecidas (DRUVEFORS *et al.*, 2002; FRANÇA *et al.*, 2015; FRAVEL, 2005; LASSOIS; De BELLAIRE; JIJAKLI, 2008), inclusive existindo produtos comerciais em alguns países (FRAVEL, 2005; HAISSAM, 2011). No entanto, em relação ao controle de fitobacterioses com leveduras existem poucas pesquisas. Melo *et al.* (1995) observaram 100% de redução na incidência da podridão mole em pimentão (*Capsicum annuum* L.) com o isolado LD-19 de *Rhodotorula* sp., que também reduziu em 21,2% a severidade da doença em tomateiro (GOMES *et al.*, 2005). No manejo da *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em pimentão, as leveduras *R. aurantiaca* e *R. glutinis* atuaram significativamente de forma positiva no período de incubação, na redução da severidade da doença e na área abaixo da curva de progresso da doença, em comparação com a testemunha (SILVA *et al.*, 2014). Em couve-chinesa (*Brassica pekinensis*) (Lour.) Rupr., o isolado Rh1 de *Rhodotorula* sp. reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença em até 33,5% em casa

de vegetação e o índice de doença em 8,8%, em campo (MELLO *et al.*, 2011). Três isolados de *Cryptococcus*, sendo dois de *C. magnus* (Lodder e Kreger-van Rij) Baptist e Kurtzman e um não identificado, quando aplicados em estigmas destacados de flores de maçã (*Malus domestica* Borkh) foram eficientes na supressão de *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, com controle de até 65% (PUSEY; STOCKWELL; MAZZOLA, 2009).

Visando o controle da mancha aquosa com leveduras resultados promissores foram obtidos. A pulverização foliar da levedura *Pichia anomala*(Hansen) Kurtzman em folhas de meloeiro Hami (*Cucumis melo* L. var. *saccharinus* Naudin) foi efetiva na redução da incidência e da severidade da doença (WANG *et al.*, 2009). No Brasil, leveduras foram testadas para o controle da mancha aquosa em meloeiro em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, aplicadas via pulverização para proteção de plântulas, plantas e frutos e tratamento de sementes (MELO *et al.*, 2015). Dos 60 isolados testados, LMA1 [*Rhodotorula aurantiaca* (Saito) Lodder], CC-2 (*Pichia anomala* Hansen) e LMS [*Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison] foram os mais eficientes na proteção das plântulas. Dentre esses três isolados apenas LMA1 e CC-2 mantiveram a eficiência quando testados em plantas e sementes, com redução do índice de doença e área abaixo da curva de progresso da doença de até 58,6 e 47,2%, respectivamente. Adicionalmente também protegeram os frutos. Conceição *et al.* (2014) testaram o efeito combinado dos isolados LMA1, CC-2 e LMS com silício (Si), via aplicação foliar e incorporação ao solo, respectivamente, no controle da mancha aquosa em plântulas e plantas. Nenhum efeito aditivo ou sinérgico foi obtido das combinações, mas as leveduras mantiveram a eficiência no controle da doença, com destaque para LMA1 isoladamente ou com Si, que protegeu as plantas de meloeiro da infecção por *A. citrulli* por 29 dias. Os mecanismos envolvidos no controle da mancha aquosa por esses isolados de leveduras não foram bem elucidados, uma vez que *in vitro* nenhum dos isolados inibiu o crescimento bacteriano, produziu toxinas *killer*, ou mostrou competição por nutrientes com *A. citrulli* (MELO *et al.*, 2015), sugerindo existirem outros mecanismos envolvidos no biocontrole. Aumento da expressão de polifenol oxidase após a pulverização das plantas de meloeiro com LMA1 e Si, e aumento de ascorbato peroxidase com LMA1 + Si e LMA1, estão relacionados à indução de resistência a mancha aquosa (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014).

Sabe-se também que as condições do ambiente afetam diretamente o desenvolvimento desses microrganismos, portanto a adaptabilidade das leveduras a diferentes condições de crescimento, como temperatura, pH e salinidade e potencial osmótico, precisam ser determinadas para uma otimização da eficiência do biocontrole.

Em leveduras isoladas de uva foi verificada uma faixa ótima de crescimento em torno de 25 °C a 30 °C, com tolerância de até 35 °C e decaindo rapidamente até 40 °C; e o isolado L10 obteve maior tolerância ao baixo potencial osmótico do meio (ARAÚJO *et al.*, 2015). Assunção (2015) comprovou que mesmo alguns dos isolados de leveduras sendo fracos produtores de biofilme, ainda assim foram eficientes no controle da mancha-de-alternaria em couve manteiga.

Conhecer a capacidade das leveduras em colonizar seus hospedeiros é outro aspecto que pode ajudar a otimizar o biocontrole. Conceição *et al.* (2014) verificaram que a levedura LMA1 (*R. aurantiaca*) protegeu plantas de meloeiro contra a infecção por *A. citrulli* por 29 dias. No entanto, estudos não foram realizados para detectar a presença da leveduras nas folhas não tratadas.

#### **4. Extratos de plantas da Caatinga**

Atualmente o controle químico de doenças de plantas é feito através de vários tipos de produtos, incluindo os pesticidas, cujo grupo mais importante para o controle de doenças de plantas é o dos fungicidas e bactericidas, com propriedades químicas e biológicas muito variáveis, podendo envolver vários princípios de controle em função da natureza do produto, da época, da metodologia de aplicação e do estágio de desenvolvimento epidemiológico da doença (GHINI; KIMATI, 2000). Entretanto, o incremento nos custos, a perda da eficiência desses produtos ao longo dos anos e os problemas ambientais advindos destas práticas, apontam a necessidade da busca de alternativas para o controle de fitopatógenos, dentre as quais a busca por moléculas oriundas do metabolismo secundário de plantas, que apresentam atividade biológica contra fitopatógenos. Sua utilização no combate a doenças de plantas apresenta grande apelo econômico e, principalmente, ecológico (CASTRO, 2010).

Uma ampla diversidade de compostos orgânicos, produzidos pelas plantas, são chamados metabólitos secundários, e têm função ligada à ecologia da planta, isto é, sua relação com o meio ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2009). Princípios ativos presentes no extrato bruto de plantas, sintetizados no metabolismo secundário, apresentam ação biológica direta contra patógenos ou na indução de resistência de plantas, devido a características elicitoras (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2003).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides, e são utilizados na defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico, os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma)

ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) e os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores são terpenos; nicotina, cafeína e vincristina são alguns exemplos de alcaloides (ALVES, 2001; PERES, 2004).

Exclusivamente brasileira, a Caatinga, ocupa 60% do território da região Nordeste (GIL, 2002). É um ecossistema rico em recursos genéticos, com alta biodiversidade quando comparada a outras regiões semiáridas no mundo, apresentando uma variada cobertura vegetal, em grande parte determinada pelo clima, relevo e embasamento geológico. Sua flora nativa apresenta então características anatômicas, morfológicas e funcionais especializadas para a sobrevivência destas plantas a estas condições de clima e solo (DRUMOND *et al.*, 2000).

Como área promissora na investigação de novas biomoléculas com atividade biológica, a Caatinga vem se destacando devido às espécies vegetais estarem adaptadas às condições extremas de estresse ambiental, o que é bem característico das regiões semiáridas, com baixa pluviosidade, temperaturas elevadas e altas taxas de evapotranspiração e incidência de luz UV (CARRARA, 1996).

Mesmo sendo uma das áreas mais ameaçadas do mundo, há poucos estudos sobre o seu potencial biotecnológico (ARCOVERDE *et al.*, 2014). A expansão das ações voltadas para a bioprospecção de metabólitos secundários oriundos de plantas da Caatinga é extremamente importante, uma vez que as plantas tropicais têm sido fonte de materiais para a descoberta de novos medicamentos. Logo, se torna potencial na busca de novas alternativas para a agricultura (SOUZA; FELFILI, 2006; ARCOVERDE *et al.*, 2014).

Poucos estudos foram desenvolvidos com extratos da Caatinga no controle de fitobacterioses, incluindo a mancha aquosa, e todos *in vitro*. Extratos brutos das plantas *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul e *Aspidosperma pyrifolium* Mart. na concentração mínima bactericida de  $12,5\text{mg/mL}^{-1}$ , foram responsáveis pela morte de células bacterianas de *A. citrulli* (SILVA *et al.*, 2016). Malafaia *et al.* (2018) demonstraram o potencial biotecnológico de extratos de plantas da Caatinga como *Croton heliotropiifolius* Kunth, *Eugenia brejoensis* Mazine e *Libidibi. ferrea* (Mart. exTul.) L.P. que se mostraram eficazes em inibir o crescimento de *R. solanacearum*

Estudos *in vivo* são necessários para determinar a real eficácia de extratos no controle de doenças de plantas. Além da detecção da redução da severidade da doença através da determinação de componentes epidemiológicos, é importante a observação em nível histológico

do que ocorre qualitativamente e quantitativamente, ou seja, a reação das plantas aos tratamentos, em nível microscópico.

É comum a utilização de observações ultraestrutural, através da microscopia, para comparação de tratamentos em relação à colonização de um agente fitopatogênico (CHOUDHURY *et al.*, 2018). Análises de microscopia eletrônica da colonização de plantas de meloeiro por *A. citrulli* revelaram que entre 24 a 120 h após inoculação em folhas de meloeiro ‘Amarelo’ as células bacterianas apresentavam-se agregadas e predominantemente na face abaxial das folhas, distribuindo-se desde a base dos tricomas e na cavidade interna dos estômatos, a qual explica os sintomas de encharcamento inicial na planta, evidenciando a colonização epifítica (SILVA NETO *et al.*, 2006). Através dessa ferramenta Alves *et al.* (2010) comprovaram a capacidade de *A. citrulli* em colonizar os vasos do xilema das plantas afetadas. Portanto, a microscopia eletrônica também poderá ser utilizada para verificar se os extratos de plantas da Caatinga conseguem reduzir a colonização da bactéria, ou mesmo interferir na morfologia das folhas, como na abertura dos estômatos.

## 5. Biofilme

Antonie van Leeuwenhoekv descreveu pela primeira vez o biofilme no século XVII, mas até 1978 a teoria que descreveria o processo de formação deste não havia sido desenvolvida (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades de microrganismos tipicamente envoltos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (NIKOLAEV; PLAUKUNOV, 2007) e representam a forma de vida microbiana predominante no planeta (DONLAN; COSTERTON, 2002). O biofilme é geralmente constituído por até 95% de água, de 2 a 5% de células microbianas e de 3 a 6% de matriz e esta corresponde de 50 a 90% da massa seca total do biofilme (SUTHERLAND, 2001; MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014). A matriz é uma estrutura complexa produzida pelos próprios organismos constituintes, na qual as células do biofilme estão incorporadas, composta por uma variedade de substâncias poliméricas extracelulares (EPS – extracellular polymeric substances) como exopolissacarídeos, glicoproteínas e glicolípidos; proteínas e DNA extracelular (e-DNA) que formam a arquitetura tridimensional do biofilme e são responsáveis pela adesão às superfícies e pela coesão no biofilme (LARSEN *et al.*, 2007; MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014).

O Biofilme pode ser formado em superfícies bióticas, assim como em superfícies abióticas (HANCOCK; WITSØ; KLEMM, 2011; KOSTAKIOTI, HADJIFRANGISKOU, HULTGREN; 2013). A formação do biofilme ocorre devido a estímulos que podem ocasionar

a transição da bactéria de uma forma de vida livre (planctônica) para uma forma sésil (STOODLEY *et al.*, 1999). A formação de biofilme pode ainda ser modulada através de Quorum Sensing (QS), um mecanismo de sinalização célula-célula mediado pelo acúmulo de moléculas sinalizadoras produzidas pela célula (SUH *et al.*, 2010). São observadas quatro etapas para ocorrer a formação do biofilme, sendo elas a adesão, adesão irreversível, maturação e por último o desprendimento das células planctônicas (TRENTIN, GIORDANI, MACEDO, 2013).

No biofilme os microrganismos podem tolerar alta concentração de agentes antimicrobianos e uma variedade de condições adversas, quando comparada com sua forma planctônica (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Ito *et al.* (2009) demonstraram que bactérias em estágios mais avançados do biofilme (maduro) eram muito mais resistentes a antibióticos quando comparados as bactérias em outros estágios. Em *Pseudomonas aeruginosa*, já foi demonstrado que algumas células conhecidas como células dormentes, localizadas na região central do biofilme, são responsáveis por alguns casos de resistência devido a este fenótipo diferenciado (HOIBY *et al.*, 2010).

Dentre as espécies bacterianas fitopatogênicas formadoras de biofilme destacam-se *Acidovorax citrulli* (BAHAR; DE LA FUENTE; BURDMAN, 2010; MALAFAIA *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2015), *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow *et al.* (KOCZAN *et al.*, 2011), *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (MALAFAIA *et al.*, 2018), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Swings *et al.* (ZHANG *et al.*, 2013), *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (GUERRA, 2015) e entre outras. No Brasil, um estudo com *A. citrulli* classificou os isolados como fraco a fortemente produtores de biofilme em superfícies de poliestireno (MALAFAIA *et al.*, 2018). Em bactérias fitopatogênicas a formação de biofilme contribui para a virulência, através de vários mecanismos, uma vez que essa forma de vida torna o microrganismos tolerante a condições ambientais adversas, como falta de água e nutrientes, pH drástico e súbito, as variações e a competição interespecífica, além disso, especialmente, são mais resistentes às estratégias de defesa impostas pelo hospedeiro, como a produção de antimicrobianos (DOW *et al.* 2003; MURANAKA *et al.*, 2012).

Além das bactérias fitopatogênicas, leveduras agentes de biocontrole também podem produzir biofilmes, a exemplo das leveduras *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima*, e do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans* (NIKAWA *et al.*, 2003; PARAFATI *et al.*, 2015). Os biofilmes formados por essa espécie são constituídos por uma matrix extracelular composta de proteínas, polissacarídeos, células do hospedeiro e células das leveduras. O mecanismo de aderência e formação de biofilme envolve, entre outros, a

participação de adesinas e a secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases, proteases e hemolisinas (MUKHERJEE *et al.*, 2005). No entanto, não é uma condição determinante para eficiência no biocontrole a formação de biofilme (PARAFATI *et al.*, 2015). As leveduras LV 44 e LV 46 foram fracas produtoras de biofilme, e ainda assim foram eficientes no controle da mancha-de-alternaria em couve manteiga (ASSUNÇÃO, 2015).

A formação de biofilme pode ser detectada *in vivo*, sendo visualizada com o uso de corante cristal violeta (LI; WANG, 2014) e também pode ser detectada qualitativamente através de ensaio de formação de anel (película) na interface ar-líquido-vidro ou plástico, dependendo do material. Nesse caso, a adesão e desenvolvimento de biofilme ocorrem na parede do tubo, na região próxima à superfície do meio, podendo também ocorrer formação de película viscosa e rígida na superfície do meio de cultura, com produção de matriz exopolissacarídica (HERNANDES, *et al.*, 2013). A superfície sobre a qual o organismo tenta adaptar-se pode vir a exercer uma forte influência sobre sua adesão, e torna-se um fator decisivo na formação do biofilme (STEPANOVIC *et al.*, 2000).

Uma das estratégias eficientes no controle de doenças de plantas é impedir a formação do biofilme ou erradicá-lo (MALAFAIA, 2015). Sabe-se que a erradicação de biofilmes não chega aos 100%, uma vez que a matriz pode se regenerar e formar novo biofilme. Diante do exposto, pesquisas visando a interferência na formação do biofilme em superfícies, principalmente na superfície foliar (BUDZYŃSKA *et al.*, 2011).

Alguns estudos têm evidenciado a ação antibiofilme de extratos de plantas medicinais da Caatinga. Extratos aquosos de 20 plantas desse bioma impediram a formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* (TRENTIN *et al.*, 2011). Taninos purificados de plantas medicinais representam uma importante classe de compostos bioativos e impedem a formação de biofilme de *P. aeruginosa* por inibirem o crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) (TRENTIN *et al.*, 2013). Atividade antibiofilme de 22 extratos de plantas da Caatinga foi avaliada em relação a três isolados de *R. solanacearum* (MALAFAIA *et al.* 2018). Dentre os extratos utilizados *Harpochilus neesianus* Mart. ex Nees e *Myroxylon peruiferum* L. F. apresentaram atividade antibiofilme superior a 50% para todos os isolados.

Diante do exposto, esse estudo teve como objetivos: (a) determinar a adaptabilidade de leveduras selecionadas em estudos anteriores como eficientes no controle da mancha aquosa a diferentes condições ambientais (temperatura, pH, potencial osmótico e salinidade) e formação de biofilme; (b) acompanhar a dinâmica de colonização da levedura *R. aurantiaca* em tecidos de plantas de meloeiro; e c) selecionar extratos de plantas da caatinga com eficiência no controle da mancha aquosa, como estratégias no manejo da doença em meloeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, H. M. **A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos.** Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, v. 3, 2001. p. 10-15.

ALVES, A. O.; XAVIER, A. S.; VIANA, I. O.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Colonization dynamics of *Acidovorax citrulli* in melon. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 368-372, 2010.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Editora, Gazeta Santa cruz, 2018. 88 p. Disponível em:< <http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eoedicao>>. Acesso em julho de 2018.

ARCOVERDE, J. H.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P.; DIONÍZIO, B. P.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 28, n. 16, p. 1297-1301, 2014.

ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA-HANLIN, D. M. W.; DUARTE, V. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 191, 1999.

ARAÚJO, V. F. S.; CAMPOS, D. F. A cadeia logística do melão produzido no Agropolo Fruticultor Mossoró/Açu. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 505-529, 2011.

ARAÚJO, C.; ALVES, Í. L.; FREITAS, T.; CARVALHO, A. P.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; GAVA, C. A. T. **Efeito da temperatura e disponibilidade de água sobre leveduras aplicadas no controle de podridões pós-colheita em uva.** In: SIMPÓSIO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS E DESERTIFICAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, 4. 2015, Petrolina. **Anais...** Experiências e oportunidades para o desenvolvimento. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015. CD-ROM 1.

ASSUNÇÃO, E. F. **Leveduras como agentes protetores e indutores de resistência no manejo da mancha-de-alternaria em couve-manteiga.** 2015, 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

BAHAR, O.; KRITZMAN, G.; BURDMAN, S. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 1, p. 71-83, 2009.

BAHAR, O.; DE LA FUENTE, L.; BURDMAN, S. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 312, n. 1, p. 33-9, 2010.

BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VASCONCELOS, M. A. S. A. Cultura do melão: In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. (Org.). **Produção de hortaliça em ambiente protegido: condições subtropicais.** São Paulo: UNESP, 1998. p. 161-193.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.) **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas.** Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. (Coord.). **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília, DF: IICA: MAPA/SPA, 2007. 102 p. (Agronegócios; v. 7).

BUDZYŃSKA, A.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; KALEMBA, B. D.; RÓALSKA, B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 60, n. 1, p. 35-41, 2011.

CABI, 2015. *Acidovorax citrulli* (fruit blotch). Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/2676#tab1nav>>. Acesso em: 27 Out. 2015.

CARRARA, Â. A. O “sertão” no espaço econômico da mineração, LPH. **Revista de História da Universidade Federal de Sergipe**, Sergipe, v. 1, n. 6, p. 40-48, 1996.

CARVALHO, F. C. Q.; SANTOS, L. A.; DIAS, R. C. S.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. 2012. Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. **Euphytica**, Wageningen, v. 190, n. 2, p. 169-180, 2013.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Antifungal activity of the essential oils from *Eucalyptus globulus* L. on *Candida* spp. **Revista de Odontologia UNESP**, Araraquara, v. 3, n. 39, p. 179-184, 2010.

CAVALCANTI, M. T.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, L. R. M.; VIANA, I. O. Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1313-1318, 2005.

CHOUDHURY, S.; HU, H.; LARKIN, P.; MEINKE, H.; SHABALA, S.; AHMED, I.; ZHOU, M. Agronomical, biochemical and histological response of resistant and susceptible wheat and barley under BYDV stress. **PeerJ**, London, 6:e4833. DOI 10.7717/peerj.4833, 2018.

CONCEIÇÃO, C. S.; FELIX, K. C. S.; MARIANO, R. L.; MEDEIROS, E. V.; SOUZA, E. B. Combined effect of yeast and silicon on the control of bacterial fruit blotch in melon. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 174, n. 3, p. 164-170, 2014.

CONCEIÇÃO, C. S.; ASSUNÇÃO, E. F.; REZENDE, J. S.; MORAIS, R. F.; SILVA, A. M. F.; GAMA, M. A. S.; SOUZA, E. B. Ocorrência de mancha aquosa em melancia e meloeiro no estado do Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50. 2017. Uberlândia. **Anais...** Viçosa: SBF, 2017.

COSTERTON; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infectious. **Science**, London, v. 284, n. 5418 p. 1318-1322, 1999.

CUNTY, A.; AUDUSSEAU, C.; PAILLARD, S.; OLIVIER, V.; FRANÇOIS, RIVOAL, C.; POLIAKOFF, F. First report of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch, on melon (*Cucumis melo*) in Guadeloupe (France). **Plant Disease**, Saint Paul, 2018.

DIAS, R. C. S.; COSTA, N. D.; SILVA, P. C. G.; QUEIRÓZ, M. A.; ZUZA, F.; LEITE, L. A. S.; PESSOA, P. F. A.; TARAO, D. A. Cadeia produtiva do melão no Nordeste. In: CASTRO, A. M. G.; LIMA, S. M. V.; GOEDERT, W. J.; FREITAS FILHO, A.;

- VASCONCELOS, J. R. P. **Cadeias produtivas e sistemas naturais: prospecção tecnológica** (Eds.). Brasília EMBRAPA-SPI., 1998. p. 440-493.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, p.167-193, 2002.
- DOW, J. M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; TANG, J. L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Washington, v. 100, n. 19, p. 10995-11000, 2003.
- DRUMOND, M. A. et al. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In: **Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga**. Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina, 2000.
- DUTTA, B.; SCHNEIDER, R. W.; ROBERTSON, C. L.; WALCOTT, R. R. Embryo localization enhances the survival of *Acidovorax citrulli* in watermelon seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 0, n. 1, 2016.
- DRUVEFORS, U.; N. JONSSON, N.; BOYSEN, M. E.; SCHNURER, J. Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* Yeast during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. **FEMS Yeast Res**, France, v. 44, n. 6, p. 389-394, 2002.
- EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Acidovorax citrulli: Bacterial fruit blotch of cucurbits**, 2010. Disponível em: [http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert\\_List/bacteria/Acidovorax\\_citrulli.html](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Acidovorax_citrulli.html)>. Acesso em: 01 Fev. 2013.
- EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Acidovorax citrulli: Bacterial fruit blotch of cucurbits**, 2015. Disponível em:<[http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert\\_List/bacteria/Acidovorax\\_citrulli.html](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Acidovorax_citrulli.html)>. Acesso em: 20 Jan. 2016.
- FERNANDES, O. A.; FERREIRA, C. C.; MONTAGNA, M. A. **Manejo integrado de pragas de meloeiro**: manual de reconhecimento das pragas e táticas de controle. Jaboticabal: Funep-CNPq, 2000. 28p.
- FRANÇA, G. S.; CARVALHO, R. R.; NEVES, R. P.; ARAUJO, E. R.; LARANJEIRA, D. Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 2, p. 451-459, 2015.
- FRAVEL, D. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n.1, p. 337-359, 2005.
- GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4ª ed. São Paulo: Atlas, 2002.
- GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 108-111, 2005.

GUERRA, M. L. **Formação de biofilme e proteômica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2015, 59 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 81p.

HAISSAM, J.M. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 93-105, 2011.

HANCOCK, V.; WITSØ, I. L.; KLEMM, P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 301, n. 7, p. 570-576, 2011.

HARLAN, J. R.; WET, J. M. J.; STERMLER, A. B. L. Origen of Africa plant domestication. In: DAMANIA, A. B.; VALKOUN, A. J.; WILLCOX, G.; QUALSET, C. (Eds.). **The origen of agriculture and crop domestication**, Syria: ICARDA, IPGRI, FAO e UC/GRCP, 1997, p. 5-10.

HERNANDES, R. T.; DE LA CRUZ, M. A.; YAMAMOTO, D.; GIRÓN, J. A.; GOMES, T. A. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, Washington v. 81, n. 10, p. 3793-3802, 2013.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiology**. London, v. 5, n. 11 p. 1663-1674, 2010.

HOPKINS, D. L. Field spread of bacterial fruit blotch of watermelon. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 4, p. 466, 1993.

HOPKINS, D. L. Spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 7, p. 755, 1994.

HORUZ S.; CETINKAYA-YILDIZ R.; MIRIK M.; AYSAN Y. Occurrence, isolation, and identification of *Acidovorax citrulli* from Melon in Turkey. **Plant Protection Science**, República Tcheca, v. 50, p. 179-183, 2014.

ISAKEIT, T. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 694-700, 1997.

ISAKEIT, T. Bacterial fruit blotch in watermelon. **The Agricultural Extension Service-USA**, Texas, 1999.

ITO, A.; TANIUCHI, A.; MAY, T.; KAWATA, K.; OKABE, S. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 12, p. 4093-4100, 2009.

KOCZAN, J. M.; LENNEMAN, B. R.; MCGRATH, M. J.; SUNDIN, G. W. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia*

*amylovora*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 9, p. 7031-39, 2011

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the post antibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Washington, v. 3, n. 4, p. a01306, 2013.

KUMAGAI, L. B.; WOODS, P. W.; WALCOTT, R.; MOUA, X. First report of bacterial fruit blotch on melon caused by *Acidovorax citrulli* in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 10, p. 1423, 2014.

LARSEN, P.; NIELSEN, J. L.; DUEHOLM, M. S.; WETZEL, R.; OTZEN, D.; NIELSEN, P. H. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 3077-3090, 2007.

LASSOIS, L.; De BELLAIRE, L.; JIJAKLI, M. H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 410-418, 2008.

LI, J.; WANG, N. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 2, p. 134-142, 2014.

MARTÍNEZ, L. C.; VADYVALOO, V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Louisville, v. 4, n. 38, p. 15, 2014.

MALAFAIA, C. B.; GUERRA, M. L.; SILVA, T. D.; PAIVA, P. M. G.; SOUZA, E. B.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Selection of a protein solubilization method suitable for phytopathogenic bacteria: a proteomics approach. **Proteome Science**, Califórnia, v. 13, p. 1-7, 2015.

MALAFAIA, C. B.; JARDELINO, A. C. S.; SILVA, A. G.; SOUZA, E. B.; MACEDO, A. J.; CORREIAL, M. T. S.; SILVA, M. V. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. **Microbial Ecology**. New York, v. 75, n. 3, p. 555-561, 2018.

MALAFAIA, C. B.; BARROS, M. P.; MACEDO, A. J.; GUERRA, M. L.; SOUZA, E. B.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Biofilm Formation by Phytopathogenic Bacteria *Acidovorax citrulli* and *Ralstonia solanacearum*, **Journal of Environmental Analysis and Progress**, Recife, v. 3, n. 4, p. 347-355, 2018.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Mancha-aquosa: importante bacteriose do meloeiro no brasil. **Anais**. Recife, v. 1, p.79-88, 2004.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Melões indefesos. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, v. 7, p. 08-10, 2007.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R.; DONATO, V. M. T. Importância de bactérias promotoras de

crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MEDEIROS, F. H. V.; MORAES, I. S. F.; SILVA NETO, E. B.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 37, p. 453-460, 2009.

MELLO, M. R. F.; SILVEIRA, E. B.; VIANA, I. O.; GUERRA, M. L., MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 78-83, 2011.

MELO, R. A. G.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B. Controle biológico da podridão mole do pimentão (*Capsicum annuum*) causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n.3/4, p. 206-212, 1995.

MELO, E. A.; MARIANO, R. L. R.; LARANJEIRA, D.; SANTOS, L. A.; GUSMÃO, L. O.; SOUZA, E. B. Efficacy of Yeast in the Biocontrol of Bacterial Fruit Blotch in Melon Plants. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 56-64, 2015.

MORANDI, M. A.; BETTIOL, W.; PAULA JÚNIOR, T. J. Controle biológico de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A. (Eds.). **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, 2014, p. 175-234.

MOURA, M. C. F.; SILVA, S. G. A.; OLIVEIRA, L. C. S.; SANTOS, E. C. Atividades impactantes da cadeia produtiva do melão no agropólo Mossoró/Assú-N. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Campina Grande, v. 7, n 3, p. 09-14, 2011.

MURANAKA, L. S.; TAKITA, M. A.; OLIVATO, J. C.; KISHI, L. T.; DE SOUZA, A. A. Global expression profile of biofilm resistance to antimicrobial compounds in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* reveals evidence of persister cells. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 194, n. 17, p. 4561-4569, 2012.

MUKHERJEE, P. K.; ZHOU, G.; MUNYON, R.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. **Medical Mycology**. Oxford, v. 43, n. 3, p. 191-208, 2005.

NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S.; NISHIMURA, M.; EGUSA, H.; FURUKAWA, M.; SETIJATO, D. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses**. Berlin, v. 46, p. 471-478, 2003.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm-“City of microbes” or an analogue of multicellular organism. **Microbiology**, New York, v. 76, n. 2, p. 125-138, 2007.

OLIVEIRA, A.; SANTOS, M. H. M.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 373-377, 2006.

O'BRIEN, R. G.; MARTIN, A. L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 39, n. 4, p. 479-485, 1999.

- PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, London, v. 47, n. 1, p. 85-92, 2015.
- PAULA, J. A. A.; CARDOSO, E. A.; SOUSA, R. P.; ASSIS, J. P. Análise agronômica e econômica do cultivo de melão (*Cucumis melo* L.) conduzido na região semiárida do Nordeste brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.14, n. 26, p.44-52, 2017.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário. Piracicaba** – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004. p. 1-10.
- POPOVIĆ, T.; IVANOVIĆ, Ž. Occurrence of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon in Serbia. **Plant disease**, Saint Paul, v. 99, n. 6, p. 886, 2015.
- PUSEY, P. L.; STOCKWELL, V. O.; MAZZOLA, M. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 571-581, 2009.
- SALES JÚNIOR, R.; MENEZES, J. B. **Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN**. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró. Relatório Técnico. Rio Grande do Norte, 2001.
- SALES JÚNIOR, R.; PONTES FILHO, F. S. T.; NUNES, G. H. S.; TORRES, G. R. C. Eficiência de Acibenzolar-S-Methyl e Oxicloreto de Cobre no Controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Agente Causal da “Mancha-Aquosa” no Meloeiro. **Revista Biologia e Ciência da Terra**, Paraíba, v.7, n. 1, p. 66-71, 2007.
- SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza. EMBRAPA-SPI. 2000.
- SANTOS, F. J. DE S. **Irrigação do melão: manejo através do tanque classe “A”**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 7 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 11).
- SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.
- SCHAAD, N. W.; SOWELL, G.; GOTH, R. W.; COLWELL, R. R.; WEBB, R. E. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v. 28, p.117-125, 1978.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 554-556, 2003.
- SHALABY, M. E. S.; EL-NADY, M. F. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. **Acta Biologica**. Szegediensis, v. 52, n. 2, p. 271-275, 2008.

- SILVA, M. S.; CARVALHO, F. C. Q.; SILVA, J. R.; LINS, S. R. O.; OLIVEIRA, S. M. A. Uso de antagonistas e produtos alternativos no manejo pós-colheita de podridão mole em pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 4, p. 718-725, 2014.
- SILVA NETO, E. B.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; SANTOS, L. A. Penetração e Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Folhas, Frutos e Sementes de Melão Amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 84-88 2006.
- SILVA, K. M. M.; XAVIER, A. S.; GAMA, M. A. S.; LIMA, N. B.; LYRA, M. C. C. P.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Polyhasic analysis of *Acidovorax citrulli* from Northeastern Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 73, n. 3, p. 252-259, 2016.
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. **Acta Botânica Brasileira**, 2006. v. 20, p. 135-145.
- SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiology**, Cambridge, v. 9, p. 222-227, 2001.
- SUH, J. D.; RAMAKRISHNAN, V.; PALMER, J. N. Biofilms. **Otolaryngologic Clinics of North America**, Philadelphia, v. 43, n. 3, p. 521-530, 2010.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 175-79, 2000.
- STOODLEY, P.; DODDS, I.; BOYLE, J. D.; LAPPINSCOTT, H. M. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 85, p. 19-28, 1999.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- TRENTIN, L. Origine e botânica del melone. **Supplemento a l'Informatore Agrario**, Sicília, n. 3, p. 5-6, 1998.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T.; BAUMVOL, L. J.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 137, p. 327-335, 2011a.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- TIAN, Y.; ZHAO, Y.; WU, X.; LIU, F.; HU, B.; WALCOTT, R. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. **Molecular Plant Pathology**, Saint Paul, v. 16, n. 1, p. 38-47, 2015.
- UENO, B.; COUTO, M. E. O.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha-aquosa em melão no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 246, 2003.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatogenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 1991. p. 41-56, 2000.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; LOPES, C. A. **Surto da mancha-aquosa em frutos de melão nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte: recomendações preliminares de controle**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 4p. (Comunicado Técnico, 50).

WALCOTT, R. R.; LANGSTON, D.; GITAITIS, R. D.; GAY, D.; HOPKINS, D. L.; KUCHAREK, T. A.; LATIN, R.; EGGEL, D.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P.; LOVIC, B. (2001) Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease.

WANG, X.; Li, G.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. **Biological Control**, Montreal, v.50, p. 164-171, 2009.

ZHANG, Y.; WEI, C.; JIANG, W.; WANG, L.; LI, C.; WANG, Y.; DOW, J. M.; SUN, W. The HD-GYP domain protein *RpfG* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice. **PLOS ONE**, Califórnia, v. 8, n. 3, p. a59428, 2013.

## Capítulo II

---

### **Adaptabilidade de leveduras e colonização de *Rhodotorula aurantiaca* em tecidos de meloeiro**

1 **Adaptabilidade de Leveduras e Colonização de *Rhodotorula aurantiaca***  
2 **em Tecidos de Meloeiro**

3 **Claudeana S. da Conceição<sup>1</sup>; Emanuel F. Assunção<sup>1</sup>; André da S. Xavier<sup>2</sup>; Rosa de**  
4 **L. R. Mariano<sup>1</sup>; Marco Aurélio S. da Gama<sup>1</sup>; Newton Portilho Carneiro<sup>3</sup>; Elineide**  
5 **B. de Souza<sup>4</sup>**

6 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900  
7 Recife, PE, Brasil; <sup>2</sup>NUDEMAFI – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo,  
8 295000-000 Alegre, ES, Brasil, <sup>3</sup>Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa Milho e Sorgo,  
9 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil, <sup>4</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal  
10 Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil

11

12 **Resumo**

13 As leveduras *Rhodotorula aurantiaca* (LMA1), *R. glutinis* (LMS) e *Pichia*  
14 *anomola* (CC-2) são promissores agentes de controle da mancha aquosa do meloeiro em  
15 diferentes estádios de desenvolvimento da planta. No entanto, a otimização da eficiência  
16 no biocontrole depende de conhecimentos ecológicos e epidemiológicos sobre essas  
17 leveduras. Esse estudo teve como objetivos determinar a adaptabilidade das leveduras em  
18 relação ao crescimento sob diferentes condições ambientais de temperatura, pH,  
19 salinidade e potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), bem como a formação de biofilme. A dinâmica da  
20 colonização da levedura *R. aurantiaca* (LMA1) nos tecidos de plantas de meloeiro  
21 também foi investigada. As leveduras apresentaram comportamento mesófilo, com  
22 melhor crescimento entre 27 e 30 °C e rápido decréscimo a partir de 35 °C, porém  
23 diferiram significativamente em relação a temperatura ótima de crescimento. Com  
24 relação ao pH, todas apresentaram um melhor crescimento nos pHs 8 e 9. O nível de  
25 salinidade no meio de cultura influenciou significativamente no crescimento dos isolados,  
26 que reduziu com a elevação dos níveis de salinidade, mas ainda apresentaram um  
27 crescimento expressivo na concentração de 12% de NaCl, com maior tolerância do  
28 isolado LMA1. O maior crescimento das leveduras ocorreu no  $\Psi_s$  mais elevado (-1 Mpa),  
29 com redução desse crescimento com a diminuição do  $\Psi_s$ , sendo CC-2 o isolado mais  
30 sensível. O isolado CC-2 foi considerado moderado produtor de biofilme e LMA1 e LMS,  
31 fortes produtores. No estudo de colonização foram utilizados dois transformantes de  
32 LMA1 resistentes a higromicina B (Lt2 e Lt14). A partir da inoculação nas sementes, a

33 levedura colonizou raízes, hipocótilo, cotilédones, folhas e ramos, e quando inoculada no  
34 1º par de folhas, foi detectada no 6º par de folhas verdadeiras, com populações de  $6,0 \times$   
35  $10^2$  UFC  $g^{-1}$  (Lt2) e  $5,0 \times 10^2$  UFC  $g^{-1}$  (Lt14) de folha. As informações obtidas são  
36 importantes tanto para a formulação quanto ao uso das leveduras no campo, visando o  
37 manejo eficiente da mancha aquosa do meloeiro.

38

39 **Palavras-chave:** *Acidovorax citrulli*, Biocontrole, Biotecnologia, Ecologia, Fitness

40

## 41 **Introdução**

42 O melão (*Cucumis melo* L.) está entre as olerícolas de destaque nacional, e mesmo o  
43 Brasil não sendo um grande produtor mundial foi classificado entre os 10 principais  
44 exportadores do fruto (1). No período chuvoso, várias doenças prejudicam a cultura, e  
45 dentre estas, destaca-se a mancha aquosa, causada pela bactéria *Acidovorax citrulli* (2).

46 A primeira ocorrência da mancha aquosa em meloeiro foi nos Estados Unidos em  
47 1996, com incidência em mais de 50% dos frutos em campos agrícolas no Texas (3).  
48 Atualmente a doença pode ser encontrada nos seguintes continentes e países: América  
49 (Brasil, Costa Rica, Trinidad e Tobago, Estados Unidos); Ásia (China, Japão, Coreia,  
50 Taiwan e Tailândia); Europa (Grécia e Hungria) e Oceania (Austrália, Guame e Ilhas  
51 Marianas do Norte) (4). Na Hungria se encontra em processo de erradicação.  
52 Recentemente, foi detectada em Guadeloupe (França) (5). Devido a recentes relatos, a  
53 mancha aquosa permanece na lista de alerta A1 da EPPO, a qual relaciona as doenças de  
54 grande impacto econômico mundial (6). *A. citrulli* foi relatada como uma séria ameaça  
55 para cucurbitáceas, em particular, meloeiro e melanciaira (*Citrullus lanatus* L.) (4). Os  
56 sintomas da doença nos frutos, caracterizados como mancha aquosas-necróticas na casca  
57 e podridão na polpa, afetam diretamente a sua comercialização (7, 8 WECHTER et al.,  
58 2011). Apesar de várias medidas serem indicadas no manejo da doença, a exemplo do uso  
59 de sementes certificadas, utilização de produtos cúpricos e de acibenzolar-S-metil (9, 10),  
60 novas epidemias da mancha aquosa ainda vêm sendo assinalada em todo mundo (4), o  
61 que indica a necessidade de inclusão de novas alternativas no manejo da doença.

62 Leveduras foram avaliadas quanto ao potencial de biocontrole da mancha aquosa  
63 em meloeiro, e resultados promissores foram obtidos. A pulverização foliar da levedura  
64 *Pichia anomala* em folhas de melão Hami (*Cucumis melo* var. *saccharinus* Naudin) foi  
65 efetiva na redução da incidência e da severidade da doença (11). No Brasil, visando o

66 controle da doença, leveduras foram testadas em meloeiro nos diferentes estádios de  
67 desenvolvimento da planta, aplicadas via pulverização para proteção de plântulas, plantas  
68 e frutos e tratamento de sementes (12). Dos 60 isolados testados, LMA1 (*Rhodotorula*  
69 *aurantiaca* (Saito) Lodder), CC-2 (*Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman) e LMS  
70 (*Rhodotorula glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison) foram os mais eficientes na proteção das  
71 plântulas. Quando testadas em plantas as leveduras mantiveram a eficiência, com redução  
72 da doença em níveis superiores a 47%. Adicionalmente LMA1 e LMS também  
73 protegeram os frutos. A eficiência dessas três leveduras (LMA1, CC-2 e LMS) também  
74 foi testada em combinação com silício (Si), via aplicação foliar e incorporação ao solo,  
75 respectivamente, no controle da mancha aquosa em plântulas e plantas. Nenhum efeito  
76 aditivo ou sinérgico foi obtido das combinações, mas as leveduras mantiveram a  
77 eficiência no controle da doença, com redução de até 80% na severidade da doença (13).  
78 Os mecanismos envolvidos no controle da mancha aquosa por esses isolados de leveduras  
79 não foram bem elucidados, uma vez que *in vitro* nenhum inibiu o crescimento bacteriano,  
80 produziu toxinas killer, ou mostrou competição por nutrientes com *A. citrulli* (12),  
81 sugerindo haver outros mecanismos envolvidos no biocontrole.

82 Segundo a literatura, leveduras também podem formar biofilme. No entanto, não  
83 é uma condição determinante para eficiência no biocontrole (14). Como exemplo, as  
84 leveduras LV 44 e LV 46 foram fracas produtoras de biofilme, e ainda assim foram  
85 eficientes no controle da mancha de alternaria em couve manteiga (15).

86 As condições do ambiente afetam diretamente o desenvolvimento de agentes de  
87 biocontrole, portanto a adaptabilidade das leveduras sob a influência da temperatura, pH,  
88 potencial osmótico e salinidade precisam ser determinadas para uma otimização da  
89 eficiência do biocontrole. A seleção natural é uma força que age na evolução dos  
90 organismos devido a quantidade de descendentes capazes de sobreviver. Esta  
91 sobrevivência não é aleatória, sendo muitas vezes dependente da adaptabilidade  
92 ("fitness") dos indivíduos (16). A capacidade competitiva de um microrganismo pode ser  
93 inferida indiretamente por componentes da adaptabilidade (17).

94 Conhecer a capacidade das leveduras em colonizar seus hospedeiros é outro  
95 aspecto que pode ajudar a otimizar o biocontrole. Conceição et al. (13) verificaram que a  
96 levedura LMA1 (*R. aurantiaca*) protegeu plantas de meloeiro contra a infecção por *A.*  
97 *citrulli* por 29 dias. No entanto, estudos não foram realizados para detectar a presença da  
98 levedura nas folhas não tratadas.

99 Diante do exposto, esse estudo teve como objetivos determinar a adaptabilidade  
100 de leveduras *R. aurantiaca* (LMA1), *P. anomala* (CC-2) e *R. glutinis* (LMS) a diferentes  
101 condições ambientais (temperatura, pH, potencial osmótico e salinidade) e formação de  
102 biofilme, e acompanhar a dinâmica de colonização da levedura *R. aurantiaca* em tecidos  
103 de plantas de meloeiro. Os resultados obtidos serão importantes para o desenvolvimento  
104 de produto biológico para o controle da mancha aquosa do meloeiro.

105

## 106 **Material e Métodos**

107

### 108 **Leveduras**

109 As leveduras *R. aurantiaca* (LMA1), *R. glutinis* (LMS) e *P. anomala* (CC-2), obtidas de  
110 frutos ou folhas de meloeiro, foram utilizadas nos estudos. Elas pertencentes à Coleção  
111 de Culturas Rosa Mariano, do Laboratório de Fitobacteriologia (LMA1 e LMS) e a  
112 Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos (CC-2) da UFRPE. Essas  
113 leveduras foram eficientes no controle da mancha aquosa em diferentes estádios de  
114 desenvolvimento da planta (sementes, plântulas e planta) (12,13). As leveduras foram  
115 cultivadas em meio de cultura Sabouraud-dextrose-ágar (SDA-40 g dextrose; 10 g  
116 neopeptona e 17 g ágar L<sup>-1</sup>) suplementado com extrato de levedura (1,5 g L<sup>-1</sup>) e  
117 cloranfenicol (50 mg L<sup>-1</sup>) a 28 ± 2°C durante 48 h, e as suspensões ajustadas para 1,5 x  
118 10<sup>7</sup>cels mL<sup>-1</sup>, usando a câmara de Neubauer.

### 119 **Testes de Adaptabilidade das Leveduras**

#### 120 **Efeito da Temperatura no Crescimento das Leveduras**

121 Após ajuste das concentrações (1,5 x 10<sup>7</sup>cels mL<sup>-1</sup>) foram depositadas alíquotas de 0,5 mL  
122 das suspensões de leveduras em tubos de ensaio contendo 4,5 mL do meio SD (Sabouraud  
123 dextrose) esterilizado e mantidos em estufa tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand)  
124 a temperaturas variando de 20 °C a 45 °C, com intervalos de 5°C, além da temperatura a  
125 28 °C.

126

#### 127 **Efeito do pH no Crescimento das Leveduras**

128 Alíquotas de 0,5 mL das suspensões de leveduras foram depositadas em tubos de ensaio  
129 contendo 4,5 mL do meio SD esterilizado e com pH variando de 2-10, com intervalos de  
130 1, sendo os níveis de pH ajustados com <sup>+</sup>HCl ou KOH<sup>-</sup> a 1 M. Os tubos foram mantidos  
131 em estufa tipo B.O.D., com suas respectivas temperaturas ótimas.

132

**133 Efeito da Salinidade no Crescimento das Leveduras**

134 O meio de cultura SD foi alterado com a suplementação de diferentes concentrações de  
135 NaCl (0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% e  
136 22%). Alíquotas de 0,5 mL das suspensões de leveduras foram depositadas em tubos de  
137 ensaio contendo 4,5 mL do meio SD suplementado com NaCl e esterilizado. Os tubos  
138 foram mantidos em estufa tipo B.O.D. com suas respectivas temperaturas ótimas. Tubos  
139 de ensaio com SD sem adição de NaCl foram utilizados como controles. Os testes de  
140 temperatura, pH e concentração de sal foram adaptados dos protocolos de Faheem et al.  
141 (18).

142

**143 Efeito do Potencial Osmótico ( $\Psi$ s) no Crescimento das Leveduras**

144 Tubos com água deionizada esterilizada foram suplementados com CaCl para obter os  
145 valores de potencial osmótico ( $\Psi$ s) de -1.0, -2.0, -3.0, -4.0 e -5.0 Mpa (19). Alíquotas de  
146 0,5 mL das suspensões de leveduras foram depositadas nos tubos de ensaio, que foram  
147 incubados em estufa tipo B.O.D. com as temperaturas ótimas de cada isolado. Tubos de  
148 ensaio com SD sem adição de CaCl foram utilizados como controle.

149 Em todos os testes de adaptabilidade o delineamento experimental foi  
150 inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por um  
151 tubo de ensaio, e pela combinação isolado x temperatura, pH, concentração de sal ou  
152 pressão osmótica. Após 48 h de incubação, o crescimento das leveduras nas diferentes  
153 condições foi mensurado em espectrofotômetro modelo 500 M (Analyser), lendo-se a  
154 densidade óptica (D.O.) ( $A_{570}$ ) das suspensões.

155

**156 Formação de Biofilme por Leveduras**

157 Em placas de 96 poços da marca Costar 3599 (CorningInc., USA), foram adicionados 180  
158  $\mu$ L de meio de cultura SD e 20  $\mu$ L da suspensão ( $1,5 \times 10^7$  cels  $\text{mL}^{-1}$ ) das leveduras, sendo  
159 a mistura homogeneizada.. O controle foi apenas o meio de cultura sem os isolados. As  
160 placas foram lacradas com papel filme e incubadas em B.O.D. durante 48 h a 30 °C. Após  
161 este período, foi retirado o conteúdo líquido dos poços com auxílio da pipeta multicanal  
162 de 200  $\mu$ L; as placas foram lavadas duas vezes com NaCl 0,85% e colocadas para secar  
163 em estufa de secagem durante 30 min a 60 °C. Em seguida, em cada poço da placa foram  
164 adicionados 200  $\mu$ L de solução cristal violeta, permanecendo neste estágio durante 15  
165 min. Após a retirada da solução as placas foram lavadas abundantemente com água de

166 torneira até sair toda coloração violeta/azul da placa. Para a retirada do excesso de água  
167 as placas foram fortemente batidas sobre papel toalha. Para leitura foi utilizado 200 µL  
168 de álcool etílico 96% que foram depositados em cada poço da placa e lida em um leitor  
169 de placa de Elisa (Synergy H1 Microplate Reader, Biotek, USA) a uma absorvância de  
170 600 nm. O experimento teve 6 repetições, sendo cada repetição constituída por um poço  
171 na placa, e foi repetido duas vezes para confiabilidade dos resultados.

172 Os dados obtidos pelo leitor de placa de Elisa, foram analisados de acordo com  
173 Stepanovic al. (20), onde D.O.<D.O.c – isolado não produtor de biofilme;  
174 O.D.c<O.D.<2O.D.c – isolado fraco produtor; 2D.O.c<D.O.<4D.O.c – isolado moderado  
175 produtor e 4D.O.c<D.O. – isolado forte produtor, sendo D.O. a densidade óptica do  
176 isolado e D.O.c. a densidade do controle.

177

### 178 **Colonização de Plantas de Meloeiro por *Rhodotorula aurantiaca***

### 179 **Transformação de *E. coli* Mach1T1R e *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 com o** 180 **Plasmídeo pRH2034**

181 Para a seleção de transformantes, foi utilizada a estirpe AGL-1 de *A. tumefaciens*  
182 desarmada. Esta estirpe foi mantida e crescida em meio LB (10 g tripton; 10 g NaCl; 5  
183 g extrato de levedura; 15 g ágar L<sup>-1</sup>) à 28 °C e na presença do antibiótico rifampicina (50  
184 µg mL<sup>-1</sup>). A bactéria está sendo estocada em criotubo contendo 50% de solução de  
185 glicerol e mantida à -80 °C em ultra freezer. O plasmídeo pRH2034 utilizado na  
186 transformação trata-se de um vetor binário, cujo T-DNA contém uma parte da região  
187 promotora do gene *gpd1* (Rtgpd1) (com 795 pb), utilizada para promover a expressão de  
188 dois genes, com suas regiões codificadoras otimizadas para o conteúdo GC da levedura  
189 *Rhodosporidium toruloides* (21), espécie relacionada a levedura LMA1 (*R. aurantiaca*)  
190 que foi utilizada no estudo. Estes genes codificam a proteína verde fluorescente *gfp*  
191 (RtGFP) e o gene *hpt-3*, que confere a resistência ao antibiótico higromicina B. O  
192 plasmídeo pRH2034 contém também um gene de resistência aos antibióticos  
193 estreptomicina/espectinomicina para seleção em *Escherichia coli* (30 µg mL<sup>-1</sup> e 100 µg  
194 mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para evitar mutantes espontâneos) e na estirpe de *A. tumefaciens*  
195 AGL-1 a 80 µg mL<sup>-1</sup>, sendo utilizado somente o antibiótico espectiniomicina.

196 Para a transformação, o plasmídeo pRH2034 liofilizado foi inserido e  
197 transformado em *E. coli* Mach1T1R via choque térmico e em seguida, a cultura foi  
198 preservada em ultrafreezer -80°C. Células eletrocompetentes de *A.tumefaciens* AGL-1  
199 foram preparadas e o DNA plasmidial do pRH2034 foi inserido nas células através do

200 método de eletroporação. As colônias de *A. tumefaciens* AGL-1 contendo o pRH2034  
201 foram preservadas em ultrafreezer -80 °C. Colônias resistentes à higromicina B foram  
202 inoculadas em caldo nutritivo e cultivadas durante várias horas. A PCR foi realizada em  
203 um termociclador por 35 ciclos usando 1 µL das culturas como modelos e os *primers*  
204 HptRU/HptRSL2 como iniciadores. Fez-se necessário também avaliar a concentração  
205 mínima inibitório do agente de seleção (higromicina B) para o crescimento de *R.*  
206 *aurantiaca*.

207

### 208 **Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (CMI) do Agente Seletivo (higromicina** 209 **B)**

210 Para determinar a concentração mínima inibitória do agente seletivo, a levedura  
211 basidiomicota *R. aurantiaca* LMA1 foi cultivada em meio Batata-dextrose-ágar (BDA-  
212 200g batata, 20 g dextrose; 17 g ágar L<sup>-1</sup>) nas faixas de concentração de 0; 10; 20; 30; 40;  
213 50; 60; 70; 80; 90; 100 à 125 µg mL<sup>-1</sup> do antibiótico higromicina B (Sigma-Aldrich  
214 H7772-1G). As placas foram incubadas à 28°C por 7 dias.

215

### 216 **Transformação da Levedura Basidiomicota *Rhodotorula aurantiaca* LMA1** 217 **Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1**

218 A transformação foi baseada em protocolos já descritos (21-23). Na seleção de  
219 transformantes foi utilizada a concentração de 60 µg mL<sup>-1</sup> de higromicina B, devido aos  
220 riscos vinculados a presença de falso-positivos em concentrações menores, comum para  
221 algumas espécies de basidiomicotas leveduriformes. As culturas de *A. tumefaciens* AGL-  
222 1 carregando o plasmídeo pRH 2034 foram ativadas a 28 °C a 200 rpm por 2 dias em 10  
223 mL de meio LB contendo 60 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicina e 80 µg mL<sup>-1</sup> de espectinomicinae  
224 e, em seguida, centrifugadas a 4000 xg por 5 min. Posteriormente, as células foram  
225 lavadas em solução salina 0.85% e, após nova centrifugação, ressuspensas em 10 mL de  
226 meio IM (meio de indução) [sais MM 1X; 40 mM ácido 2 - (N-morfolino)  
227 etanossulfônico (MES), pH 5,3; 10 mM glicose; 0,5% (m/v) de glicerol], adicionado de  
228 200 µM acetoseringona (AS) Bundock et al. (22), 60 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicina e 80 µg mL<sup>-1</sup>  
229 de espectinomicina e incubadas para crescimento sob agitação à 28 °C por 24 h.

230 Após o período de incubação e a cultura atingir um valor de D.O. igual a 2, a  
231 cultura foi centrifugada à 4000 xg por 7 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado  
232 e a cultura foi ressuspensa em 5 mL de meio IM contendo AS e espectinomicina. Uma  
233 nova centrifugação foi realizada, o sobrenadante descartado e 5 mL de meio IM contendo

234 AS e espectinomicina foi adicionado. A D.O. foi aferida e seu valor recalculado para  
235 adicionar um volume de células correspondente a uma D.O. final de 0,2 em 20 mL de  
236 meio IM contendo o indutor AS e o antibiótico espectinomicina. Nesta etapa o volume  
237 de 20 mL foi adicionado a um Erlenmeyer de 250 mL, que foi incubado sob agitação por  
238 3 a 5 h até as culturas atingirem uma D.O. de 0,6–0,7.

239 A levedura basidiomicota *R. aurantiaca* LMA1 foi previamente ativada em meio  
240 BDA sólido e em seguida cultivada em 10 mL de meio BDA líquido à 28 °C por 36 h até  
241 uma DO de 0,6–0,7. O co-cultivo das células de *A. tumefaciens* AGL-1 (pRH2034) e da  
242 levedura foi realizado em placas contendo o meio ágar IM com 15 g L<sup>-1</sup> de ágar (22),  
243 adicionado do antibiótico espectinomicina a 80 µg mL<sup>-1</sup>. Nestas placas foram adicionados  
244 previamente 5 discos de membrana de nitrato de celulose com 47 mm de diâmetro e 45  
245 µM de poro (Marca Unifil, código: 512.047). Suspensões de 20 µL de células de *A.*  
246 *tumefaciens* (pRH 2034) e 20 µL de *R. aurantiaca* em D.O. de 0,6–0,7 foram adicionadas  
247 (“gotejadas”) em cada disco de membrana, sem dispersar a mistura. As placas foram  
248 incubadas durante 24 h a 24 °C sem parafilme, para permitir uma maior circulação de  
249 oxigênio e no escuro. Um controle positivo do crescimento foi realizado em meio ágar  
250 IM com as bactérias e as leveduras. Após este tempo, as membranas de nitrato de celulose  
251 foram transferidas para novas placas contendo o meio BDA com 60 µg mL<sup>-1</sup> de  
252 higromicina B e 300 µg mL<sup>-1</sup> de cefotaxima ou timentina. A higromicina foi utilizada  
253 para selecionar os transformantes, enquanto a cefotaxima/ e ou timentina para inibir o  
254 crescimento das células bacterianas. Estas placas foram então incubadas por 2 dias à 30  
255 °C. Em seguida, as culturas em co-cultivo foram raspadas das membranas, lavadas em  
256 solução salina e 150 µL e transferidas a novos meios BDA + higromicina (60µg mL<sup>-1</sup>) +  
257 cefotaxima e/ou timentina (300µg mL<sup>-1</sup>) e incubadas a 25 °C até o aparecimento de  
258 colônias.

259 No presente estudo, o plasmídeo da levedura *Rhodospodium toruloides* foi  
260 inserido em *E. coli* para a multiplicação e manutenção, e em *A. tumenfasciens* para  
261 transferência por eletroporação para *R. aurantiaca* LMA1.

262

### 263 **Colonização de *Rhodotorula aurantiaca* em Hipocótilo, Raízes, Folhas Cotiledonares** 264 **e Primeiro Par de Folhas Verdadeiras**

265 Sementes de melão tipo Amarelo (Goldex) foram imersas em suspensões (1,5 x  
266 10<sup>7</sup>cel/mL<sup>-1</sup>) do isolado LMA1(transformantes previamente selecionados, Lt2 e Lt14),  
267 por 2 h. Logo após, as sementes foram colocadas em pratos plásticos perfurados sobre

268 papel toalha, para secagem por 16 h, à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após este  
269 período, foram plantadas em bandejas de poliestireno contendo substrato Basaplant®  
270 mantidas em casa de vegetação. As avaliações foram realizadas aos 2, 6, 9, 12 e 15 dias  
271 após o plantio. Após 2 dias, foram avaliadas as sementes; aos 6 dias, os hipocótilos; aos  
272 9 dias, as raízes; aos 12 dias, folhas cotiledonares; e aos 15 dias o primeiro par de folhas  
273 verdadeiras e ramo subsequente. As plantas foram submetidas a regas diárias e mantidas  
274 em casa de vegetação, com médias de umidade relativa do ar e temperaturas de 62% e 38  
275 °C, respectivamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três  
276 repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma semente; um hipocótilo; as  
277 raízes de uma planta; o par de cotilédones; um par de folhas verdadeiras de meloeiro; e o  
278 ramo (entre o primeiro par e o segundo par). Este experimento foi realizado duas vezes.  
279 Em cada avaliação as amostras foram coletadas, cortadas em pequenos fragmentos,  
280 misturadas, pesadas (0,5 g) e adicionadas a 4,5 mL de água destilada esterilizada (ADE)  
281 em tubos de ensaio, os quais foram submetidos a banho de ultra-som (DensplyNeytech)  
282 por 30 minutos, na potência 10. Em seguida, foram realizadas diluições em série até  $10^{-3}$ ,  
283 plaqueando-se 100  $\mu\text{L}$  das suspensões em meio SDA+higromicina B, com três  
284 repetições. As placas foram incubadas por 72 h a  $30^\circ\text{C}$ , em B.O.D. e a avaliação realizada  
285 pela contagem do número de colônias, determinando-se a população de células  
286 leveduriformes em  $\text{UFC g}^{-1}$  de amostra.

287

### 288 **Colonização de *Rhodotorula aurantiaca* em Folhas Verdadeiras de Meloeiro**

289 O primeiro par de folhas verdadeiras de plantas de meloeiro com 15 dias, mantidas em  
290 condições de casa de vegetação em vasos de 500 g, contendo substrato Basaplant®, foi  
291 pulverizado até o escorrimento com a suspensão do isolado LMA1 (transformantes Lt2 e  
292 Lt14) ( $1,5 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ ), sendo as plantas submetidas à câmara úmida de pré e pós-  
293 inoculação por 24 h (24). As avaliações foram realizadas em intervalos de três dias, até  
294 39 dias após a inoculação (considerando as duas últimas avaliações onde a levedura não  
295 foi isolada), coletando-se o par de folhas. O delineamento experimental foi inteiramente  
296 casualizado com três tratamentos (Lt2, Lt14 e controle), oito amostragens, sendo cada  
297 amostragem referente ao par de folhas: amostragem 1: 1º par inoculado; amostragem 2:  
298 2º par, não inoculado; e assim sucessivamente) coletado em diferentes plantas, com três  
299 repetições, sendo cada repetição constituída por três plantas. As plantas foram submetidas  
300 a regas diárias e mantidas em casa de vegetação, com médias de umidade relativa do ar e

301 temperaturas de 67% e 33 °C, respectivamente. Em cada avaliação, as amostras foram  
302 processadas como descrito anteriormente.

303

### 304 **Análises Estatísticas**

305 Os experimentos foram repetidos para confirmar as observações. Os dados das duas  
306 replicações independentes, para cada experimento, foram agrupados após a realização da  
307 análise de homogeneidade das variâncias usando o teste de Levene e nenhuma  
308 heterogeneidade ser detectada ( $P > 0,05$ ). Os dados obtidos para cada experimento foram  
309 submetidos à análise de variância (ANOVA).

310 Nos experimentos de temperatura, pH, salinidade, potencial osmótico e  
311 colonização os dados foram submetidos às análises de regressão linear. A temperatura  
312 ótima de cada isolado que propiciou o crescimento máximo das leveduras foi estimada  
313 usando os modelos de regressão com o auxílio do programa Excel 2013. A escolha dos  
314 modelos foi determinada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). As significâncias das  
315 regressões foram verificadas pelo teste F ( $P < 0,05$ ) e de seus parâmetros pelo teste t ( $P$   
316  $< 0,05$ ). Os valores das variáveis estimadas pelos modelos de regressão, bem como das  
317 variáveis do experimento de pH, formação de biofilme e colonização, foram submetidos  
318 à ANOVA e as médias comparadas pelo teste da diferença mínima significativa (LSD)  
319 de Fisher ( $P = 0,05$ ). Nos testes de Levene e t, as análises de variância e comparações de  
320 medias foram realizadas com auxílio do programa Statistix 9.0 (Analytical Software,  
321 Tallahassee, EUA).

322

## 323 **Resultados**

### 324 **Testes de Adaptabilidade das Leveduras**

#### 325 **Efeito da Temperatura no Crescimento de Leveduras**

326 As leveduras LMA1, LMS e CC-2 mostraram tolerância a diferentes temperaturas,  
327 porém, obtiveram melhor crescimento entre 27–30 °C, com rápido decréscimo a partir da  
328 temperatura em 35 °C (Fig. 1). O modelo de regressão polinomial de segundo grau  
329 ( $y = a + bx + cx^2$ ) proporcionou excelente ajuste aos dados de crescimento em função da  
330 temperatura para todos os isolados, com valores de  $R^2$  variando entre 0,90–0,95. Neste  
331 modelo,  $y$  representa o crescimento em determinada temperatura ( $x$ ), enquanto  $a$ ,  $b$  e  $c$   
332 são parâmetros da regressão. Com o cálculo das derivadas desses parâmetros foi possível  
333 estimar o pico máximo de  $x$  em função de  $y$ , sendo interpretado como a temperatura ótima

334 para o crescimento. As espécies leveduriformes diferiram significativamente ( $P=0,05$ ) em  
335 relação à temperatura ótima, com *P. anomala* (CC-2) exigindo a maior temperatura (29,12  
336 °C) e *R. aurantiaca* (LMA1) a menor (27,34 °C) (Tabela 1). Na temperatura ótima, *R.*  
337 *glutinis* apresentou a menor D.O ( $A_{570}=0,46$ ) (Tabela 1).

338

### 339 **Efeito do pH no Crescimento das Leveduras**

340 As leveduras apresentaram crescimento variado em função do pH, crescendo nos níveis  
341 de 2 e 10. O maior crescimento para os isolados LMA1, LMS e CC2 foi nos pHs de 5–9,  
342 7–9 e 4–9, respectivamente (Tabela 2). Para LMA1 e LMS os maiores crescimentos foram  
343 registrados nos pHs 8 e 9, sem haver diferença significativa entre esses dois níveis, e para  
344 CC-2 foi no pH 9.

345

### 346 **Efeito da Salinidade no Crescimento das Leveduras**

347 O nível de salinidade (concentração de NaCl) no meio de cultura influenciou  
348 significativamente no crescimento dos isolados. Todos os isolados expressaram o maior  
349 crescimento na ausência de salinidade (0% NaCl) e reduziram o crescimento com a  
350 elevação dos níveis de salinidade, contudo, ainda apresentaram um crescimento  
351 expressivo até na concentração de 12% de NaCl, com maior tolerância do isolado LMA1  
352 (Fig. 2). O modelo de regressão linear simples ( $y=a+bx$ ) propiciou ajuste adequado dos  
353 dados para o crescimento (densidade óptica  $A_{570}$ ) em função da concentração de NaCl  
354 para os isolados LMA1 e LMS, com valores de  $R^2= 0,92$  e  $0,86$ , respectivamente. Para o  
355 isolado CC-2, o melhor modelo foi o de regressão polinomial de segundo grau  
356 ( $y=a+bx+cx^2$ ), com todos os parâmetros da regressão significativos ( $P_a=0,0000$ ;  
357  $P_b=0,0000$ ;  $P_c=0,0067$ ) e coeficiente de determinação alto ( $R^2= 0,92$ ).

358

### 359 **Efeito do Potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) no Crescimento das Leveduras**

360 O  $\Psi_s$  influenciou significativamente no crescimento dos isolados. Eliminando-se o  
361 controle, o maior crescimento foi no  $\Psi_s$  mais elevado (-1 Mpa) para todos os isolados e  
362 reduziram o crescimento com a diminuição do  $\Psi_s$ , mas com crescimento até -5 Mpa,  
363 sendo CC-2 o mais sensível ao aumento do  $\Psi_s$ (Fig. 3). O modelo de regressão linear  
364 simples ( $y=a+bx$ ) propiciou ajuste adequado dos dados para o crescimento em função do  
365  $\Psi_s$  para os isolados LMA1 e LMS, com valores de  $R^2 =0,85$ . Para o isolado CC-2, o

366 melhor modelo foi o de regressão polinomial de segundo grau ( $y=a+bx+cx^2$ ), com  
367 coeficiente de determinação alto ( $R^2= 0,93$ ) (Fig. 3).

368

#### 369 **Formação de Biofilme por Leveduras**

370 O isolado CC-2 foi considerado moderado produtor, pois o dividendo entre a sua D.O. e  
371 a D.O. do controle foi 2,45 ( $2D.O.c < D.O. < 4O.D.c$ ), já os isolados LMA1 e LMS foram  
372 considerados fortes produtores com D.O. de 10,3 e 7,64 ( $4D.O.c < D.O.$ ), respectivamente,  
373 com LMA1 diferindo significativamente dos demais (Fig. 4).

374

#### 375 **Colonização de Plantas de Meloeiro por *Rhodotorula aurantiaca***

#### 376 **Transformação de *E. coli* Mach1T1R e *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 com o** 377 **Plasmídeo pRH2034**

378 Colônias de *E. coli* Mach1T1R e clones de *A. tumefaciens* AGL-1 foram selecionadas  
379 após crescerem em meio suplementado com higromicina B. A PCR exibiu cepas com  
380 fragmentos de 581 pb, comprovando a integração do plasmídeo em *E. coli* Mach1T1R e  
381 *A. tumefaciens* AGL-1, sendo então identificados como verdadeiros transformantes (Fig.  
382 5).

383

#### 384 **Concentração Mínima Inibitória (CMI) do Agente Seletivo (higromicina B)**

385 A levedura LMA1 mostrou-se sensível às baixas concentrações de higromicina B, estando  
386 a concentração mínima inibitória (CMI) entre 10 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 6). Em testes  
387 adicionais determinou-se com exatidão que a CMI é de 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

388

#### 389 **Transformação da Levedura *Rhodotorula aurantiaca* LMA1 Mediada por** 390 ***Agrobacterium tumefaciens* AGL-1**

391 A partir de placas com meio de cultura e acrescidas com higromicina B, observou-se que  
392 a transformação foi eficiente (Fig. 7a), sendo selecionados 15 transformantes, e através  
393 dos seus produtos da PCR foi possível observar a presença das bandas de 580 pb em gel  
394 de agarose (Fig. 7b), além da estabilidade mitótica (Fig. 7, c, d), que permitiu selecionar  
395 com segurança dois transformantes (Lt2 e Lt14) para os testes de colonização em casa de  
396 vegetação.

397

#### 398 **Colonização de *Rhodotorula aurantiaca* em Hipocótilo, Raízes, Folhas Cotiledonares** 399 **e Primeiro Par de Folhas Verdadeiras**

400 Em sementes inoculadas com os transformantes Lt2 e Lt14 do isolado LMA1 de *R.*  
401 *aurantiaca* por infiltração de  $1,5 \times 10^7$  cels mL<sup>-1</sup>, foi verificada após 48 h do plaqueamento  
402 das sementes, a presença de colônias nas placas de Petri (dados não mostrados). A  
403 levedura colonizou raízes e hipocótilo, com populações de  $3,6 \times 10^3$  e  $3,7 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>  
404 e  $5,3 \times 10^3$  e  $4,0 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> de tecido vegetal, respectivamente para Lt2 e Lt14, que  
405 diferem significativamente entre si nos tecidos do hipocótilo (Fig. 8). A partir das folhas  
406 cotiledonares detectou-se uma redução da população, mas mesmo assim, houve a  
407 colonização do 1º par de folhas verdadeiras e do ramo subsequente. Os transformantes  
408 diferiram significativamente na colonização do hipocótilo, cotilédones e 1º par de folhas  
409 verdadeiras, destacando-se Lt2 como o melhor colonizador.

410

#### 411 **Colonização de *Rhodotorula aurantiaca* em Folhas Verdadeiras de Meloeiro**

412 No primeiro par de folhas verdadeiras tratadas com a suspensão de Lt2 e Lt14 a  $1,5 \times$   
413  $10^7$  cels mL<sup>-1</sup> foi verificada após três dias uma população real de  $3,1 \times 10^4$  e  $3,2 \times 10^4$  UFC  
414 g<sup>-1</sup> de folha, respectivamente (Fig. 9). Ao longo das avaliações verificou-se, de maneira  
415 geral, nas folhas, um gradiente de decréscimo significativo ( $P \leq 0,05$ ) no tamanho da  
416 população, sendo evidenciada, no entanto, uma redução drástica nos quinto e sexto pares  
417 de folhas verdadeiras que não diferiram significativamente entre si (Fig. 9). A colonização  
418 de *R. aurantiaca* foi detectada até os 36 dias após a inoculação, no 6º par de folhas  
419 verdadeiras, com populações de  $6,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> (Lt2) e  $5,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> (Lt14) de  
420 folha. Os transformantes só diferiram significativamente entre si na colonização do 3º e  
421 4º par, sendo o melhor colonizador nesses órgãos o Lt2. Observando a dinâmica  
422 populacional de *R. aurantiaca* nas folhas de meloeiro ao longo das avaliações (Figs. 8 e  
423 9), verificou-se uma menor população quando Lt2 e Lt14 foram inoculadas nas sementes  
424 do que no primeiro par de folhas verdadeiras, sendo as populações nos primeiros pares de  
425 folhas dos dois experimentos, respectivamente  $2,1 \times 10^3$  e  $1,4 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> de folha, e  
426  $3,1 \times 10^4$  e  $3,2 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> de folha, decrescendo a níveis não detectáveis aos 39 e 42  
427 dias após a inoculação.

428

#### 429 **Discussão**

430 As leveduras utilizadas na presentepesquisa, *R. aurantiaca* (LMA1), *R. glutinis*  
431 (LMS) e *P. anomala* (CC-2), haviam sido selecionadas dentre um total de 60 isolados,  
432 pela eficiência no controle da mancha aquosa em diferentes estádios de desenvolvimento

433 do meloeiro (semente, plântula, planta e fruto), reduzindo o índice de doença e área abaixo  
434 da curva de progresso da doença em plântulas e plantas em até 58,6 e 47,2%,  
435 respectivamente (12).

436 Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que a adaptabilidade de  
437 qualquer fenótipo está diretamente ligada aos fatores ambientais que envolvam o  
438 indivíduo, evidenciando a importância dessas influências ambientais nas previsões sobre  
439 a tolerância ecológica do indivíduo (25). Algumas características fenotípicas como  
440 crescimento e a formação de biofilme tendem a refletir muito das características  
441 genéticas, sendo muitas vezes adaptativas com implicações para a estratégia ecológica  
442 mais ampla do organismo. Logo, essas características influenciam em mínimas diferenças  
443 de adaptabilidade entre indivíduos ou populações (26). As leveduras *R. aurantiaca*  
444 (LMA1), *R. glutinis* (LMS) e *P. anomala* (CC-2) demonstraram comportamento  
445 mesófilo, sendo capazes de crescer em uma faixa de temperatura entre 25 a 40 °C (Fig.  
446 1). Em leveduras isoladas de uva foi verificada uma faixa ótima de crescimento em torno  
447 de 25 °C a 30 °C, com tolerância de até 35 °C e decaindo rapidamente até 40 °C (27),  
448 corroborando com nossos resultados (Fig. 1). Quanto a temperatura ótima, as três espécies  
449 diferiram significativamente entre si (Tabela 1), mesmo *R. aurantiaca* (LMA1) e *R.*  
450 *glutinis* (LMS) pertencendo ao mesmo gênero. Isto nos leva a confirmar que a  
451 adaptabilidade de um indivíduo pode ser influenciada não apenas pelos atributos  
452 genéticos, mas também pelo ambiente em que se encontra (28). No Nordeste brasileiro  
453 prevalecem temperaturas superiores a 28 °C durante quase todo o ano (29), condições  
454 propícias a ocorrência da mancha aquosa em meloeiro e também a adaptabilidade das  
455 leveduras estudadas.

456 As espécies do gênero *Rhodotorula* e *P. anomala* foram capazes de crescer em  
457 uma faixa de pH de 2 a 10, evidenciando uma maior adaptação às condições de  
458 alcalinidade, pH 8 e/ou 9 (Tabela 2). Esses resultados estão de pleno acordo com o estudo  
459 de Fredlund et al. (30) em que o crescimento do isolado *P. anomala* J121 ocorreu em  
460 valores de pH entre 2 e 9. A concentração de íons de hidrogênio em um meio pode afetar  
461 o crescimento fúngico indiretamente por seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou  
462 diretamente pela ação nas superfícies celulares (31).

463 A redução do crescimento com a elevação dos níveis de salinidade é comum na  
464 maioria dos fungos, tendo em vista a toxicidade desse tipo de sal (NaCl) para a célula  
465 fúngica (32). A menor sensibilidade à salinidade apresentada por LMA1 pode constituir  
466 importante fator de competitividade em relação a outras espécies de microrganismos em

467 ambientes salinizados. Muitas espécies de leveduras antagônicas crescem apenas sob  
468 condições de baixos níveis de salinidade, como a levedura *P. anomala* J121 que tolerou  
469 ao máximo 0,92% de NaCl (30). Em contraste, os isolados LMA1, LMS e CC-2,  
470 reduziram seus crescimentos com o aumento de NaCl no meio de cultivo, mas toleraram  
471 níveis superiores a 12%. O conhecimento da adaptabilidade a concentração de sal, bem  
472 como ao pH, é importante, por exemplo, para o preparo de formulações de produtos  
473 contendo essas leveduras.

474           Em geral para fungos, com a diminuição do  $\Psi_s$  ocorre a redução do  
475 crescimento, sendo mais acentuado a partir de -2MPa (32). As leveduras em estudo  
476 reduziram o crescimento drasticamente já a partir de -1 Mpa. A disponibilidade de água  
477 é um dos fatores ambientais de maior importância que afeta a atividade fúngica (33). Com  
478 o potencial osmótico menor que o ambiente que a circunda, uma célula microbiana  
479 absorverá água até que o equilíbrio seja estabelecido. O processo inverso resulta em perda  
480 de turgor, com posterior dessecação e morte da célula (34). O crescimento das leveduras  
481 em todos os níveis de  $\Psi_s$  testados pode indicar a capacidade destes indivíduos de  
482 suportarem condições osmóticas adversas, o que é comum na parte aérea de plantas, o  
483 local onde poderão ser pulverizadas como agentes de controle biológico. No entanto, a  
484 menor sensibilidade à redução do  $\Psi_s$  apresentada por LMA1 e LMS indica maior  
485 adaptabilidade à condição de estresse osmótico, comparado à CC-2. Uma maior  
486 tolerância ao baixo potencial osmótico do meio também foi obtido por Araújo et al. (27)  
487 com o isolado leveduriforme L10, que obteve um elevado número de colônias até -5 Mp.  
488 Os biofilmes representam uma forma de vida microbiana predominante no planeta (35).  
489 Os isolados LMA1 e LMS, foram fortes produtores de biofilme, já o isolado CC-2 foi  
490 moderado produtor. Porém, os três isolados foram eficientes na proteção de plantas de  
491 meloeiro, com redução da severidade da doença (12), demonstrando assim que a fraca  
492 produção de biofilme não afetou a eficiência do biocontrole pelo isolado CC-2. No  
493 entanto, a forte produção de biofilme é um fator de adaptabilidade positiva, pois o  
494 biofilme pode fazer com que os microrganismos tolerem alta concentração de agentes  
495 antimicrobianos e uma variedade de condições adversas, quando comparada com sua  
496 forma planctônica (36). No manejo da mancha aquosa é utilizado acibenzolar-S-metil  
497 (10) e as leveduras precisam fazer parte do manejo no campo.

498           O sistema de transformação genética aqui utilizado, foi construído por Liu et al.  
499 (21), que permite a introdução de um gene exógeno da levedura *R. toruloides* em outro  
500 organismo. As leveduras, por serem microrganismos eucariontes, são capazes de realizar

501 modificações pós-transdução das proteínas, apresentando-se assim, excelente hospedeira  
502 de plasmídeo recombinante, portadores de informações genéticas desejáveis (37). O  
503 estabelecimento da CMI de higromicina B para *R. aurantiaca* selvagem (LMA1) foi  
504 crucial para estabelecimento da sensibilidade do isolado em relação ao antibiótico; e, que  
505 concentração seria utilizada para a seleção de transformantes.

506 A transformação de *R. aurantiaca* foi eficiente, comprovada por PCR, tendo em  
507 vista que o plasmídeo pRH2034 nunca havia sido utilizado para a transformação dessa  
508 espécie de levedura. Para o teste de colonização em casa de vegetação, seria necessário  
509 apenas um transformante, e para tal, foi realizado o teste de estabilidade mitótica. A  
510 estabilidade é confirmada quando a informação genética adicional se mantém estável  
511 como parte do genoma da célula hospedeira (37) e, segundo Wu et al. (38) e Hohnholzet  
512 al. (39) o teste de estabilidade mitótica é essencial para ser ter certeza que a informação  
513 genética permanece nos cromossomos dos transformantes, mesmo após sucessivas  
514 repicagens. Então, devido presença das bandas em gel de agarose e sua estabilidade em  
515 meio de cultura contendo higromicina B ( $600\mu\text{g mL}^{-1}$ ), o transformante T2 foi  
516 selecionado. Adicionalmente, também foi selecionado o transformante T14 para nível de  
517 comparação, já que este não foi estável para higromicina B no último nível de  
518 concentração avaliado.

519 No experimento de dinâmica de colonização da levedura *R. aurantiaca* (Lt2 e  
520 Lt14) a partir de sementes tratadas, comprovamos que a colonização em meloeiro, por  
521 esse agente biocontrolador, pode ser descendente e ascendente, visto que foram isoladas  
522 células dos transformantes nas raízes, hipocótilos, cotilédones, 1º par de folhas  
523 verdadeiras e ramo subsequente. Em estudo da colonização por *A. citrulli* em meloeiro,  
524 foi constatado que a bactéria também coloniza raízes e demais tecidos da planta, a partir  
525 do inóculo em sementes (40). Como as sementes são a principal forma de disseminação  
526 do patógeno, nosso resultado poderá contribuir para o manejo da doença, visto que a  
527 levedura também irá colonizar a planta a partir do tratamento de sementes, e poderá  
528 competir com o patógeno por espaço na planta hospedeira, ter atividade *quorum*  
529 *quenching*, ou outros mecanismos de biocontrole. Já foi provado que LMA1 não inibe o  
530 crescimento de *A. citrulli*, ou seja, não age por antibiose, não produz toxinas killer, ou  
531 compete por nutrientes com a bactéria (12).

532 Alves et al. (40) constataram, a partir da pulverização de *A. citrulli* no primeiro  
533 par de folhas verdadeiras, a presença da bactéria até no 10º par. No presente estudo,  
534 quando os transformantes da levedura LMA1 foram inoculados apenas no primeiro par

535 de folhas verdadeiras, a colonização foi constatada até o 6° par (Fig 9), equivalendo ao  
536 36° dia após a inoculação, levando em consideração que as condições ambientais estavam  
537 com temperatura média elevada (39 °C) e umidade relativa média de 61%. Conceição et  
538 al. (13) já haviam comprovado que a levedura LMA1 protegia as plantas de meloeiro até  
539 o 5° par de folhas verdadeiras, equivalente a 29 dias de durabilidade da proteção, no  
540 entanto, a avaliação foi realizada através de parâmetros epidemiológicos da doença, e não  
541 pela presença da levedura nas folhas, como realizado agora. Tais resultados levam a crer  
542 que dependendo das condições ambientais a colonização da planta de meloeiro pela  
543 levedura poderá se estender além do 6° par, com proteção total da planta. Além disso,  
544 LMA1 também poderá atuar no controle da mancha aquosa pelo mecanismo de indução  
545 de resistência, uma vez que plantas tratadas com a levedura aumentaram a expressão de  
546 polifenoloxidade e ascorbato peroxidase (13). Mesmo os transformantes T2 e T14 tendo  
547 apresentado estabilidade mitótica diferentes, esse comportamento não interferiu na  
548 dinâmica de colonização nos tecidos da planta hospedeira. Os resultados de colonização  
549 evidenciam a capacidade de *R. aurantiaca* (LMA1) em se estabelecer na planta de  
550 meloeiro e, dessa forma, atuar eficientemente no controle da mancha aquosa, como  
551 provado em outras pesquisas (12, 13).

552

## 553 **Conclusões**

554 Esse estudo identificou a adaptabilidade das leveduras *R. aurantiaca* (LMA1), *R.*  
555 *glutinis* (LMS) e *P. anomala* (CC-2) sob a influência da temperatura, pH, salinidade e  
556  $\Psi_s$ , e formação de biofilme. Também foi determinada a capacidade da levedura LMA1,  
557 transformada geneticamente, em colonizar diferentes partes da planta à medida que a  
558 mesma foi crescendo e, dependendo da localização do inóculo inicial, foi encontrada no  
559 6° par de folhas verdadeiras, confirmando a eficácia da atividade das leveduras  
560 biocontroladoras em colonizar e de alguma forma, ainda não bem esclarecida, interferir  
561 na infecção de *A. citrulli*. As informações obtidas são importantes tanto para a formulação  
562 quanto para uso das leveduras no campo, visando o manejo eficiente da mancha aquosa  
563 do meloeiro.

564

## 565 **Agradecimentos**

566 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) -  
567 Código de Financiamento 001, através da concessão da bolsa de estudo a Claudiana S.

568 Conceição. A UFRPE pelo apoio a pesquisa (Edital PRPPG 015/2018). Ao Dr. Wagner  
569 Campos Ottoni, da Universidade Federal de Viçosa-UFV, pela disponibilização do  
570 isolado AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Ao Prof. Chan Soh Ha, representante legal  
571 da Universidade de Cingapura, Cingapura, pelo envio do plasmídeo pRH2034 à Profa.  
572 Elineide Souza/UFRPE, sob as cláusulas de MTA específico.

573

## 574 Referências

575

- 576 1. Anuário Brasileiro de Fruticultura. Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul,  
577 Editora, Gazeta Santa cruz, 2018. 88 p. Disponível  
578 em:<<http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eoedicao>>. Acesso em: 17 Dez. 2018.  
579
- 580 2. Schaad NW, Postnikova E, Sechler A, Claffin LE, Vidaver AK, Jones JB,  
581 Agarkova I, Ignatov A, Dickstein E, Ramundo BA (2008) Reclassification of  
582 subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend. *A. cattleyae*  
583 (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov.,  
584 and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic Applied Microbiology* 31:434-  
585 446. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.09.003>  
586
- 587 3. Isakeit T (1997) First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae*  
588 subsp. *citrulli*. *Plant Disease* 81:694-700. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.6.694C>  
589
- 590 4. EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Acidovorax*  
591 *citrulli*: Bacterial fruit blotch of cucurbits, 2018. Disponível em:<[http://www.eppo.org/](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Acidovorax_citrulli.html)  
592 [QUARANTINE/Alert\\_List/bacteria/Acidovorax\\_citrulli.html](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Acidovorax_citrulli.html)>. Acesso em: 20 Jan.  
593 2018  
594
- 595 5. Cuntly A, Audusseau C, Paillard S, Olivier V, François C, Rivoal C and  
596 Poliakov F (2018) First report of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit  
597 blotch, on melon (*Cucumis melo*) in Guadeloupe (France). *Plant*  
598 *Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1825-PDN>  
599
- 600 6. CABI, 2015. *Acidovorax citrulli* (fruit blotch). Disponível em:  
601 <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/2676#tab1nav>>. Acesso em: 27 Out. 2015.  
602
- 603 7. Oliveira A, Santos MHM, Silveira EB, Gomes AMA, Mariano RLR (2006)  
604 Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias  
605 epifíticas e endofíticas. *Horticultura Brasileira* 24:373-377.  
606 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362006000300021>  
607
- 608 8. Wechter WP, Levi A, Ling KS, Kousik C. (2011) Identification of Resistance to  
609 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* among Melon (*Cucumis* spp.) *HortScience* 46:207-  
610 212. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.2.207>  
611

- 612 9. Walcott RR., Langston D, Gitaitis RD, Gay D, Hopkins DL, Kucharek TA, Latin  
613 R, Eggel D, Cook WP, Keinath AP, Lovic B (2001) Guidelines for managing bacterial  
614 fruit blotch disease.  
615
- 616 10. Sales Júnior R., Pontes Filho FST, Nunes GHS, Torres GRC (2007) Eficiência de  
617 Acibenzolar-S-Methyl e oxiclreto de cobre no controle de *Acidovorax avenae* subsp.  
618 *citrulli*, agente causal da “mancha-aquosa” no meloeiro. Revista Biologia e Ciência da  
619 Terra 7:66-71. :<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50007108> ISSN 1519-5228  
620
- 621 11. Wang X, Li G, Jiang DH, Huang HC (2009) Screening of plant epiphytic yeasts  
622 for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami  
623 melon. Biological Control 50:164-171. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.009>  
624
- 625 12. Melo EA, Mariano RLR, Laranjeira D, Santos LA, Gusmão LO, Souza EB  
626 (2015) Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants.  
627 Tropical Plant Pathology 40:56-64. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0008-x>  
628
- 629 13. Conceição CS, Felix KCS, Mariano RL, Medeiros EV, Souza EB (2014)  
630 Combined effect of yeast and silicon on the control of bacterial fruit blotch in melon.  
631 Scientia Horticulturae 174:164-170. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.027>  
632
- 633 14. Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G (2015) Biocontrol ability and  
634 action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-  
635 harvest bunch rot of table grape. Food Microbiology 47:85-92.  
636 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>  
637
- 638 15. Assunção EF (2015) Leveduras como agentes protetores e indutores de  
639 resistência no manejo da mancha-de-alternaria em couve-manteiga. 58 f. Dissertação.  
640 Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
641
- 642 16. Milgroom MG (2015) Population biology of plant pathogens: genetics, ecology,  
643 and evolution. APS Press, St. Paul. 399p. <http://doi/book/10.1094/9780890544525>  
644
- 645 17. Bandeira MA (2018) Adaptabilidade comparativa de espécies fúngicas  
646 causadoras do pé-preto da videira no nordeste brasileiro e resistência de cultivares. 82 f.  
647 Tese - Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
648
- 649 18. Faheem M, Raza W, Zhong W, Nan Z, Shen Q, Xu Y (2015) Evaluation of the  
650 biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f.  
651 sp. *niveum*. Biological Control 81:101-110.  
652 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.012>  
653
- 654 19. Machado Neto NB, Custódio CC, Costa PR, Doná FL (2006) Deficiência hídrica  
655 induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão.  
656 Revista Brasileira de Sementes 28:142-148. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222006000100020>  
657
- 658
- 659 20. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M (2000) A  
660 modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.  
661 Journal of Microbiological Methods 40:175-79.

- 662 [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)  
663
- 664 21. Liu Y, Koh C, Sun L, Hlaing M, DuM, Peng N, Ji L (2013) Characterization of  
665 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene RtGPD1 and development of genetic  
666 transformation method by dominant selection in oleaginous yeast *Rhodospiridium*  
667 *toruloides*. Applied Microbiology and Biotechnology 97:719-729.  
668 <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4223-9>  
669
- 670 22. Bundock P, Dendulkas A, Beijersbergen A, Hooykaas PJJ (1995) Transkingdom  
671 T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. The  
672 EMBO Journal 14:3206-3214. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07323.x>  
673
- 674 23. Ianiri G, Wright S, Castoria R, Idnurm A (2011) Development of resources for  
675 the analysis of gene function in Pucciniomycotina red yeasts.  
676 Fungal Genetics and Biology 48:685-695. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.03.003>  
677
- 678 24. Silveira EB, Michereff SJ, Mariano RLR (2003) Severidade da mancha-aquosa  
679 em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo  
680 de *Acidovorax avenaesubsp. citrulli*. Fitopatologia Brasileira 28:171-175.  
681 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582003000200009>  
682
- 683 25. Balodi R, Ghatak LV, Bisht S, Shukla N (2017) Reproductive fitness of fungal  
684 Phytopathogens: deriving co-evolution of host-pathogen systems. In: Ghatak A, Ansar  
685 M (eds.) The phytopathogen: evolution and adaptation. Apple Academic Press,  
686 Waretown, pp 41-64  
687
- 688 26. Brasier CM (1999) Fitness, continuous variation and selection in fungal  
689 populations: an ecological perspective. In: Worrall JJ (ed.) Structure and dynamics of  
690 fungal populations. Springer, Dordrecht, pp 307-337  
691
- 692 27. Araújo C, Alves ÍL, Freitas T, Carvalho AP, Fernandes Júnior PI, GavaCAT  
693 (2015) Efeito da temperatura e disponibilidade de água sobre leveduras aplicadas no  
694 controle de podridões pós-colheita em uva. In: Simpósio de mudanças climáticas e  
695 desertificação no semiárido brasileiro, 4. Petrolina. Anais... Experiências e  
696 oportunidades para o desenvolvimento. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015. CD-ROM  
697 1.  
698
- 699 28. Zhan J, McDonald BA (2013) Experimental measures of pathogen competition  
700 and relative fitness. Annual Review Phytopathology 51:131-153.  
701 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102302>  
702
- 703 29. Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013)  
704 Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift 22:711-728.  
705 <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>  
706
- 707 30. Fredlund E, Druvefors U, Boysen ME, Lingsten KJ, Schnürer J (2002)  
708 Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. FEMS Yeast  
709 Research 2:395-402. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00109.x>  
710

- 711 31. Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW (2001) *The Fungi*. London, UK:  
712 Academic Press.  
713
- 714 32. Deacon JW (2016) *Fungal biology*. BlackWell publishing (4<sup>th</sup>)Ed. 380 p.  
715
- 716 33. Palacios S, Casasnovas F, Ramirez ML, Reynoso MM, Torres AM (2014)  
717 Impact of water potential on growth and germination of *Fusarium solani* soilborne  
718 pathogen of peanut. *Brazilian Journal of Microbiology* 45:1105-1112.  
719 <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000300046>  
720
- 721 34. Cook JR, Papendick RI (1978) Role of water potential in microbial growth and  
722 development of plant disease, with special reference to postharvest pathology.  
723 *HortScience* 13:559-565  
724
- 725 35. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically  
726 Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15:167-193.  
727 <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>  
728
- 729 36. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common  
730 cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.  
731 <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>  
732
- 733 37. Melo JF (2006) Análise da viabilidade de transformação de diferentes leveduras  
734 de interesse biotecnológico utilizando o sistema *can1* (cgc). 67 f. Dissertação.  
735 Instituto Butantã IPT, São Paulo  
736
- 737 38. Wu L, Conner RL, Wang XM, Xu RQ, Li HJ (2015) Variation in growth,  
738 colonization of maize, and metabolic parameters of GFP- and DsRed-labeled  
739 *Fusarium verticillioides* strains. *Phytopathology* 106:890-899.  
740 <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0236-R>  
741
- 742 39. Hohnholz R, Pohlmann KJ, Achstetter T (2017) A set of isomeric episomal  
743 plasmids for systematic examination of mitotic stability in *Saccharomyces cerevisiae*.  
744 *Yeast* 34:267-275. <https://doi.org/10.1002/yea.3231>  
745
- 746 40. Alves AO, Xavier AS, Viana IO, Mariano RLR, Souza EB (2010) Colonization  
747 dynamics of *Acidovorax citrulli* in melon. *Tropical Plant Pathology* 35:368-372.  
748 <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000600005>  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760

761 **Tabela 1** Temperatura ótima de crescimento de espécies de leveduras biocontroladoras  
 762 da mancha aquosa do meloeiro.

<b>Espécie / Isolado</b>	<b>Temperatura ótima<sup>1</sup> (°C)</b>	<b>Densidade Óptica (A<sub>570nm</sub>)</b>
<i>Rhodotorula. aurantiaca</i> / LMA1	27,34 c <sup>3</sup>	0,48 b
<i>Rhodotorulaglutinis</i> / LMS	28,12 b	0,46 c
<i>Pichiaanomala</i> / CC-2	29,12 a	0,61 a
CV (%)	0,4	0,19

763

764 <sup>1,2</sup> Valores estimados a partir de regressão polinomial pelo ajuste do modelo quadrático ( $y = a + bx + cx_2$ ),  
 765 onde  $y$  = densidade (A<sub>570nm</sub>);  $a$ ,  $b$  e  $c$  são parâmetros da regressão;  $x$  = temperatura (LMA1:  $y = -0,00178x_2$   
 766 + 0,10097x - 0,95017, R<sup>2</sup> = 0,91; LMS:  $y = -0,00163x_2 + 0,09339x - 0,87659$ ,  
 767 R<sup>2</sup> = 0,95; CC-2:  $y = -0,00167x_2 + 0,08882x - 0,55609$ , R<sup>2</sup> = 0,90);

768 <sup>3</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de  
 769 Fisher (P=0,05).

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805 **Tabela 2** Efeito do nível de pH no crescimento de espécies de leveduras biocontroladoras  
 806 da mancha aquosa do meloeiro.

Isolado	pH / Densidade óptica ( $A_{570nm}$ )									CV(%)
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
LMA1 <sup>1</sup>	0,01C <sup>2</sup>	0,06C	0,08C	0,56B	0,57B	0,59B	0,77A	0,73A	0,05C	15,99
LMS	0,04E	0,04E	0,13D	0,21C	0,24C	0,38B	0,77A	0,77A	0,04E	10,46
CC-2	0,24F	0,33E	0,42C	0,42C	0,44C	0,45C	0,87B	0,98A	0,15D	4,24

807 <sup>1</sup>LMA1, *Rhodotorula aurantiaca*; LMS, *Rhodotorula glutinis*; CC-2, *Pichia anomala*;

808 <sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste  
 809 LSD de Fisher ( $P=0,05$ )

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

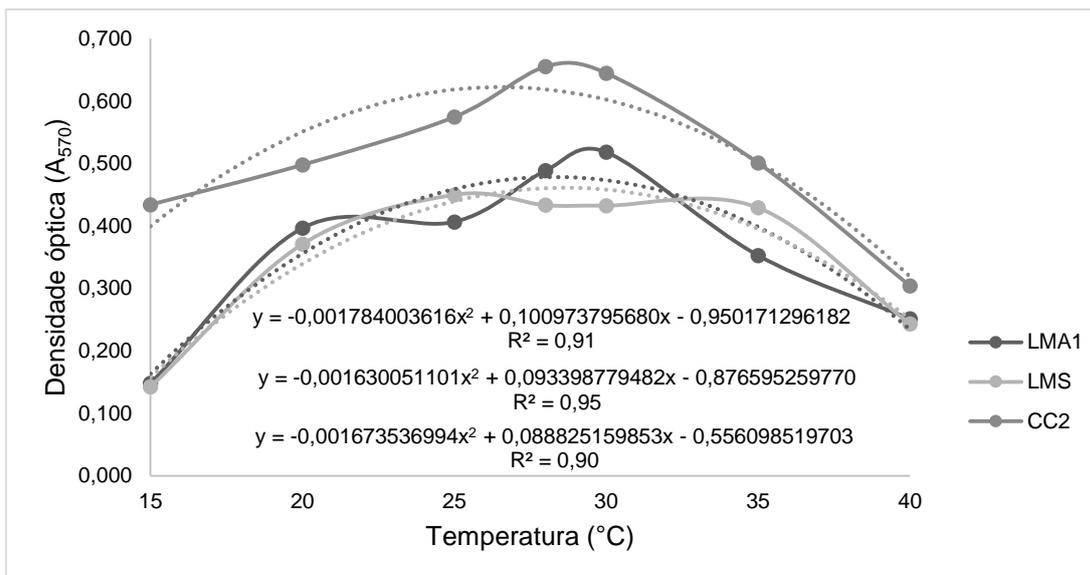
821

822

823

824

825



826

827 **Fig. 1** Efeito da temperatura no crescimento dos isolados de leveduras biocontroladoras  
 828 da mancha aquosa do meloeiro. LMA1, *Rhodotorula aurantiaca*; LMS, *Rhodotorula*  
 829 *glutinis*; CC-2, *Pichia anomala*.

830

831

832

833

834

835

836

837

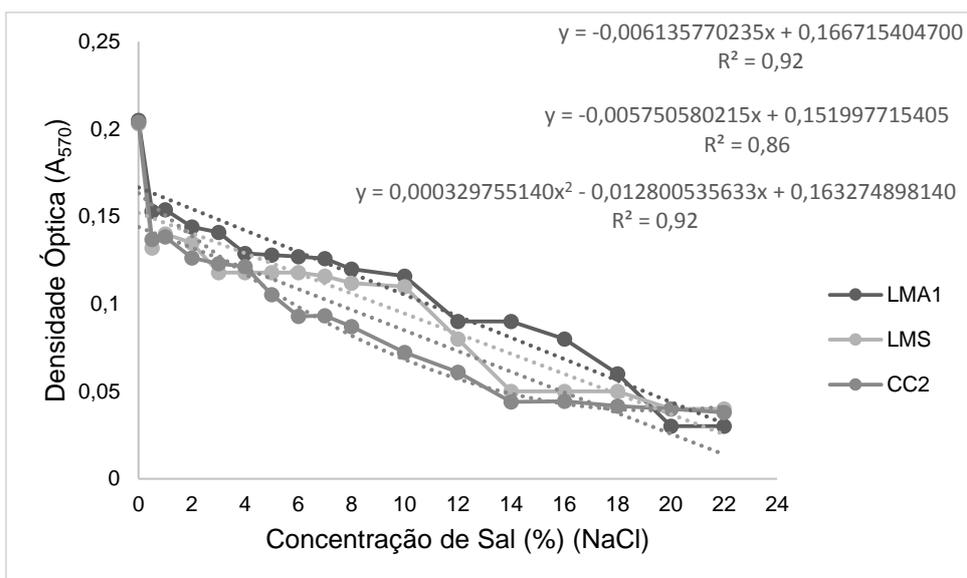
838

839

840

841

842



843

844 **Fig. 2** Efeito da concentração de sal no crescimento dos isolados de leveduras  
 845 biocontroladoras da mancha aquosa do meloeiro. LMA1, *Rhodotorula aurantiaca*; LMS,  
 846 *Rhodotorula glutinis*; CC-2, *Pichia anomala*.

847

848

849

850

851

852

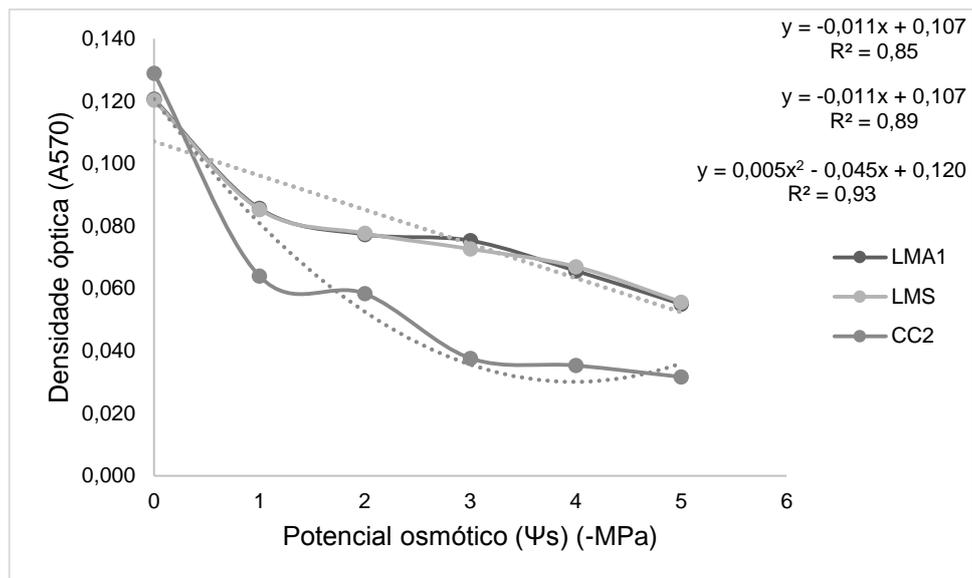
853

854

855

856

857



858

859 **Fig. 3** Efeito do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) no crescimento de isolados de leveduras  
 860 biocontroladoras da mancha aquosa do meloeiro. LMA1, *Rhodotorula aurantiaca*; LMS,  
 861 *Rhodotorula glutinis*; CC-2, *Pichia anomala*.

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

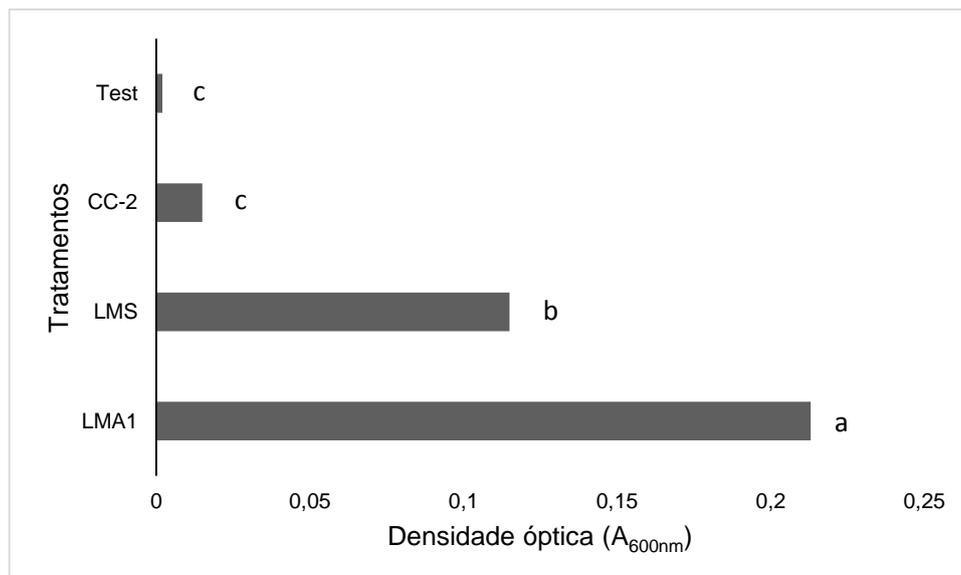
872

873

874

875

876



877

878 **Fig. 4** Formação de biofilme pelas leveduras *Rhodotorula aurantiaca* - LMA1 (forte  
879 produtor), *Rhodotorula glutinis* - LMS (forte produtor) e *Pichia anomala* - CC-2  
880 (moderado produtor) em placas de 96 poços, tratadas para aderência células. Letras  
881 iguais não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ( $P=0,05$ ).

882

883

884

885

886

887

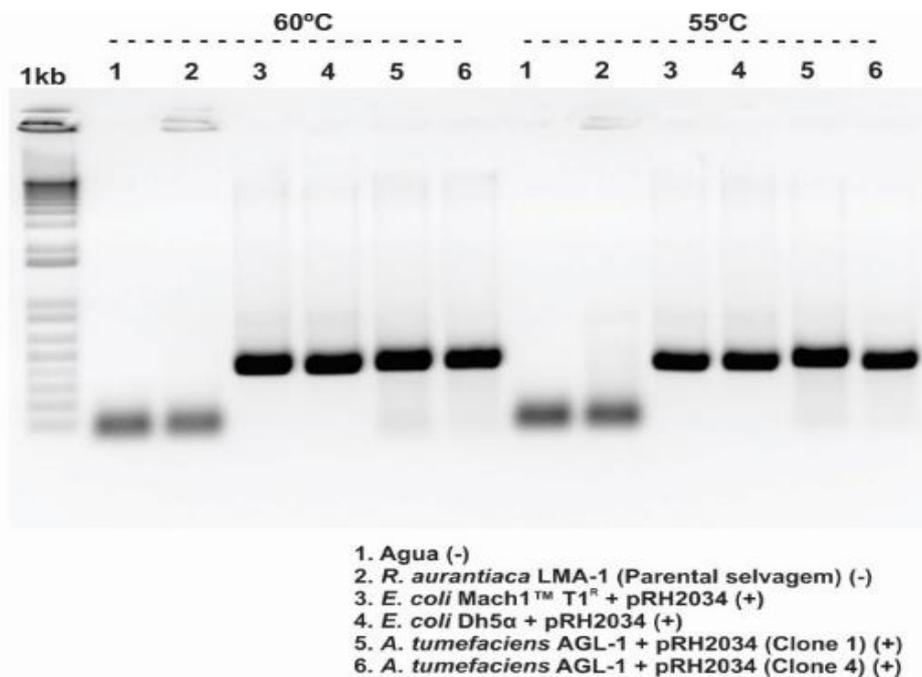
888

889

890

891

892



893

894 **Fig. 5** Amplificação dos produtos da PCR do DNA de bactérias e leveduras, analisados  
895 por eletroforese em gel de agarose a 1% evidenciando bandas em 580pb).

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

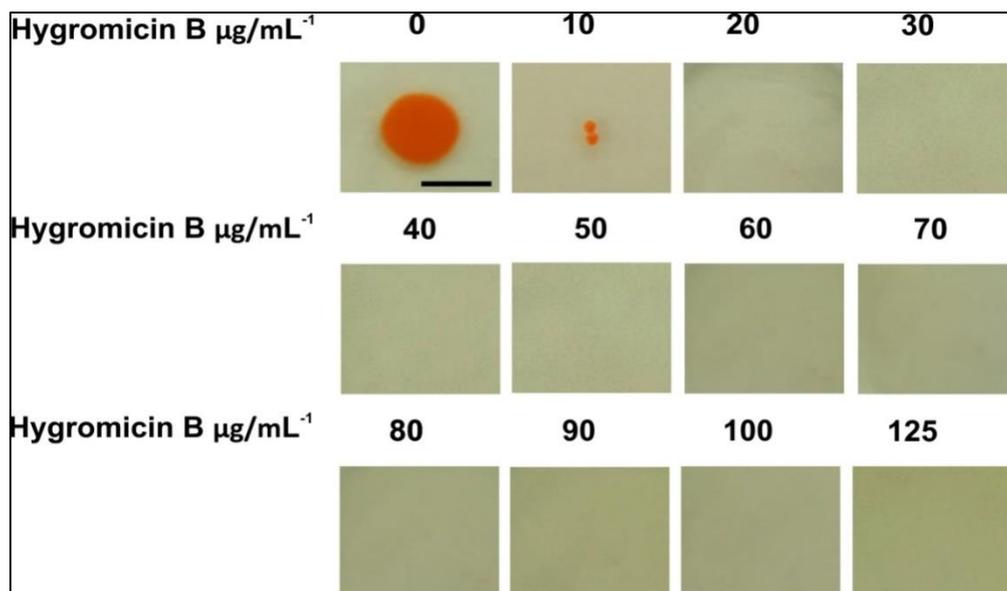
910

911

912

913

914



915

916 **Fig. 6** Curva de morte de *Rhodotorula aurantiaca* LMA1 para determinação da  
917 concentração mínima inibitória (CMI) do antibiótico higromicina B em meio batata  
918 dextrose ágar. A barra na figura corresponde a 1 cm.

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

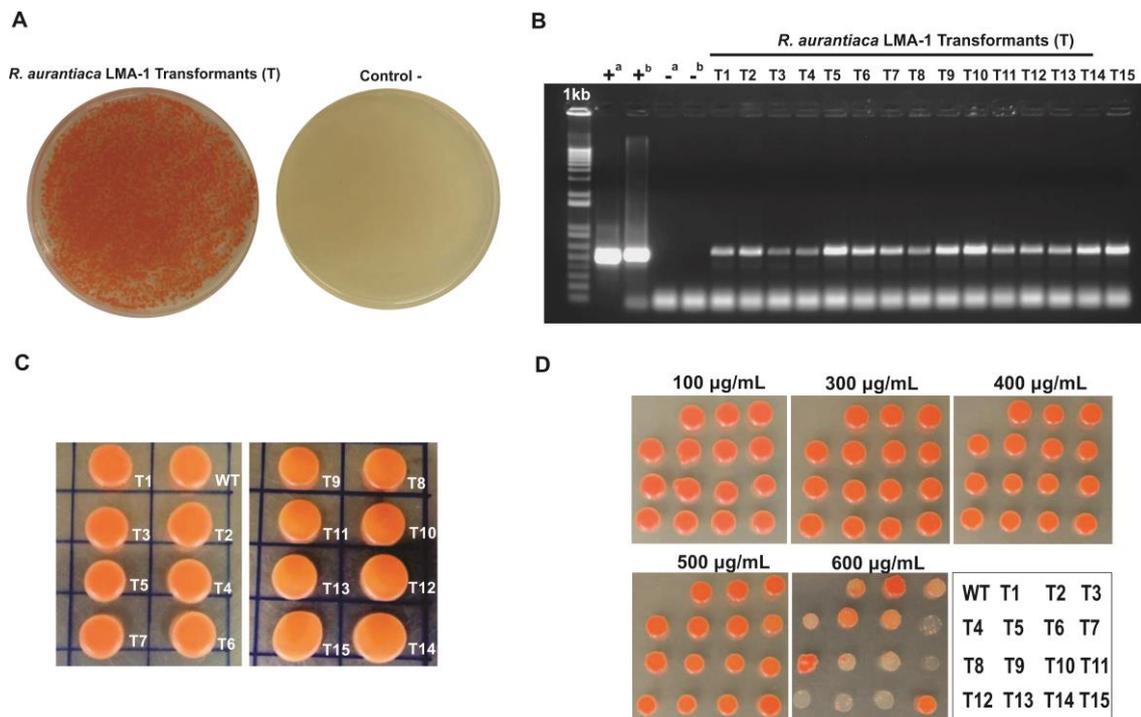
929

930

931

932

933



934

935 **Fig. 7** Transformação da levedura basidiomicota *Rhodotorula aurantiaca* LMA1 mediada  
 936 por *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1. Placas com meio de cultura BDA acrescido de  
 937 higromicina B comprovando a transformação da levedura (A); expressão das bandas em  
 938 gel de agarose dos produtos da PCR dos 15 transformantes selecionados (B); estabilidade  
 939 mitótica em meio não seletivo (C); estabilidade mitótica em meio seletivo (BDA +  
 940 higromicina B) (D).

941

942

943

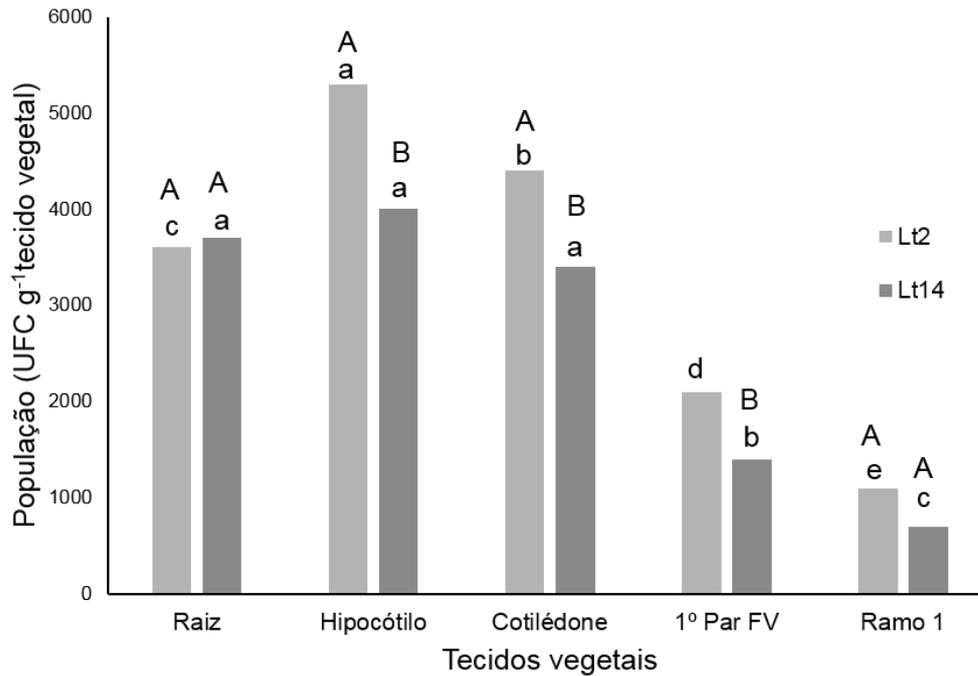
944

945

946

947

948



949

950 **Fig. 8** Colonização de *Rhodotoru laurantiaca* resistente a higromicina B, transformantes  
 951 Lt2 e Lt14, em hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, 1º par de folha verdadeira (FV) e  
 952 ramo intermediário (compreendido entre os dois primeiros pares de folhas), a partir da  
 953 inoculação nas sementes. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (diferença entre  
 954 tecidos vegetais para cada isolado separadamente) e letras maiúsculas (diferença entre  
 955 isolados dentro de cada tecido da planta) não diferem significativamente entre si pelo  
 956 teste LSD de Fisher (P=0,05).

957

958

959

960

961

962

963

964

965

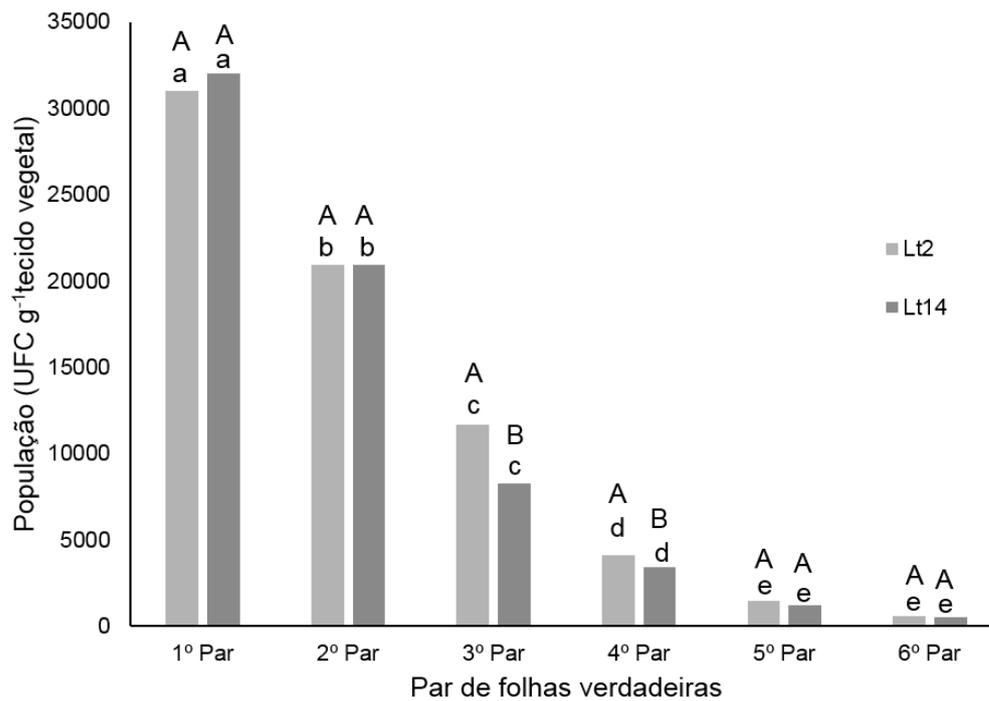
966

967

968

969

970



971

972 **Fig. 9** Colonização de *Rhodotorula aurantiaca* resistente a higromicina B, transformantes  
 973 Lt2 e Lt14, em folhas verdadeiras, a partir da inoculação do primeiro par de folhas  
 974 verdadeiras, realizada 15 dias após o semeio. As observações no primeiro par de folhas  
 975 verdadeiras foram realizadas no dia zero (2 h após a inoculação/incontáveis) e no terceiro  
 976 dia. As demais folhas não foram inoculadas. Médias seguidas pelas mesmas letras  
 977 minúsculas (diferença entre tecidos vegetais para cada isolado separadamente) e letras  
 978 maiúsculas (diferença entre isolados dentro de cada tecido da planta) não diferem  
 979 significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher (P=0,05).

980

981

982

## **Capítulo III**

---

# **Extratos aquosos de plantas da Caatinga no controle da mancha aquosa do meloeiro**

1 **Extratos aquosos de plantas da Caatinga no controle da mancha aquosa do meloeiro**

2

3 **Claudeana S. da Conceição<sup>a</sup>; Emanuel F. Assunção<sup>a</sup>; Ana Paula Sant'Anna da**  
4 **Silva<sup>b</sup>; Elizabeth R. Alexandre<sup>a</sup>, Rosa de L. R. Mariano<sup>a</sup>; Márcia Vanusa da Silva<sup>b</sup>; Marco**  
5 **Aurélio S. da Gama<sup>a</sup>; Elineide B. de Souza<sup>c</sup>**

6

7 <sup>a</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife,  
8 PE, Brasil;

9 <sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife,  
10 PE, Brazil.

11 <sup>c</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE,  
12 Brasil;

13

14 Autor para correspondência: Elineide B. Souza, e-mail: elineidebs@yahoo.com.br

15

16 **RESUMO**

17 Extratos aquosos de plantas da Caatinga de cinco espécies foram testados no controle da  
18 mancha aquosa do meloeiro pelo tratamento de sementes e proteção de plântulas e na formação de  
19 biofilme por *Acidovorax citrulli* em superfície foliar. Adicionalmente, foi realizada a microscopia  
20 eletrônica dos tecidos das plântulas tratadas. Em sementes inoculadas com *A. citrulli* por infiltração  
21 ( $3,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>), e posteriormente tratadas com os extratos brutos ou com concentrações  
22 mínimas bactericidas (CMB), obteve-se aumento do período de incubação (PI) e redução do índice  
23 da doença (ID) de até 75,6 % com os extratos brutos de *Ximenia americana*, *Maytenus rigida* e  
24 *Schinopsis brasiliensis*, e com o extrato de *Libidibia ferrea* na CMB. Os extratos de *S. obtusifolium*  
25 (bruto) e *S. brasiliensis* (CMB) também se destacaram na proteção das plântulas de meloeiro com  
26 redução do ID em níveis superiores ao tratamento com ASM. Folhas tratadas com extratos  
27 apresentaram poucos ou nenhum ponto de inoculação corado com a cor violeta na superfície foliar,

28 indicando pouca ou nenhuma formação de biofilme. O comprimento da epiderme superior das  
29 células do mesófilo de folhas cotiledonares tratadas com os extratos de *X. americana* e *S.*  
30 *obtusifolium* foi maior e melhor estruturado, além de apresentarem estômatos totalmente fechados.  
31 Pelo conjunto dos resultados, os extratos brutos de *X. americana*, *M. rigida* e *S. obtusifolium* e os  
32 extratos com CMB de *S. brasiliensis* e *L. ferrea* revelaram ser promissores no controle da mancha  
33 aquosa.

34

35 **Palavras-chave:** *Acidovorax citrulli*, biofilme, controle alternativo, MEV

36

## 37 1. INTRODUÇÃO

38 No Brasil, a cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L.) é de grande importância econômica  
39 para a região Nordeste, principal produtora e exportadora desta fruta no País (Anuário Brasileiro  
40 de Fruticultura, 2018). Porém, há muitas doenças que prejudicam a cultura, com destaque para a  
41 mancha aquosa do meloeiro, causada pela bactéria *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.) Schaad et al.  
42 No País, a doença foi detectada inicialmente em 1997, no estado do Rio Grande do Norte (Assis  
43 et al., 1999), e em seguida, no Ceará (Viana et al., 2000), Rio Grande do Sul (Ueno et al., 2003),  
44 Pernambuco e Bahia (Mariano et al., 2004) e, recentemente, no Piauí (Conceição et al., 2017).

45 A mancha aquosa encontra-se distribuída em cinco países da Ásia, quatro das Américas,  
46 dois da Europa e três da Oceania (EPPO, 2018). Nos últimos anos foi relatada na Turquia, Sérvia,  
47 Califórnia e Guadalupe (Horuz et al., 2014; Kumagai et al., 2014; Popović; Ivanović, 2015; Cuntly  
48 et al., 2018). Em consequência da distribuição mundial da doença e do seu impacto econômico, a  
49 mancha aquosa foi adicionada às listas de alerta A1 da European and Mediterranean Plant  
50 Protection Organization (EPPO) em 2014, e da Eurasian Economic Union (EAEU) em 2016, sendo  
51 o patógeno considerado como uma séria ameaça para cucurbitáceas, em particular melancia e  
52 meloeiro (EPPO, 2018).

53 Apesar da indicação de várias medidas para o controle da mancha aquosa, como utilização  
54 de sementes e mudas saudáveis, de práticas culturais adequadas e do uso de fungicidas cúpricos, estas  
55 não têm se mostrado eficientes, e novas alternativas de controle para essa doença têm sido  
56 buscadas.

57 Uma abordagem ecológica para o controle de doenças de plantas, que não seja prejudicial  
58 à agricultura, é a investigação de novos compostos obtidos de plantas de diversos domínios, com  
59 novos modos de ação. No domínio fitogeográfico Caatinga, localizado no nordeste do Brasil e  
60 norte de Minas Gerais (sudeste do Brasil), as plantas medicinais constituem um componente social  
61 e cultural importante. É um ambiente pouco estudado, especialmente para a descoberta de novas  
62 moléculas biologicamente ativas contra patógenos (Arcoverde et al., 2014). Todavia, condições  
63 extremas de estresse ambiental, o que é bem característico das regiões semiáridas, com baixa  
64 pluviosidade, temperaturas elevadas e altas taxas de evapotranspiração e incidência de luz ultra  
65 violeta (Carrara, 1996) tornam a Caatinga um domínio promissor para a descoberta de novas  
66 moléculas bioativas com diversas aplicações (Souza; Felfili, 2006; Arcoverde et al., 2014).

67 Poucos estudos foram desenvolvidos com extratos de plantas da Caatinga no controle de  
68 fitobacterioses, incluindo a mancha aquosa, e todos *in vitro*. Extratos brutos das plantas  
69 *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul e *Aspidosperma pyrifolium* Mart. foram  
70 responsáveis pela morte de células bacterianas de *A. citrulli* (Silva et al., 2016). Malafaia et al.  
71 (2018) demonstraram o potencial biotecnológico de extratos de plantas da Caatinga como  
72 *Crotonhelio tropiifolius* Kunth, *Eugenia brejoensis* Mazine e *Libidibia ferrea* (Mart. exTul.) L.P.  
73 que se mostraram eficazes em inibir o crescimento de *R. solanacearum*.

74 Estudos *in vivo* são necessários para determinar a real eficácia de extratos com atividade  
75 antibacteriana determinada *in vitro*, no controle das doenças de plantas. Além da detecção da  
76 redução da severidade da doença através da determinação de componentes epidemiológicos, é  
77 importante a observação em nível histológico do que ocorre qualitativamente e quantitativamente,

78 ou seja, a reação das plantas aos tratamentos, em nível microscópico, o que também pode elucidar  
79 mecanismos de ação dos extratos no controle da doença.

80 *Acidovorax citrulli* é uma bactéria que produz biofilme (Bahar et al., 2010; Malafaia et al.,  
81 2018; Tian et al., 2015), e isolados brasileiros foram classificados de fracos a fortes produtores de  
82 biofilme em superfícies de poliestireno (Malafaia et al., 2018). Uma das estratégias eficientes no  
83 controle de doenças de plantas é impedir a formação do biofilme ou erradicá-lo. Alguns estudos  
84 têm evidenciado a ação antibiofilme de extratos de plantas medicinais da Caatinga, porém, nenhum  
85 deles com *A. citrulli*. Atividade antibiofilme de extratos de plantas da Caatinga foi avaliada em  
86 relação a três isolados de *R. solanacearum*, dentre os extratos utilizados *Harpochilus neesianus*  
87 Mart. ex Nees e *Myroxylon peruiferum* L. F. apresentaram atividade antibiofilme superior a 50%  
88 para todos os isolados (Malafaia et al. 2018).

89 Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: (1) determinar a eficácia de extratos de  
90 espécies botânicas coletadas na Caatinga no controle da mancha aquosa do meloeiro através do  
91 tratamento de sementes e proteção de plântulas; (2) investigar a atividade de extratos sobre o  
92 formação de biofilme de *A. citrulli* em superfície foliar e (3) realizar análises microscópicas dos  
93 tecidos das plantas tratadas.

94

## 95 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### 96 **2.1. Isolado bacteriano e condições de cultivo**

97 Foi utilizado o isolado Aac1.12 de *A. citrulli*, oriundo de fruto de meloeiro, pertencente à  
98 Coleção de Culturas Rosa Mariano (CRM) do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE. A  
99 bactéria foi cultivada em ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYDA) (10 g dextrose, 3 g  
100 extrato de carne, 5 g extrato de levedura, 5 g peptona e 20 g ágar L<sup>-1</sup>) e incubada por 48 h a 28±2°C.  
101 As suspensões utilizadas nos experimentos foram ajustadas em espectrofotômetro (Analyser 500  
102 M, Brasil) para A<sub>570</sub> = 0,25, que corresponde a 3,4 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

103

## 104 2.2. Material vegetal

105 O material vegetal foi coletado na Caatinga, em vários pontos dentro do Parque Nacional  
106 do Catimbau, Pernambuco, Brasil. As espécies foram identificadas e depositadas no Herbário do  
107 Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) e um Voucher para cada espécime foi gerado. De  
108 várias espécies coletadas, foram escolhidas aleatoriamente cinco espécies (Tabela 1). Os tecidos  
109 vegetais recolhidos foram separados e secos a 40°C durante 3 a 4 dias. Posteriormente, foram  
110 pulverizados em liquidificador e armazenados, devidamente identificados, a 4 °C.

111

## 112 2.3. Extratos aquosos

113 O pó dos tecidos vegetais (10g) dos cinco extratos foi submetido à extração por decocção  
114 em água destilada (100mL) em banho-maria a 100°C por 30 min. Após a extração, o material foi  
115 filtrado em camada dupla de gaze esterilizadas e acondicionado em recipientes de vidro.

## 116 Tratamento de sementes de meloeiro com extratos vegetais para o controle da mancha 117 aquosa

118 Foram utilizados os extratos aquosos nas concentrações de 100% (extrato bruto) e nas  
119 concentrações mínimas bactericiadas (CMB) determinadas em ensaios preliminares *in vitro* [*L.*  
120 *ferrea* = 6,25 mg mL<sup>-1</sup>; *Maytenus rigida* Mart. = 25 mg mL<sup>-1</sup>, *Schinopsis brasiliensis* Engl. = 0,024  
121 mg mL<sup>-1</sup>, *Ximenia americana* L. = 6,25 mg mL<sup>-1</sup> e *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.)  
122 T.D.Penn. = 25 mg mL<sup>-1</sup>].

123 As sementes de meloeiro (cv. Amarelo) foram imersas por duas horas, sob agitação leve,  
124 em 50 mL de suspensão de *A. citrulli* Aac1.12 (3,4 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) e postas para secar por 16 h  
125 a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Logo após, foram tratadas por 30 minutos, separadamente, em  
126 25 mL da solução dos extratos vegetais (extratos brutos e CMB's de cada extrato). Em seguida,  
127 foram semeadas em bandejas de polietileno (JKS industrial LTDA<sup>®</sup>), contendo substrato Basaplant  
128 (BaseAgro<sup>®</sup>), e mantidas em casa de vegetação. Quando as plântulas emergiram foram submetidas  
129 à câmara úmida por 24 h. Após retirada da câmara úmida, as plântulas foram avaliadas diariamente

130 por seis dias, quanto ao aparecimento dos sintomas e severidade da doença, com auxílio de uma  
131 escala descritiva. Foi utilizada a escala descritiva de Araújo et al. (2005), variando de 0 a 5, onde:0  
132 - plântulas sem sintomas; 1 - plântulas com lesões marginais em até 50% de uma ou ambas as  
133 folhas cotiledonares; 2 - plântulas com lesões marginais em até 75% de ambas as folhas  
134 cotiledonares, poucas lesões no centro do limbo, deformação foliar leve; 3 - plântulas com lesões  
135 marginais em 100% de ambas as folhas cotiledonares, muitas lesões no centro do limbo,  
136 deformação foliar acentuada, enfezamento; 4 - plântulas com lesões marginais em 100% de ambas  
137 as folhas cotiledonares, muitas lesões no centro do limbo progredindo para o hipocótilo,  
138 deformação foliar total, enfezamento; 5 - necrose total das folhas cotiledonares e hipocótilo,  
139 tombamento e morte. Com os dados obtidos foi determinado o período de incubação (PI), sendo  
140 que nas plântulas sem sintomas foi acrescentado um dia à última avaliação (Iamsupasit et al.,  
141 1993); e índice de doença (ID), calculado pela fórmula de McKinney (1923). O delineamento  
142 experimental foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos e cinco repetições, sendo cada  
143 repetição constituída por 10 sementes. Nesse e no experimento posterior, como controle positivo  
144 foi utilizado acibenzolar-S-methyl (ASM) (Bion500 WG, Syngenta) na concentração de 50 mg i.a.  
145 L<sup>-1</sup> (Cabral et al., 2010), e como controle negativo as plântulas foram tratadas com ADE e  
146 inoculadas com *A. citrulli*. Para melhor aderência o surfactante Tween 80 a 0,03% (v/v) foi  
147 adicionado às suspensões de todos os tratamentos.

148

## 149 **2.5. Proteção de plântulas de meloeiro com extratos vegetais para o controle da mancha** 150 **aquosa**

151 As folhas cotiledonares de plântulas com 6 dias de cultivo em vasos de 300 mL contendo  
152 substrato Basaplant foram pulverizadas com a solução dos extratos vegetais brutos e CMB's. Após  
153 24h foram então pulverizadas com a suspensão de *A. citrulli* até o escorrimento (Araújo et al.  
154 2005). As mudas foram submetidas à câmara úmida de pré e pós-inoculação por 24 h, sendo  
155 mantidas em casa de vegetação. Após a retirada da câmara úmida de pós-inoculação, foi iniciada

156 a avaliação do PI e da severidade da doença. Na avaliação da severidade da doença foi utilizada a  
157 escala descritiva, variando de 0 a 5, na qual 0 = plântulas sem sintomas; 1 a 4 = plântulas com  
158 lesões marginais em uma ou ambas as folhas cotiledonares, variando de 1 a 25%, 26 a 50%, 56 a  
159 75% e de 76 a 100%, respectivamente; e 5 = necrose total das folhas cotiledonares e hipocótilo,  
160 tombamento e morte de (Araújo et al., 2005). Com os dados de severidade foi calculado o ID. O  
161 delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos e cinco repetições,  
162 sendo cada repetição constituída por cinco plântulas.

163

## 164 **2.6. Atividade antibiofilme dos extratos aquosos em superfície foliar**

165 As folhas de meloeiro foram pulverizadas com os extratos brutos de *X. americana*, *M.*  
166 *rigida* e *S. obtusifolium*, e os extratos em CMB de *S. brasiliensis* e *L. ferrea*, e mantidas em câmara  
167 úmida por 24 h. Em seguida, com auxílio de uma seringa sem a agulha, foram feitos pontos de  
168 inoculação com a suspensão de *A. citrulli* na superfície abaxial das folhas de meloeiro, até o  
169 encharcamento do tecido, e novamente colocadas em câmara úmida de pós inoculação por 24 h.  
170 Para avaliação da formação de biofilme sobre a superfície foliar, 48 h após a inoculação as folhas  
171 foram destacadas, e imersas em 0,1% cristal violeta (CV) por 30 minutos, em seguida foram  
172 lavadas com água corrente para retirada do excesso do corante. Foi realizada a análise visual da  
173 presença de coloração violeta ou não nas lesões das folhas inoculadas, indicativa da formação de  
174 biofilme. As folhas inoculadas apenas com *A. citrulli* também foram visualizadas em microscópio  
175 óptico de luz. O ensaio teve quatro repetições, representadas por quatro folhas.

176

## 177 **2.7. Análise de microscopia óptica do mesofilo de folhas cotiledonares de meloeiro tratados** 178 **com extratos vegetais**

179 Seções do tecido do mesofilo de folhas de meloeiro cv. Amarelo oriundas das plântulas  
180 previamente tratadas com os extratos (48 horas após inoculação) foram fixadas em FAA  
181 (formaldeído 37%, etanol 70% e ácido acético) seguida de desidratação em diferentes

182 concentrações de álcool, clarificação com xilol e infiltração, inclusão em parafina, e montagem  
183 dos blocos com secção em micrótomo em 3  $\mu\text{m}$  seguida da coloração com Hematoxilina-Eosina,  
184 de acordo com a metodologia de Molinaro et al. (2010). As imagens microscópicas foram obtidas  
185 em microscópio de luz composto (Nikon Eclipse INU) para inferências qualitativas. Foram  
186 mensuradas o comprimento da camada de células da epiderme superior (CEPS) e da camada  
187 abaixo da epiderme superior até a epiderme inferior do mesófilo foliar (CTM) utilizando o  
188 software NIKON Elements. Como controle foram utilizadas folhas cotiledonares sem nenhum  
189 tratamento (controle absoluto) e apenas inoculadas com *A. citrulli* (controle positivo).

190

## 191 **2.8. Análise de microscopia eletrônica de varredura do mesófilo de folhas cotiledonares de** 192 **meloeiro tratados com extratos vegetais**

193 Após 48 h da inoculação e tratamento de plântulas de meloeiro cv. Amarelo, fragmentos  
194 seccionados do mesófilo foram fixadas em FAA (formaldeído 37%, etanol 70% e ácido acético)  
195 seguida de desidratação em álcool etílico PA a 70%. Utilizou-se a metodologia adaptada de  
196 Fonseca et al. (2005) onde fragmentos foram mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h e liofilizados. Após esse  
197 período as amostras foram metalizadas com ouro a 10 nm em metalizador Desk V (Dentom  
198 Vacuum) e então foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, VEGA 3,  
199 República Theca) a 15 kV, e as imagens digitais analisadas. Mensurações do comprimento x  
200 larguras células ( $\mu\text{m}$ ) foram realizadas no CMEIAS 1.28 software (Liu et al., 2001). Como  
201 controles foram utilizadas folhas cotiledonares sem nenhum tratamento (controle absoluto) e  
202 inoculadas com *A. citrulli* (controle positivo). A análise de MEV também foi correlacionada com  
203 os sintomas da doença nas folhas cotiledonares.

204

## 205 **2.9. Análises estatísticas**

206 Todos os experimentos foram conduzidos duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos  
207 à ANOVA e considerados estatisticamente significativos quando comparados pelos testes de

208 Student, Tukey ou/e teste de Kruskal-Wallis, ambos ao nível de 5% de probabilidade, utilizando  
209 o software STATISTIX 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

210

### 211 **3. RESULTADOS**

#### 212 **3.1. Tratamento de sementes de meloeiro com extratos vegetais para o controle da mancha** 213 **aquosa**

214 Plântulas oriundas de sementes tratadas com os extratos brutos de *X. americana*, *M. rigida*,  
215 *S. brasiliensis*, *S. obtusifolium* e *L. ferrea*, apresentaram PI da doença de 4,5; 4,3; 3,8; 3,3 e 2,7  
216 dias, respectivamente, diferindo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) do controle (1,5 dias) (Tabela 2). O  
217 mesmo ocorreu com os extratos de *L. ferrea*, *S. brasiliensis*, *M. rigida*, e *S. obtusifolium* na CMB,  
218 com PI de 4,5; 3,6; 3,5; e 3,4 dias, respectivamente. Quanto ao ID, a maioria dos extratos diferiram  
219 significativamente em relação ao controle. Os Melhores resultados foram obtidos com os extratos  
220 brutos de *X. americana*, *M. rigida*, e *S. brasiliensis*, e com o extrato de *L. ferrea* na CMB, que  
221 reduziram o ID em 65%; 72,5%; 60,9% e 75,6 %, respectivamente. Já os extratos brutos de *L.*  
222 *ferrea* e *S. obtusifolium* e a CMB de *X. americana* não diferiram significativamente do controle  
223 (Tabela 2).

224

#### 225 **3.2. Proteção de plântulas de meloeiro com extratos vegetais para o controle da mancha** 226 **aquosa**

227 Quando os extratos foram pulverizados nas plântulas visando a proteção contra a infecção  
228 por *A. citrulli*, todos os tratamentos diferiram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) do controle quanto ao  
229 PI e ID (Tabela 2). Considerando essas duas variáveis, os melhores resultados foram obtidos com  
230 os extratos brutos de *S. obtusifolium* e *X. americana* que apresentaram PIs de 6,9 e 6,0 dias e  
231 redução do ID de 99,1% e 88,7%, respectivamente; e com os extratos em CMB de *S. brasiliensis*  
232 e *X. americana* com PI de 6,8 e 6,0 dias e redução de ID de 76,1 e 89,6, respectivamente. Os

233 extratos de *S. obtusifolium* (bruto) e de *S. brasiliensis* (CMB) aumentaram o PI e reduziram o ID  
234 em níveis superiores ao tratamento com ASM (Tabela 2).

235

### 236 **3.3. Atividade antibiofilme de extratos aquosos em superfície foliar de meloeiro**

237 Em superfície foliar, o isolado Aac 1.12 de *A. citrulli* foi capaz de formar biofilme nos  
238 pontos de inoculação nas folhas de meloeiro cv. Amarelo e estômatos colonizados foram  
239 visualizados em microscópio óptico (Figura 1). Quando comparado com o controle positivo, nas  
240 folhas tratadas com os extratos brutos de *X. americana*, *M. rigida* e *S. obtusifolium*, e com os  
241 extratos com CMB de *S. brasiliensis* e *L. ferrea* foram observados poucos ou nenhum ponto de  
242 inoculação corado com CV. O ASM mostrou baixa capacidade de inibição do biofilme de *A.*  
243 *citrulli* (Figura 2).

244

### 245 **3.4. Análise de microscopia óptica do mesófilo de folhas cotiledonares de meloeiro tratados** 246 **com extratos vegetais**

247 Foi verificado o efeito dos extratos no controle da mancha aquosa pela observação da  
248 estrutura anatômica do mesófilo de folhas cotiledonares de meloeiro em microscopia ótica de luz.  
249 O CTM do mesófilo de plântulas sob efeito do extrato de *X. americana*, *M. rigida*, e *S. brasiliensis*  
250 não diferiram do controle absoluto ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 3). O CEPS das células de plântulas tratadas  
251 com os extratos de *X. americana* e *S. obtusifolium* foi maior e melhor estruturado, no entanto não  
252 diferiram ( $P \leq 0,05$ ) daquelas tratadas com *L. ferrea*, *M. rigida* e do controle absoluto; o ASM  
253 diferiu significativamente do controle absoluto para o CTM (Tabela 3).

254 Nas plântulas tratadas com o extrato de *S. obtusifolium* (Figura 3A) foi possível verificar  
255 nas folhas cotiledonares tecidos menos agregados e a presença de áreas vacuoladas no tecido do  
256 parênquima paliçádico (PP) e no parênquima esponjoso (PE), com comprometimento da epiderme  
257 inferior (EIN). Verificou-se também nos tecidos do mesófilo da epiderme superior (ES) espessa e  
258 área foliar com excelente arranjo estrutural (Figura 3A). O mesófilo de plântulas tratadas com *X.*

259 *americana* foi o que apresentou uma melhor estrutura anatômica (Figura 3D); a estrutura do  
260 mesófilo de folhas tratadas com os extratos de *M. rigida* (Figura 3B) e *L. ferrea* (Figura 3H)  
261 apresentaram comportamento intermediário, comparando-se a um desarranjo celular parcial de PP  
262 e PE, de forma semelhante ao controle inoculado com *A. citrulli*, sem tratamento (Figura 3G). Nas  
263 folhas cotiledonares tratadas com *S. brasiliensis* os tecidos estavam menos agregados, com  
264 presença de áreas vacuoladas no tecidos do PP e PE (Figura 3F).

265

### 266 **3.5. Análise de microscopia eletrônica de varredura do mesófilo de folhas cotiledonares de** 267 **meloeiro tratados com extratos vegetais**

268 A análise em nível ultraestrutural, observada pela MEV, foi correlacionada com os  
269 sintomas da doença. Foi possível verificar no mesófilo de folhas cotiledonares expostas ao extrato  
270 de *L. ferrea* uma maior desintegração do tecido (Figura 4-A1), proporcionando a formação de  
271 biofilme de *A. citrulli* nos estômatos e entorno (Figura 5-B1), embora seja difícil distinguir se tratar  
272 ou não de um resíduo do extrato (Figura 4-C1), pois não é observado o coalescimento das lesões  
273 (Figura 5-A1, 5-B1). O extrato de *S. brasiliensis* não comprometeu a superfície foliar (Figura 4-  
274 A2), no entanto há uma grande quantidade de estômatos abertos (Figura 4-C2); houve a presença  
275 de lesões do tipo anasarca (Figura 5-A2; 5-B2). Uma quantidade significativa de estômatos  
276 fechados (Figura 4-B3) e resíduo no entorno dos estômatos (Figura 4-C3) são visualizado nas  
277 folhas cotiledonares de meloeiros tratados com extrato de *X. americana*, coincidindo com menor  
278 colonização da área foliar (Figura 5-A3), com áreas pontuais de anasarca do tecido, sem  
279 coalescimento das lesões (Figura 5-B3). De forma similar, a área foliar de meloeiro tratada com  
280 extrato de *S. obtusifolium* apresentou estômatos totalmente fechados (Figura 4-B4). O extrato de  
281 *M. rígida* exerceu um efeito de abertura parcial dos estômatos (Figura 4-B5 e C5), que pode  
282 parcialmente explicar a redução de áreas de anasarca (Figura 5-A5 e B5) sem coalescimento. Nas  
283 plantas sem tratamentos, a colonização de *A. citrulli* foi responsável por todo comprimento da área  
284 foliar com anasarca e coalescimento das áreas afetadas (Figura 5-A7 e B7).

## 285 DISCUSSÃO

286 Doenças causadas por infecções bacterianas estão entre as preocupações do setor  
287 produtivo. Em meloeiro *A. citrulli* já chegou a causar perda de 100% na produção em períodos  
288 chuvosos (Sales Júnior & Menezes, 2001), o que justifica a busca por alternativas de controle da  
289 doença, e entre estas, o uso de extratos de plantas.

290 A Caatinga, localizada no Nordeste do Brasil, é um domínio que tem características  
291 climáticas que a tornam um ambiente com um tipo de vegetação peculiar, com grande potencial  
292 na detecção de novas moléculas bioativas com diversas aplicações, incluindo o controle de  
293 fitopatógenos (Malafaia et al., 2017). Foram testados cinco extratos aquosos no controle da  
294 mancha aquosa. O aumento do PI e a redução do ID foram obtidos pela imersão ou pulverização  
295 de sementes e plântulas de meloeiro, respectivamente, nos extratos aquosos da Caatinga brutos  
296 e/ou em CMB's. No tratamento de sementes, destacaram-se na redução do índice da doença da  
297 mancha aquosa o extrato de *L. ferrea* (76%), *M. rigida* (72%) *X. americana* (65%), *S. brasiliensis*  
298 (60,1%) e a CMB de *S. brasiliensis* (61%). Na proteção de plântulas, o extrato de *S. obtusifolium*  
299 e *S. brasiliensis* se destacaram quanto ao aumento do PI, e para o ID, o extrato de *S. obtusifolium*  
300 com redução do ID em 99%, praticamente uma proteção de 100% de controle a partir da  
301 pulverização do extrato. Inclusive, os extratos de *S. obtusifolium* (bruto) e de *S. brasiliensis* (CMB)  
302 foram mais eficientes do que o ASM no controle da mancha aquosa (Tabela 2). Esses resultados  
303 são de grande relevância, visto que as lesões foliares atuam como fonte de inóculo para os frutos  
304 durante o ciclo da doença (Latin & Hopkins, 1995). Através do perfil fitoquímico e HPLC desses  
305 extratos serão determinados os compostos bioativos envolvidos no controle de *A. citrulli*.

306 Os extratos de *S. brasiliensis* e *L. ferrea* em CMB inibiram a formação de biofilme por *A.*  
307 *citrulli*. O biofilme está envolvido nos mecanismos de patogênese e virulência a bactéria ao  
308 meloeiro (Bahar et al., 2010; Malafaia et al., 2018; Tian et al., 2015).

309 O indutor ASM foi utilizado como controle positivo nesse estudo, por ser um produto  
310 registrado para o patossistema meloeiro x mancha aquosa no Brasil (Agrofit, 2003), com eficácia

311 no controle da mancha aquosa quando comparado a outros defensivos e indutores usados por  
312 produtores e também em pesquisas em condições de campo (Sales Junior et al., 2007) e de casa de  
313 vegetação (Cabral et al., 2010). Os resultados aqui obtidos confirmam a eficiência do ASM no  
314 controle da mancha aquosa em relação ao PI e ID, tanto para sementes quanto para plântulas,  
315 mesmo não obtendo bons resultados em relação à inibição de biofilme da bactéria.

316 O CTM do mesofilo de folhas cotiledonares de meloeiro tratadas com extratos de *X.*  
317 *americana* e *S. obtusifolium* e o CEPS que foram maiores e melhores estruturados, não diferindo  
318 do *L. ferrea*, *M. rigida* e nem do controle absoluto, indicando que os extratos não interferem no  
319 arranjo estrutural, conseqüentemente, não interferem na fisiologia da planta.

320 O extrato de *S. obtusifolium* mostra ser rico em flavonoides, que são relatados por atuar dentre  
321 outras vias e funções celulares, sobre a succinoxidase na mitocôndria e na NADPH oxidase  
322 (Araújo-Neto et al. 2010). Sua atividade antifúngica foi demonstrada, no qual extrato bruto foi  
323 capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, que pode ser atribuída pelo efeito dos  
324 compostos fitoquímicos das classes dos polifenóis e taninos presente no extrato bruto de *S.*  
325 *obtusifolium* (Sampaio et al., 2017). Dentre os extratos utilizados no presente estudo, o extrato da  
326 *X. americana* é um do mais rico em compostos ácidos, que possui muito fenóis e  
327 comprovadamente efetivo sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Kiessoun et al.  
328 2018). O mesofilo de plântulas tratadas com *X. americana* foi o que apresentou uma melhor  
329 estrutura anatômica, com poucas áreas vacuolizadas entre o tecido parenquimatoso, destacando  
330 ainda, uma ES espessa e sem desintegração, o qual, possivelmente restringiu a colonização de *A.*  
331 *citrulli*, mostrando que esse extrato além de atuar diretamente sobre o bactéria, não afeta o mesófilo  
332 da planta. O extrato de *S. brasiliensis* também proporcionou um bom arranjo do mesófilo de  
333 plântulas de meloeiro, comportando-se de forma intermediária.

334 A grande quantidade de estômatos abertos no tratamento com *S. brasiliensis* (Figura 4-C2)  
335 pode ser devido à baixa quantidade de resíduo do extrato sob a superfície foliar, o que  
336 possivelmente facilitou a penetração e colonização do tecido por *A. citrulli*. No entanto, é

337 conhecido que a *S. brasiliensis* possui atividade que modula o crescimento de bactérias, reduzindo  
338 a concentração mínima inibitória (Guimarães, 2013; Silva et al. 2017), como também comprovado  
339 no presente estudo. Dessa forma, esse extrato exerceu controle da mancha aquosa, o que pode estar  
340 diretamente relacionado à sua composição química, pois os compostos secundários como  
341 compostos fenólicos, taninos e saponinas já foram apontados como responsáveis pela atividade  
342 antimicrobiana tanto bacteriana quanto fúngica (Guimarães et al. 2010; Saraiva 2011). Uma  
343 quantidade significativa de estômatos fechados em plântulas de meloeiro tratadas com *X.*  
344 *americana* e *S. obtusifolium* indicam que o extrato resultou na formação de uma barreira protetora  
345 ao desenvolvimento de *A. citrulli*, induzindo o fechamento estomático.

346 Nas plântulas inoculadas apenas com *A. citrulli* verificou-se um desarranjo celular parcial  
347 de PP e PE. Isso indica uma rápida multiplicação bacteriana nos espaços intercelular, sendo que  
348 uma vez dentro do tecido foliar do meloeiro, leva ao colapso das células parenquimatosas e no  
349 qual resulta em lesões necróticas. Quanto menos vacuolização tenha sido observada, melhor  
350 retratada é a eficiência dos extratos no controle da colonização de bactéria (Makizumi et al. 2011).  
351 Quando observadas as estruturas dos controles absolutos e relativos pode-se verificar que os  
352 extratos exerceram efeito significativo sobre a redução da incidência da mancha aquosa.

353

## 354 **CONCLUSÕES**

355 O trabalho demonstrou o potencial biotecnológico de extratos da Caatinga no controle de doenças  
356 de plantas. Os extratos aquosos brutos de *X. americana*, *M. rigida* e *S. obtusifolium*, e os extratos  
357 com CMB de *S. brasiliensis* e *L. ferrea* revelaram ser promissores no controle da mancha aquosa,  
358 além de apresentarem efeito antibiofilme em superfície foliar e por manterem uma boa estrutura  
359 celular da planta. Esse é o primeiro relato do efeito de plantas da Caatinga brasileira sobre a  
360 atividade de uma bactéria fitopatogênica *in vivo*, de relevante impacto na cultura de meloeiro e  
361 outras cucurbitáceas.

362

363 **AGRADECIMENTOS**

364 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de  
365 Financiamento 001, através da concessão da bolsa de estudo a Claudeana S. Conceição. A UFRPE  
366 pelo apoio a pesquisa (Edital PRPPG 015/2018).

367

368 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

369 Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2003. Disponível em: [www.agrofit.agricultura.gov.br / agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://www.agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acessado em 12 de novembro de 2018.

371 Amorim EPR, Andrade FWR, Moraes EMS, Silva JC, Lima RS, Lemos EEP (2011) Atividade  
372 antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de  
373 *Ralstoniasolanacearum* em mudas de bananeira. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal  
374 E:392-398.

375 Anuário Brasileiro de Fruticultura. Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Editora, Gazeta Santa  
376 cruz, 2018. 88 p. Disponível em:< <http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eoedicao>>. Acesso em  
377 julho de 2018.

378 Araújo DV, Mariano RLR, Michereff SJ (2005) Inoculationmethodsof*Acidovoraxavenaesubsp.*  
379 *citrulli* in melon. SummaPhytopathologica 31:69-73.

380 Araújo-Neto V, Bomfim RR, Oliveira VOB, Passos AMPR, Oliveira JPR, Lima CA, Mendes SS,  
381 Estevam CS, Thomazzi SM (2010) Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex  
382 Roem. & Schult.) T.D. Penn. Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. Revista  
383 Brasileira de Farmacognosia, 20:933-938.

384 Arcoverde JH, Carvalho AS, Neves FP, Dionízio BP, Pontual EV, Paiva PM, Napoleão TH,  
385 Correia MT, Silva MV, Carneiro-Da-Cunha M (2014) Screening of Caatinga plants as sources of  
386 lectins and trypsin inhibitors. Natural ProductResearch28:1297-1301.

- 387 Assis SMP, Mariano RLR, Silva-Hanlin DMW, Duarte V (1999) Mancha-aquosa do melão  
388 causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* no Estado do Rio Grande do Norte.  
389 Fitopatologia Brasileira 24:191.
- 390 Bahar, O.; DE LA Fuente, L.; Burdman, S. (2010) Assessing adhesion, biofilm formation and  
391 motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. FEMS Microbiology Letters  
392 312:33-39.
- 393 Cabral CP, Gama MAS, Alexandre ER, Mariano RLR, Silveira EB (2010) Efeito de acibenzolar-  
394 S-metil, mananoligossacarídeo e bioflavonóides cítricos no controle da mancha-aquosa e no  
395 crescimento do meloeiro. Tropical Plant Pathology 35:119-123.
- 396 Carrara AA (1996) O “sertão” no espaço econômico da mineração, LPH. Revista de História da  
397 Universidade Federal de Sergipe 1:40-48.
- 398 Conceição CS, Assunção EF, Rezende JS, Morais RF, Silva AMF, Gama MAS, Souza EB (2017)  
399 Ocorrência de mancha aquosa em melancia e meloeiro no estado do Piauí. In: Congresso  
400 Brasileiro de Fitopatologia, 50. Uberlândia. Anais...Viçosa: SBF.
- 401 Cuntz A, Audusseu C, Paillard S, Olivier V, François RC, Poliakov F (2018) First report of  
402 *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch, on melon (*Cucumis melo*) in  
403 Guadeloupe (France) Plant Disease.
- 404 Deberdt P, Perrin B, Coranson-Beaudu R, Duyck PF, Wicker E (2012) Effect of *Allium fistulosum*  
405 extract on *Ralstonia solanacearum* populations and tomato bacterial wilt. Plant Disease 96:687-  
406 692.
- 407 EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Acidovorax citrulli*  
408 PSDMAC.2018. Disponível em: <<https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/distribution>>. Acesso em:  
409 22 mar. 2019.
- 410 Guimarães GP (2010) Atividade antifúngica de plantas medicinais frente a espécies de *Candida*  
411 de interesse médico. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual da Paraíba.

- 412 Guimarães, PG (2013) Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de *Schinopsis brasiliensis* e  
413 *Euphorbiatrigona* contra microrganismos fitopatogênicos de interesse na agricultura. Dissertação  
414 de Mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga BA.
- 415 Horuz S, Cetinkaya-Yildiz R, Mirik M, Aysan Y (2014) Occurrence, isolation, and identification of  
416 *Acidovorax citrulli* from Melon in Turkey. *Plant Protection Science* 50:179-183.
- 417 Iamsupasit N, Chakraborty S, Cameron DF, Adkins SW (1993) Components of quantitative  
418 resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloesporioides*) in tetraploid accessions of the pasture  
419 legume *Stylosanthes hamata*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 33:855-860.
- 420 Kiessoun K, Roland MNT, Mamounata D, Yomalan K, Sytar O, Souza A, Brestic M, Dicko MH  
421 (2018) Antimicrobial profiles, antidiarrheal and antipyretic capacities of phenol acid rich-fractions  
422 from *Ximenia americana* L., (Olacaceae) in wistar albino rats. *International Journal of Pharmacy and*  
423 *Pharmaceutical Sciences* 10:1-7.
- 424 Kumagai LB, Woods PW, Walcott R, Moua X (2014) First report of bacterial fruit blotch on melon  
425 caused by *Acidovorax citrulli* in California. *Plant Disease* 98:1423.
- 426 Latin R, Hopkins DL (1995) Bacterial fruit blotch of watermelon. The hypothetical exam question  
427 becomes reality. *Plant Disease* 79:761-765.
- 428 Liu JFB, Dazzo O, Glagoleva B, Yu AKJ (2001) CMEIAS: A computer-aided system for the image  
429 analysis of bacterial morphotypes in microbial communities. *Microbial Ecology* 41:173-194.
- 430 Makizumi Y, Igarashi M, Gotoh K, Murao K, Yamamoto M, Udonsri N, Ochiai H,  
431 Thummabenjapone P, Kaku H (2011) Genetic diversity and pathogenicity of cucurbit-associated  
432 *Acidovorax*. *Journal of General Plant Pathology* 77:24-32.
- 433 Malafaia CB, Jardelino ACS, Silva AG, Souza EB, Macedo AJ, Correial MTS, Silva MV (2018)  
434 Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia*  
435 *solanacearum*. *Microbial Ecology* 75:555-561.

- 436 Malafaia CB, Barros MP, Macedo AJ, Guerra ML, Souza EB, Correia MTS, Silva MV (2018)  
437 Biofilm Formation by Phytopathogenic Bacteria *Acidovorax citrulli* and *Ralstonia solanacearum*,  
438 Journal of Environmental Analysis and Progress 3:347-355.
- 439 Mckinney RH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings  
440 by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research 6:195-218.
- 441 Meziani S, Oomah BD, Zaidi F, Simon-Levert A, Bertrand C, Zaidi-Yahiaoui R (2015)  
442 Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria  
443 *Pectobacterium atrosepticum*. Microbial Pathogenesis 78:95e102
- 444 Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeiro MR (2010) Conceitos e métodos para a formação de  
445 profissionais em laboratório de saúde. Fiocruz: São Paulo, 2010. p.89-174.
- 446 Popović T, Ivanović Ž (2015) Occurrence of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of  
447 watermelon in Serbia. Plant disease 99:886.
- 448 Sales Júnior R, Menezes JB (2001) Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do  
449 cultivo do melão no Estado do RN. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró.  
450 Relatório Técnico. Rio Grande do Norte.
- 451 Sales Júnior R, Pontes Filho FST, Nunes GHS, Torre, GRC (2007) Eficiência de Acibenzolar-S-  
452 Methyl e oxiclóreto de cobre no controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da  
453 “mancha-aquosa” no meloeiro. Revista Biologia e Ciência da Terra 7:66-71.
- 454 Sampaio TPD, Cartaxo-Furtado AOA, Medeiros ACD, Alves H, Rosalen PL, Pereira JV (2017)  
455 Antimicrobial potential of plant extracts and chemical fractions of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. &  
456 Schult.) T.D. Penn on oral microorganisms. The Journal of Contemporary Dental Practice 18:392-  
457 398.
- 458 Saraiva M (2011) In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of  
459 extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). African Journal of Pharmacy and  
460 Pharmacology 5:1724-1731.

- 461 Silva AH, Costa AMM, Pinheiro ACD, Alves MC, Silva KN (2017) Revisão das atividades  
462 biológicas de *Schinopsis brasiliensis* Engler, espécie nativa da caatinga. In: II Congresso  
463 Internacional da Diversidade do Semiárido, 11p. Disponível em:  
464 [http://www.editorarealize.com.br/revistas/conidis/trabalhos/TRABALHO\\_EV074\\_MD1\\_SA10\\_](http://www.editorarealize.com.br/revistas/conidis/trabalhos/TRABALHO_EV074_MD1_SA10_ID522_20102017221141.pdf)  
465 [ID522\\_20102017221141.pdf](http://www.editorarealize.com.br/revistas/conidis/trabalhos/TRABALHO_EV074_MD1_SA10_ID522_20102017221141.pdf). Acesso em Janeiro 2018.
- 466 Silva CMA, Costa BMS, Silva AG, Souza EB, Silva MV, Correia MTS, Silva AP, Lima VLM  
467 (2016) Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic  
468 bacteria. African Journal of Microbiology Research 10:578-583.
- 469 Souza CD, Felfili JM (2006) Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. Acta  
470 Botânica Brasileira 20:135-145.
- 471 Tian Y, Zhao Y, Wu X, Liu F, Hu B, Walcott R (2015) The type VI protein secretion system  
472 contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon.  
473 Molecular Plant Pathology 16:38-47.
- 474 Ueno B, Couto MEO, Uesugi CH (2003) Ocorrência de mancha-aquosa em melão no estado do  
475 Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 28:246.
- 476 Viana FMP, Santos AA, Cardoso JE, Freire, FCO, Lopes CA (2000) Surto da mancha-aquosa em  
477 frutos de melão nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte: recomendações preliminares de  
478 controle. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Comunicado Técnico, 50) 4p.
- 479 Zacaroni AB (2008) Formulações à base de extratos vegetais combinados ou não com indutores  
480 de resistência e fertilizantes foliares no manejo de bacterioses do algodoeiro e do feijoeiro.  
481 Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. Lavras MG.
- 482
- 483
- 484
- 485
- 486

487 **Tabela 1.** Plantas coletadas na Caatinga, Pernambuco, Brasil, e empregadas neste estudo.

488

Espécie	Nome popular	Família	Órgão vegetal	Voucher
<i>Libidibiaferrea</i> (Mart. exTul.) L.P.Queiroz var. <i>ferrea</i>	Pau-ferro	Fabaceae (Caesalpinioideae)	Folhas	IPA 84035
<i>Maytenusrigida</i> Mart.	Bomnome	Celastraceae	Cascas	IPA 95169
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	Braúna	Anacardiaceae	Folhas	IPA 95154
<i>Sideroxylonobtusifolium</i> (Roem. &Schult.) T.D. Penn.	Quixabeira	Sapotaceae	Folhas	IPA 84076
<i>Ximenia americana</i> L.	Ameixa	Olacaceae	Folhas	IPA 96261

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505 **Tabela 2.** Eficiência dos tratamentos de sementes e proteção de plântulas de meloeiro com extratos  
 506 aquosos de plantas da Caatinga no controle da mancha aquosa.

Tratamento <sup>1</sup>	Sementes <sup>2</sup>		Plântulas <sup>3</sup>	
	PI (dias)	ID (%) <sup>5</sup>	PI (dias)	ID (%) <sup>6</sup>
Controle	1.5 f <sup>4</sup>	122.8 a	2.0 f	44.4a
<i>L.ferrea</i> (Bruto)	2.7 de	77.2 abc	4.4 e	12.8 b
<i>L. ferrea</i> (CMB)	4.5 b	30.0 e	5.0 cde	9.8 bcd
<i>M. rigida</i> (Bruto)	4.3 bc	33.8 de	5.7 bcd	6.6 bcd
<i>M. rigida</i> CMB)	3.5 bcd	57.6 bcd	5.6 bcd	7.4 bcd
<i>S. brasiliensis</i> (Bruto)	3.8 bcd	49.0 de	4.9 de	10.6 bc
<i>S. brasiliensis</i> (CMB)	3.6 bcd	48.0 cde	6.8 a	1.0 ef
<i>S. obtusifolium</i> (Bruto)	3.3 cd	81.8 ab	6.9 a	0.4 f
<i>S. obtusifolium</i> (CMB)	3.4 cd	55.0 bcd	5.5 bcd	9.8 bcd
<i>X. americana</i> (Bruto)	4.5 ab	43.4 de	6.0 abc	5.0 cde
<i>X. americana</i> (CMB)	2.2 ef	114.2 a	6.0 ab	4.6 def
ASM	5.6 a	16.0 f	5.6 bcd	7.4 bcd
CV (%)	22,8	9,5	14,8	34

507 <sup>1</sup>CMB, concentração mínima bactericiada: *Libidibia ferrea* = 6,25 mg mL<sup>-1</sup>; *Maytenus rigida* = 25mg mL<sup>-1</sup>  
 508 <sup>1</sup>, *Schinopsis brasiliensis* = 0,024mg mL<sup>-1</sup>, *Ximenia americana* = 6,25 mg mL<sup>-1</sup> e *Sideroxylon obtusifolium*  
 509 = 25 mg mL<sup>-1</sup>. ASM, acibenzolar-S-methyl = 50 mg i.a. L<sup>-1</sup>;

510 <sup>2</sup> Média de 5 repetições com 10 sementes cada;

511 <sup>3</sup> Média de 5 repetições com 5 plântulas cada;

512 <sup>4</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de  
 513 Student (P≤0,05);

514 <sup>5</sup>Dados transformados (log x+1);

515 <sup>6</sup>Dados transformados  $\sqrt{x+0,5}$ .

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527 **Tabela 3.** Comprimento das células do mesofilo e epiderme superior de folhas cotiledonares de  
 528 meloeiro tratadas com extratos aquosos de plantas da Caatinga

<b>Tratamento<sup>1</sup></b>	<b>CTM µm</b>	<b>CEPS µm</b>
Controle Absoluto	203,45 a <sup>2</sup>	16,92 ab
Controle Relativo	182,37 ab	15,12ab
<i>L. ferrea</i>	151,47 bc	15,94 ab
<i>M.rigida</i>	197,97 a	15,35 ab
<i>S. brasilienses</i>	183,55 ab	13,90 b
<i>S. obtusifolium</i>	142,87 c	20,49 a
<i>X. americana</i>	225,95 a	18,31 a
ASM	175,16 c	9,13 c

529 <sup>1</sup>Extratos brutos de *Ximena americana*, *Maytenus rigida* e *Schinopsis brasiliensis*; extratos em  
 530 concentração mínima bactericida (CMB) de *Libidibia ferrea* (6,25 mg mL<sup>-1</sup>) e *Sideroxylon obtusifolium* (25  
 531 mg mL<sup>-1</sup>) (H). ASM, acibenzolar-S-methyl = 50 mg i.a. L<sup>-1</sup>;

532 <sup>2</sup>Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste  
 533 não-paramétrico de Kruskal-Wallis. CTM = comprimento total do mesófilo de folhas de meloeiro, CEPS =  
 534 comprimento da camada de células da epiderme superior do mesófilo.

535

536

537

538

539

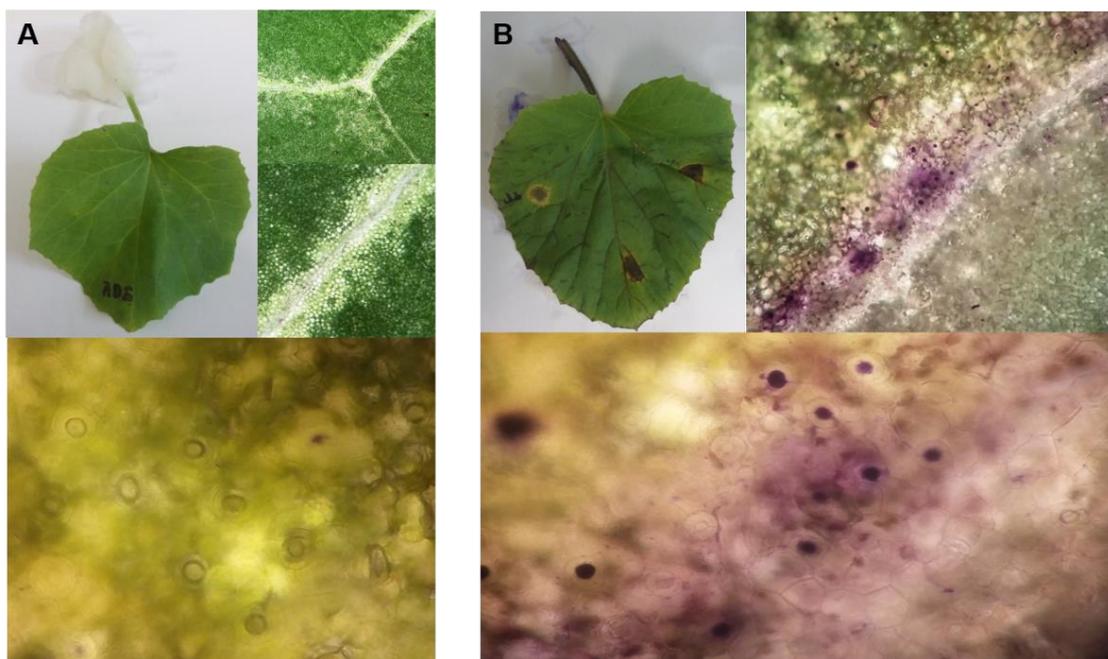
540

541

542

543

544



545

546 **Figura 1-** Formação de biofilme em superfície foliar de meloeiro. (A) folhas sem inoculação; (B)  
547 folhas inoculadas com o isolado Aac 1.12 de *Acidovorax citrulli*. Coloração violeta nos pontos de  
548 inoculação e nos estômatos, indicam formação de biofilme *in vivo* pela bactéria.

549

550

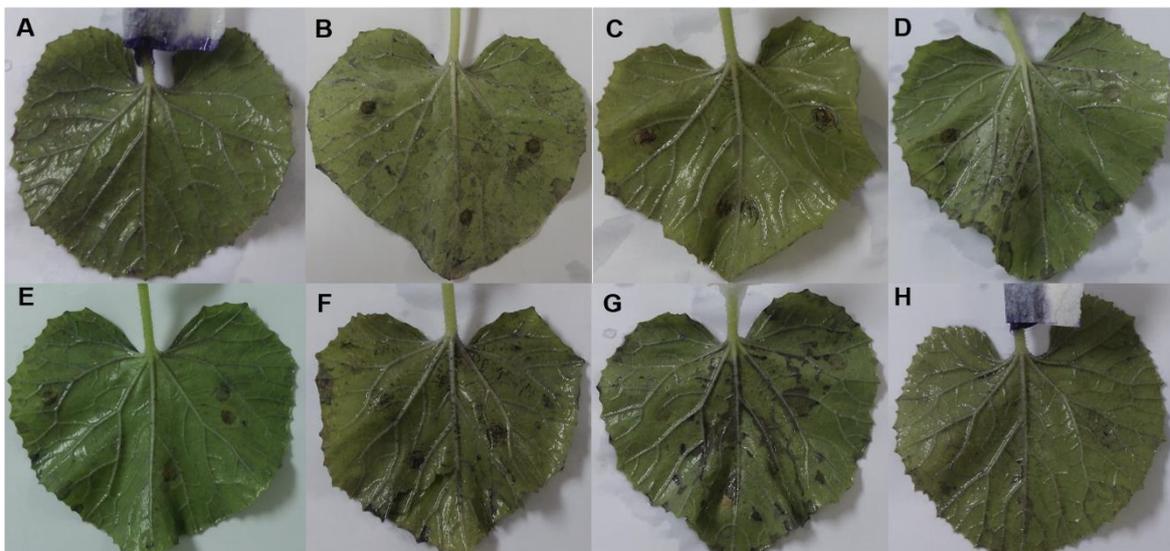
551

552

553

554

555



556

557 **Figura 2-** Efeito de extratos aquosos de plantas da Caatinga na formação de biofilme de  
558 *Acidovorax citrulli* em superfície foliar. Controle negativo (A); controle positivo (B); acibenzolar-  
559 S-methyl (50 mg i.a. L<sup>-1</sup>) (C); extratos brutos de *Ximenia americana* (D), *Maytenus rigida* (E) e  
560 *Schinopsis brasiliensis* (F); extratos em concentração mínima bactericida (CMB) de *Libidibia*  
561 *ferrea* (6,25 mg mL<sup>-1</sup>) (G) e *Sideroxylon obtusifolium* (25 mg mL<sup>-1</sup>) (H).

562

563

564

565

566

567

568

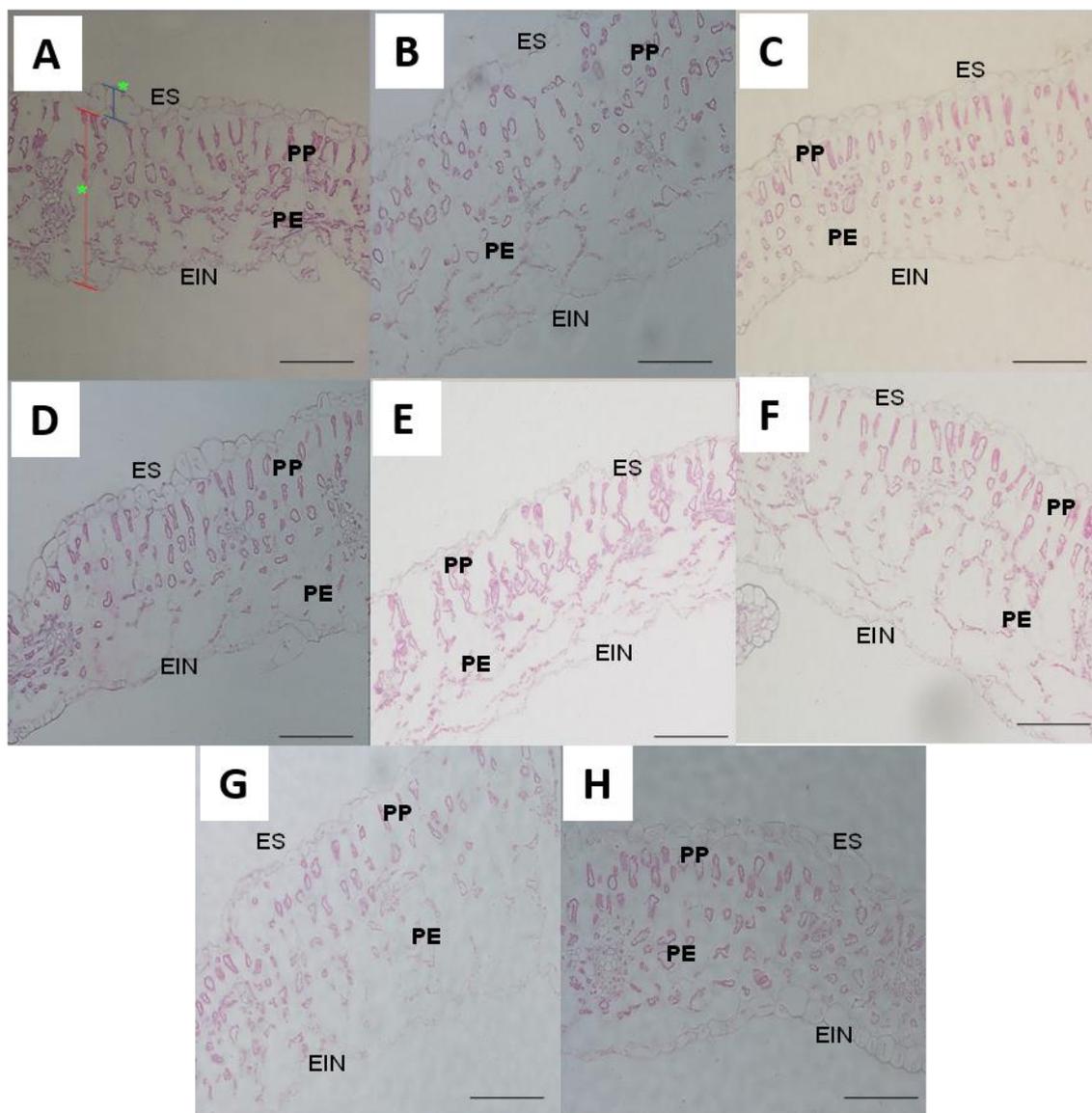
569

570

571

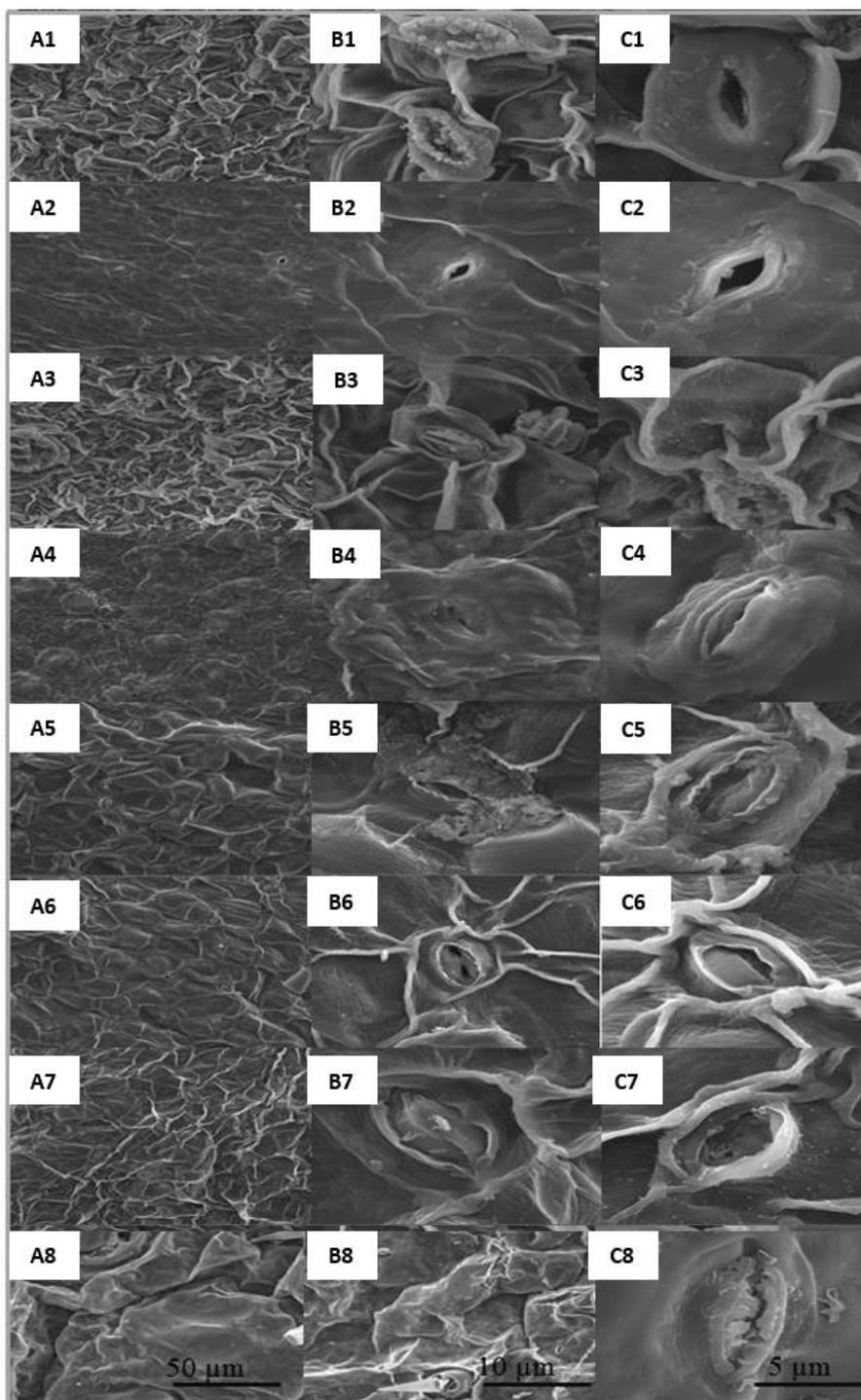
572

573



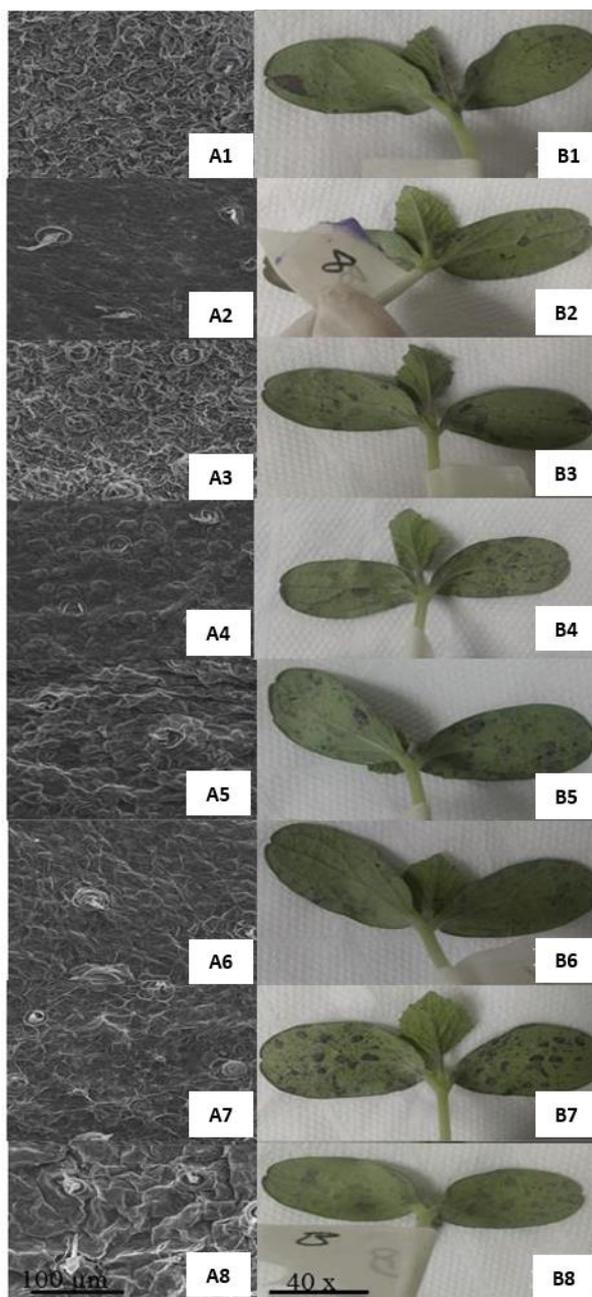
574

575 **Figura 3-** Efeitos de extratos aquosos de plantas de Caatinga na redução da severidade da mancha  
 576 aquosa do meloeiro analisado por microscopia de luz. Observação da seção transversal do mesófilo  
 577 foliar e detalhe da região do mesófilo superior de folhas de meloeiro. Tratamentos: extratos de  
 578 *Sideroxylon obtusifolium* (A) e *Maytenus rigida* (B), acibenzolar-S-methyl 0,05% (C), extrato de  
 579 *Ximenia americana* (D), controle absoluto (E), extrato de *Schinopsis brasiliensis* (F), controle  
 580 relativo (*Acidovorax citrulli*) (G) e extrato *Libidibia ferrea* (H). ES - epiderme superior, EIN -  
 581 epiderme inferior, PP- parênquima paliçadico, PE - parênquima esponjoso. \* Linha azul =  
 582 comprimento da epiderme superior e \* linha verde = comprimento da epiderme inferior.



583

584 Figura 4- Microscopia eletrônica de varredura do mesófilo de folhas cotiledonares de meloeiro  
 585 tratados com extratos aquosos de *Libidibia ferrea* (ABC 1), *Schinopsis brasiliensis* (ABC 2),  
 586 *Ximenia americana* (ABC 3), *Sideroxylon obtusifolium* (ABC 4) e *Maytenus rigida* (ABC 5);  
 587 controle absoluto (ABC 6); controle relativo(ABC 7); e acibenzolar-S-methyl 0,05% (ABC 8).  
 588 Visão adaxial dos cotilédones de meloeiro (A), área foliar com estômatos (B) e foco dos estômatos  
 589 (C).



590

591 Figura 5- Efeitos de extratos aquosos de plantas da Caatinga na redução da severidade da mancha  
 592 aquosa em meloeiro por observação do tecido estrutural do mesófilo de folhas cotiledonares de  
 593 plântulas em MEV (A) e correlação com os sintomas da doença (B). Tratamentos: extrato de  
 594 *Libidibia ferrea* (AB 1), *Schinopsis brasiliensis* (AB 2), *Ximenesia americana* (AB 3), *Sideroxylon*  
 595 *obtusifolium* (AB 4) e *Maytenus rigida* (AC 5), controle absoluto (AC 6), controle relativo (AB 7)  
 596 e acibenzolar-S-methyl 0,05% (AB 8).

## **Capítulo IV**

---

### **Conclusões Gerais**

## CONCLUSÕES GERAIS

- As espécies *Rhodotorula aurantiaca* (LMA1), *R. glutinis* (LMS) e *Pichia anomala* (CC-2) apresentaram diferenças quanto a adaptabilidade a condições ambientais de temperatura, pH, salinidade e pressão osmótica;
- A avaliação *in vitro* revelou que as leveduras LMA1 e LMS são fortes formadoras de biofilme;
- A levedura LMA1, através dos transformantes (Lt2 e Lt14), colonizou diferentes partes da planta do meloeiro à medida que a mesma foi crescendo, confirmando a eficácia da atividade da levedura antagonista em colonizar e competir com *A. citrulli* na planta hospedeira;
- Houve aumento no período de incubação da doença, assim como na redução do índice da doença, tanto para sementes tratadas quanto para plântulas protegidas com os extratos;
- Os extratos de *X. americana* e *S. obtusifolium* tornaram maior e melhor estruturado o comprimento da epiderme superior das células de plântulas tratadas e estômatos totalmente fechados, e plântulas tratadas com extrato de ameixa apresentaram uma melhor estrutura anatômica do mesofilo;
- Com base nos resultados, os extratos de *X. americana*, *M. rigida*, *S. obtusifolium*, *S. brasiliensis* e *L. ferrea* revelaram-se promissores no controle da mancha aquosa.