



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Potencial biocontrolador de leveduras e *Trichoderma* spp. à
fusariose do abacaxizeiro**

Tarciana Silva dos Santos

**Recife – PE
2019**

TARCIANA SILVA DOS SANTOS

**POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LEVEDURAS E
Trichoderma spp. À FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

Coorientadora: Dra. Rejane Pereira Neves

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2019**

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

S237p Santos, Tarciana Silva dos
Potencial biocontrolador de leveduras e *Trichoderma* spp. à
fusariose do abacaxizeiro / Tarciana Silva dos Santos. – 2019.
97 f. : il.

Orientador: Delson Laranjeira.
Coorientadora: Rejane Pereira Neves.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Abacaxizeiro – Doenças e pragas 2. Agentes no controle
biológico de pragas 3. *Fusarium oxysporum* 4. *Trichoderma*
I. Laranjeira, Delson, orient. II. Neves, Rejane Pereira, coorient.
III. Título

CDD 632

**POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LEVEDURAS E *Trichoderma* spp. À
FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO**

TARCIANA SILVA DOS SANTOS

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 28/02/2019.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios (UFRPE)

Prof. Dra. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho (UFRPE)

Dra. Emmanuelle Rodrigues Araújo (IPA)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2019**

*Dedico este trabalho a **Deus**, que foi minha força maior nos momentos difíceis.*

*Ao meu Pai, **José Benedito** (in-memorian), por tudo que fez na vida para me proporcionar essa conquista.*

*A minha mãe, **Maria José** e meus irmãos **Oscar Benedito e Tarcila Santos** indispensáveis quando eu sucumbi em pedaços, me fortalecendo com amor...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por dá sentido a minha vida e não ter me deixado fraquejar nos momentos difíceis, sabendo-se que nada foi fácil, tão pouco tranquilo, em fim, o agradeço por cada marca da ferida e a vitória até aqui conseguida.

À memória do meu pai José Benedito, ofertando como presente esse título, pois sei bem o quanto lhe orgulhava e quanto o esperava. A minha mãe Maria José por seu amor incondicional. Foram vocês, que muitas vezes renunciaram de seus sonhos para que pudesse realizar o meu, partilho com alegria esse momento.

Ao meu orientador, coorientadora e a colaboradora, respectivamente: Dr. Delson Laranjeira, Dra. Rejane Pereira e Dra. Luciana Cordeiro, pela solicitude orientação, apoio e paciência.

À Universidade Federal Rural do Pernambuco – UFRPE e ao Laboratório de Fungo de Solo – LAFSOL, a Universidade Federal da Paraíba – UFPB e ao Laboratório de Fitopatologia – LAFIT, pela utilização de seus espaços e infraestruturas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo e a todos os contribuintes do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE.

Aos professores, em especial: Dra. Elineide Barbosa, Dra. Sônia Oliveira, Dra. Lillian Guimarães, Dr. Marcos Câmara, Dr. Sami Michereff, Dr. Alessandro Nicole, Dr. Ailton Reis, Dr. Marco Câmara, Dr. Ueder Lopes e Dr. Gilvan Pio, por suma dedicação em repassar seus ensinamentos para minha formação.

A meu namorado Patricio Fernando e toda sua família, por todas as palavras, sorrisos, incentivos, apoio e paciência.

A Dra. Iwane Coelho, por toda amizade, seriedade, aconselhamento, respeito, confiança, contribuição, supervisão e aprendizado.

Aos meus amigos que marcaram essa trajetória, Tiago Bezerra, Marcelo Garcia, Igor Alexander, Sergio Batista, Juliane Maria, Letícia Rebeca, Odaiza Fabiana, Ananda Rosa, Rezanio Martins, Alejandro Risco, Barbara Malta e Leandro Velez.

A todos meus familiares, em especial Tarcila Santos, Oscar Benedito, Oryana Gabryella, Ana Vitória, Heloísa Silva, Hemily Tawany, Elydemia Oliveira, Luciana Oliveira, Odêmia Santos, Eliazar Oliveira, Marinês Benedito, Maria Luiza, Ordenice Benedito, João Antônio, Mardeci Benedito, Maria Lúcia, Maria Dora, Edney Alves, Eduardo Alves e Eliel Alves, Joalison Gonçalves, Joaliton Gonçalves, Joselmo Gonçalves e Jocélia Gonçalves.

A todos meus amigos que não foram citados, porém que acompanharam meu percurso, me apoiando direta ou indiretamente para realização desse sonho, vocês são muito importantes, obrigado por todas as contribuições. Amo vocês!

***Vou pintar com a cor da gratidão
Os cabelos prateados dos meus pais***

*Pelas vezes que eu pude aprender
As lições que nenhuma escola ensina
Pelas curas sem usar de medicina
Pelo pão que me deram de comer*

*Pelas vezes que mesmo sem saber
Fui guiado indo seus sinais
Enfrentando meus medos mais brutais*

*Pelas aulas de vida que ganhei
De quem mais entendia da matéria
Por aquela cara feia, firme e séria
Que vi quase sempre que errei*

*Pelos sonhos que já realizei
Inclusive os mais loucos e reais
Impossíveis e irracionais
Aprendi a voar de pés no chão*

*Pelas vezes que não me senti só
Mesmo estando só eu, e minha dor
Nessas horas eu sentia esse amor
Me abraçando e me apertando, feito um nó*

*De repente essa dor virava pó
E as feridas que para mim era fatais
Como um corte feito com vários punhais
Um abraço tornava em arranhão*

***Vou pintar com a cor da gratidão
Os cabelos prateados dos meus pais***

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
1. A CULTURA DO ABACAXIZEIRO	2
2. A FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO	3
3. MANEJO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO	5
4. O CONTROLE BIOLÓGICO	6
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO II	22
First report of <i>Fusarium sororula</i> causing fusariosis of pineapple in Brazil	23
CAPÍTULO III	28
Potencial antagônico de <i>Meyrozyma caribbica</i> em <i>Fusarium</i> spp. do abacaxizeiro	29
Resumo	30
1. Introdução	31
2. Material e métodos	33
3. Resultados	41
4. Discussão	46
5. Agradecimentos	52
6. Referências	53
CAPÍTULO IV	72
Desempenho de <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>Trichoderma asperelloides</i> no controle da fusariose do abacaxizeiro	73
Resumo	74
1. Introdução	75
2. Materiais e Métodos	76
3. Resultados	81
4. Discussão	89
5. Referências	91
CONCLUSÕES GERAIS	96

RESUMO GERAL

O cultivo do abacaxizeiro favorece o desenvolvimento de doenças, entre elas a fusariose, que reflete negativamente na produtividade. Os fungicidas sua principal ação de proteção causa sérios riscos ao homem, os animais e o meio ambiente, diante desta problemática, seguindo a tendência agrícola de conscientização ecológica, os bioprotetores são um dos manejos mais recomendados. Nesse sentido objetivou-se o avaliar o potencial de isolados de leveduras e *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* spp. agente causal da fusariose do abacaxizeiro. Foram realizados testes de patogenicidade e virulência de dois isolados de *Fusarium* spp. (*F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213), provenientes de abacaxizeiro. Obtidos os agentes de bicontrol (leveduras e *Trichoderma* spp.) e realizado *screening*, a fim de selecionar isolados com potencial antagônico. As leveduras foram avaliadas *in vitro*, quanto: ao fator *Killer*, biofilme, antibiose e enzimas hidrolíticas. Ensaio *in vivo* também foram realizados, em frutos de abacaxi para leveduras, e em mudas micropropagadas cv. Pérola para ambos isolados antagônicos (leveduras e *Trichoderma* spp.) contra os isolados CFS212 e CFS213. Efetivou-se a identificação molecular dos isolados antagônicos através do sequenciamento da região gênica ITS e *Tefl- α* , e a avaliação da interação micoparasítica *in vitro* com os isolados patogênicos. Observou-se que ambos isolados de *Fusarium* spp. foram patogênicos e o *F. sororula* mais agressivo. Para a prospecção de agentes de biocontrole à fusariose do abacaxizeiro, foram obtidos 100 isolados de leveduras e 37 de *Trichoderma* spp. Cinco isolados de todos os agentes antagônicos se destacaram ao CFS212 e CFS213 em testes *in vitro* e *in vivo* foram selecionados para identificação molecular, todas espécies de leveduras foram identificadas como *Meyerozyma Caribbica* e duas espécies de *Trichoderma* spp. como, *T. asperellum* e *T. asperelloides*. Em ensaios micoparasíticos foram verificadas alterações morfológicas, como: edema, extravasamento, vacuolose e um possível biofilme da levedura *M. caribbica*, nas hifas dos patógenos; para *T. asperelloides* e *T. asperellum* penetração direta e estrangulamento em hifas de *Fusarium* spp. Este trabalho mostra o primeiro relato das espécies antagônicas *M. caribbica*, *T. asperelloides* e *T. asperellum* no biocontrole de *F. sororula* e *F. oxysporum* agentes causais da fusariose do abacaxizeiro, abrindo grandes prospecções para novos estudos a respeito das espécies antagônicas no manejo da doença.

Palavras-chaves: Agentes de biocontrole, *Ananas comosus*, *Fusarium sororula*, *Fusarium oxysporum*, *Meyerozyma caribbica*, *Trichoderma* spp.

GENERAL ABSTRACT

The cultivation of pineapple favors the development of diseases, among them fusariosis, which negatively reflects productivity. The fungicides their main action of protection causes serious risks to man, animals and the environment, facing this problem, following the agricultural trend of ecological awareness, bioprotectors are one of the most recommended management. In this sense, the objective was to evaluate the potential of yeast isolates and *Trichoderma* spp. in control of *Fusarium* spp. causal agent of pineapple fusariosis. Pathogenicity and virulence tests were performed on two isolates of *Fusarium* spp. (*F. sororula* – CFS212 and *F. oxysporum* – CFS213), from pineapple. Obtaining the bicontrol agents (yeasts and *Trichoderma* spp.) and performed screening, in order to select isolates with antagonistic potential. The yeasts were evaluated *in vitro*, for: Killer factor, biofilm, antibiosis and hydrolytic enzymes. *In vivo* assays were also performed on pineapple fruits for yeasts, and on micropropagated seedlings cv. Pérola for both antagonistic isolates (yeast and *Trichoderma* spp.) against CFS212 and CFS213 isolates. Molecular identification of the antagonistic isolates through the sequencing of the ITS and *Tefl-a* gene region and the evaluation of the *in vitro* microparasitic interaction with the pathogenic isolates were carried out. It was observed that both isolates of *Fusarium* spp. were pathogenic and *F. sororula* more aggressive. For the prospection of biocontrol agents to the fusariosis of the pineapple, 100 isolates of yeasts and 37 of *Trichoderma* spp. Five isolates of all antagonistic agents were highlighted in CFS212 and CFS213 *in vitro* and *in vivo* tests and were selected for molecular identification, all yeast species were identified as *Meyerozyma Caribbica* and two species of *Trichoderma* spp. such as *T. asperellum* and *T. asperelloides*. In mycoparasitic studies, morphological alterations were observed, such as: edema, extravasation, vacuolosis and a possible biofilm of the *M. caribbica* yeast, in the pathogenic hyphae; for *T. asperelloides* and *T. asperellum* direct penetration and strangulation in hyphae of *Fusarium* spp. This work shows the first report of the antagonistic species *M. caribbica*, *T. asperelloides* and *T. asperellum* in the biocontrol of *F. sororula* and *F. oxysporum* causal agents of the fusariosis of pineapple, opening great prospects for new studies on the antagonistic species in the management of disease.

Keywords: Biocontrol agents, *Ananas comosus*, *Fusarium sororula*, *Fusarium oxysporum*, *Meyerozyma caribbic*, *Trichoderma* spp.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LEVEDURAS E *Trichoderma* spp. À FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

1. A CULTURA DO ABACAXIZEIRO

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merr.] é uma planta originária do Hemisfério Sul, típica da América tropical e subtropical (CRESTANI et al, 2010). No Brasil essa planta apresentou uma excelente adaptação, se tratando da terceira fruta mais produzida em volume, perdendo apenas para a laranja e a banana (FAO, 2015).

O Brasil é líder na produção mundial de abacaxi, com 26,2 % de produtividade de frutos, seguindo bem próximo da Tailândia e Filipinas (IBGE, 2017; FAO, 2013). Entre as regiões brasileiras, a região Norte é a segunda maior produtora de abacaxi, com 23,8 %, perdendo apenas para a região Nordeste com 40,4 % (IBGE, 2017). Dos estados do Nordeste, a Paraíba se destaca com um volume de 19,8 %, seguindo do Ceará com, 8,8 % e a Bahia 8,4 % de produção de abacaxi por ano (IBGE, 2017).

O abacaxizeiro desempenha papel socioeconômico fundamental na agricultura familiar, promovendo inclusão social, emprego e formando cooperativas, sendo um produto capaz de contribuir para a manutenção de famílias no campo. O principal produto é o fruto, que é consumido *in natura* e/ou processado para o qual se destina maior parte da sua produção, com finalidade nacional ou internacional (FAO, 2013).

O abacaxi possui características sensoriais e nutricionais altamente peculiar e atrativas ao consumidores, tais como sabor, cor, odor, teor de ácido ascórbico, minerais, fibras e presença de antioxidantes (RAMALLO; MASCHERONI, 2012). Também é empregado basicamente para compósitos industriais, como: compotas, álcool, sucos, doces, bolos e produtos dermocosméticos, além de apresentar compostos bioativos, como a bromeína e bromelina utilizada para fins medicinais, potencializadores e inibidores como: anti-inflamatório, antitrombótica e fibrinolítica (PINTO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016; HATANO; TAKAHASHI; TANOKURA, 2018; VICENTE et al., 2016).

Em termos botânicos o abacaxizeiro trata-se de uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, com cerca de 1,0 m de altura, pertencente à família das Bromeliáceas, com folhas inseridas no caule em forma de calha, estando estrategicamente posicionadas em sentido linear, as suas flores apresentam uma coloração roxo-purpúrea, reunidas em

inflorescência terminal de eixo grosso, carnoso e cônico oval (VENTURA; MAFFIA. CHAVES, 1981), conhecida como talo. O abacaxi é uma infrutescência, composta por 50 a 150 frutos individuais conhecidos como frutinhos (CUNHA; CABRAL, 1999).

Para seu melhor desenvolvimento e conseqüentemente melhor qualidade de frutos, as variações são: (i) temperaturas entre 21 a 23° C; (ii) precipitação em torno de 1200 a 1500 mm bem distribuídas ao longo do ano, sendo recomendado o uso de irrigação em locais com períodos secos e/ou muito prolongados e; (iii) fotoperíodo variando entre 6,8 a 8,2 horas de luz diária, ou seja, de 2500 a 3000 horas de luz por ano (NASCENTE; DA-COSTA; COSTA, 2005).

O ciclo produtivo do abacaxizeiro varia de 14 a 24 meses, sofrendo influência das condições climáticas, além de depender da época de plantio, da variedade genética e práticas culturais empregadas, estando composto de basicamente duas fases, uma vegetativa e outra de produção (SOUZA et al., 2010).

As cultivares de abacaxizeiro mais conhecidas no mundo para consumo ao natural e para a industrialização, são Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Española Roja, Pérola e Perolera (CABRAL; MATOS, 2009). No Brasil, há o predomínio de três cultivares, Pérola, Smooth Cayenne e Jupi, além dessas, outros materiais têm sido introduzidas em algumas regiões específicas do país, como Roxo de Tefé, Gigante de Tarauacá, entre outras cultivadas na região Amazônica (MATOS; REINHARDT, 2009).

A preponderância dessas cultivares nos principais trópicos produtores de abacaxi torna a cultura bastante vulnerável à ocorrência de fatores bióticos e abióticos adversos (CABRAL; MATOS; SOUTO, 1985). Estima-se que 70% da produção mundial correspondem à Smooth Cayenne, entretanto, no Brasil, nas principais regiões produtoras há o predomínio de abacaxizeiro cv. Pérola, embora ambas sejam suscetíveis à fusariose, a qual constitui o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil (CABRAL; MATOS; SOUTO, 1985).

2. A FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

Relatada pela primeira vez em 1962 no Brasil, infectando frutos da cultivar Smooth Cayenne em plantios no estado de São Paulo (KIMATI; TOKESHI, 1964), a fusariose do abacaxizeiro se encontra presente em praticamente todas as regiões produtoras do país, constituindo a doença mais destrutiva da cultura.

As perdas na produção de frutos de abacaxi ocasionadas pela fusariose podem atingir até 80%, a depender da variedade, da região produtora, bem como da época de plantio (MATOS; REINHARDT, 2009). O patógeno também pode infectar, aproximadamente 40 % do material de plantio e matar cerca de 20% das plantas infectadas antes delas atingirem a época de colheita, o cenário ainda é mais preocupante em virtude das variedades mais cultivadas apresentarem suscetibilidade ao patógeno (MATOS; REINHARDT, 2009; MATOS et al., 2009).

O agente causal da fusariose do abacaxizeiro trata-se de um fungo do gênero *Fusarium*, onde várias espécies desse gênero incidem essa doença, como: *F. guttiforme* (KVAS et al., 2009); *F. ananatum* (BARRAL et al., 2017); *F. subglutinans* (MOREIRA, 2016); *F. fujikuroi* (IBRAHIM et al., 2016); *F. moniliforme* (MATOS, 1999) e *F. oxysporum* (IBRAHIM et al., 2015).

A fase teleomórfica é denominada *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wollenw. var. *subglutinans* Edw. ainda não detectada naturalmente sobre abacaxi (LESLIE; SUMMERELL, 2006). O fungo produz microconídios com formato oval e macroconídios com parede delgada e formato cilíndrico (SOUZA et al., 2018).

A doença, causada por *Fusarium* spp. pode iniciar sua interação com o hospedeiro através do solo contaminado, ou após chegada dos seus propágulos na superfície da planta, veiculados através do vento e/ou respingos de chuvas/irrigação, especialmente se a época coincidir com as condições climáticas favoráveis e o período que as florescências estiverem em desenvolvimento, mais precisamente abertas, constituindo como um dos principais sítios de infecção (MATOS, 1978).

O patógeno tem capacidade de sobreviver em material propagativo, resto cultural e em plantios abandonados, sobretudo naqueles locais onde a incidência da doença tenha sido elevada, já as mudas infectadas usadas em novos plantios constituem como fontes iniciais de inóculo no campo (MATOS, 1987; MATOS; REINHARDT, 2009).

A movimentação de material propagativo infectado com o patógeno constitui como principal veículo de disseminação da doença. Após a infecção, onde é possível observar uma podridão mole e exsudação de uma substância gomosa através dos tecidos colonizados (MATOS; REINHARDT, 2009).

Nos frutos, os sintomas caracterizam-se pela exsudação de goma através das cavidades florais, e internamente, a polpa apresenta-se necrótica, também as plantas podem expressar sintomas externos, tais como, curvatura e encurtamento do talo, modificações na

filotaxia, aumentando o número de folhas por espiral, redução no comprimento das folhas, e no desenvolvimento geral da planta, morte do meristema apical, modificações na arquitetura da planta que passa a ter a aparência de funil, e clorose (MATOS, 1999).

Ainda segundo Matos (1999), em geral, a lesão incitada pelo patógeno no talo da planta reduz a condução de água, sais minerais e fotossintatos, resultando progressivamente em enfezamento, clorose, murcha e morte do hospedeiro, especialmente as mudas do tipo filhote, quando submetidas à alta intensidade de ataque podem morrer e secar ainda aderidas a planta mãe.

3. MANEJO DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

O manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro, o qual envolve o emprego de várias medidas de controle (biológico, cultural, genético, físico e químico) simultaneamente ou sequencial nos plantios comerciais, encontra-se como a principal estratégia de controle, com objetivo de reduzir a incidência da doença a um nível de dano econômico aceitável (MATOS; CABRAL, 2005).

Nesse sentido, as práticas integradas mais empregadas para reduzir o inóculo do patógeno, são: utilização de material propagativo sadio, oriundas de produtores certificados; monitoramento constante e erradicação de plantas infectadas durante o ciclo vegetativo; evasão mediante a escolha de épocas climáticas desfavoráveis à incidência da doença (escape); e proteção das inflorescências quando em desenvolvimento, com a utilização de fungicidas registrados para o controle do patógeno (MATOS; REINHARDT, 2009), sendo que, os manejos que envolvem as práticas culturais, como as utilizações de mão de obra encarecem o cultivo da cultura, desta forma as práticas mais utilizadas são o controle genético e o químico.

O manejo da fusariose têm movido muitos programas de melhoramento genético, objetivando desenvolver híbridos superiores resistentes que atendam aos anseios do problema no campo e agradem os consumidores da fruta. Em 1984 a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, iniciou os estudos e durante esse tempo lançou cultivares, como: BRS Imperial (CABRAL; MATOS, 2005), BRS-Ajuba (CABRAL; MATOS, 2008) e a BRS Vitoria (VIANAL et al., 2013), entretanto, dificuldades financeiras e sociais foram grandes empecilhos aos produtores de abacaxi para reestabelecerem um novo plantio comercial livre da doença.

De fato, nas principais regiões produtoras, a aplicação de fungicidas tem sido o principal manejo da fusariose, por se tratar de um produto eficaz e de resposta rápida, porém, o seu uso intensivo vêm implicando no surgimento de uma série de problemas (NORDLUND, 1996). Dentre estes, surgimento de patógenos resistentes a muitos fungicidas importantes, como no caso do Benomyl a isolados de *F. guttiforme* (SANTOS et al., 1996; DROBY et al., 2016); (b) desenvolvimento de novos biótipos de patógenos; (c) falta de fungicidas alternativos eficazes; (d) aumento dos níveis residuais de fungicidas em produtos agrícolas, principal barreira para exportação de produtos; (e) problemas toxicológicos relacionados à saúde humana e, (f) impactos ambientais negativos (DROBY et al., 2009).

Diante disso, torna-se evidente a necessidade da busca de alternativas que reduzam o emprego dos defensivos agrícolas e que possa acrescentar o potencial de controle junto a outros manejos já utilizados, que não sejam tão agressivas ao homem e ao meio ambiente. Atendendo essa necessidade, o controle biológico constitui uma excelente opção no manejo dos fitopatógenos, fortemente relatado, estudado nas últimas décadas e usados como agentes potenciais de biocontrole para uso comercial (DROBY et al., 2009; ZHAO et al., 2010).

4. O CONTROLE BIOLÓGICO

Os micro-organismos atualmente, têm se mostrado uma das principais estratégias adotadas para o manejo dos fitopatógenos, diminuindo o uso total ou parcial dos fungicidas (PIMENTA et al., 2010). Diversos estudos já demonstraram a eficiência de agentes microbianos no controle de patógenos fúngicos (ROMANAZZI et al., 2016; DROBY et al., 2016). A supressão biológica incitada por organismos antagonistas que inibem ou interferem no crescimento, desenvolvimento e atividade normal dos fitopatógenos, empregando inúmeros mecanismos inibitórios diretos e indiretos (DUKARE et al., 2018), é o fator chave que tornam esses produtos interessantes na agricultura sustentável.

Esses mecanismos podem operar individualmente ou mutuamente, os principais expostos exercidos por antagonistas, são: (I) competição por espaço e nutrientes; (II) produção de antibióticos; (III) micoparasitismo; (IV) produção de enzimas líticas da parede celular e (V) indução de resistência do hospedeiro (EL-GHAOUTH; WILZON;

WISNIEWSKI, 2004; SHARMA; SINGH; SHINGH, 2009; DI-FRANCESCO et al., 2016).

O mecanismo de competição é exercido sobre a circunstância de escassez de alimento. Os agentes de controle biológico diminuem os nutrientes disponíveis no local dos propágulos dos fitopatógenos, tornando os nutrientes inacessíveis, impedindo-os de germinar, crescer e até infectar o hospedeiro (DUKARE et al., 2018), competindo por nutrientes (carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais), oxigênio e/ou espaço (SPADARO, 2016).

Na produção de antibióticos, os antagonistas podem liberar compostos químicos, que são eventualmente produzidos/sintetizados conforme seu desenvolvimento, possuindo potencial de neutralizar ou matar os patógenos (ISAIAS et al., 2014), através da inibição da síntese da parede celular, de proteínas, destruindo e/ou alterando as estruturas da membrana celular (FREURI; SATO, 2005).

O parasitismo direto, o micoparasitismo ou o hiperparasitismo, é a capacidade do microrganismo antagonico se ligar às hifas de patógenos fúngicos para produzir enzimas líticas e degradar a parede celular, causando a morte completa de propágulos fúngicos e ou a lise de sua estrutura (DUKARE et al., 2018; TALIBI et al., 2014). A quebra enzimática das hifas patogênicas geradas por microrganismos antagonicos resultam em deformidades celulares, incluindo danos citológicos, distorção, impermeabilidade da membrana e vazamento celular (DI-FRANCESCO; MARTINI; MARI, 2016).

O aumento do nível de resistência é incitada por agentes externos, como alguns agentes de biocontrole, ocorre sem qualquer alteração do genoma da planta, de maneira específica (ROMANAZZI et al., 2016; DROBY et al., 2016), envolvendo acúmulo de barreiras estruturais, sinalização da proteína quinase mitogênica, espécies reativas de oxigênio, acúmulos de compostos fenólicos, lignificação, fortalecimento da parede celular hospedeira e formação de glicoproteínas (SHORESH; HARMAN; MASTOURI 2010; MONTEIRO, 2017).

Os fungos com potencial antagonico constituem os principais agentes microbianos utilizados para essa finalidade, espécies de leveduras e *Trichoderma* são os mais relatados, e estudados contra patógenos que causam doenças em plantas.

4.1 LEVEDURAS NO CONTROLE BIOLÓGICO

As leveduras são agentes que se destacam devido a sua rápida colonização, longo período de permanência nos produtos vegetais e habilidade à diferentes condições ambientais nos quais são associados (CARTWRIGHT; SUPURR JR., 1998; DROBY et al., 2003; JANISIEWICZ, 1991).

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota, que se reproduzem por fissão binária ou brotamento e não apresentam corpo de frutificação (FUENTEFRÍA, 2007). São facilmente encontrados na microbiota epifítica ou endofítica, ocupam, comumente, a superfície das folhas, casca, frutas, flores, tecidos necróticos, solo e a rizosfera, podendo competir por nutrientes, colonizar ferimentos, desempenhar ação micoparasítica, produzir substâncias antibióticas e induzir resistência nas plantas contra agentes patogênicos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; VALDEBENITO, 2000; VIANA; LIMA; LIMA, 2012).

Diversas são as características que conferem às leveduras papel importante no controle biológico, através da indução de resistência, desencadeando vários compostos como fenilalanina amônia liase, fitoalexinas, peroxidases e etileno, em tecidos vegetais (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006); produção de sideróforos, compostos quelantes de íons de ferro; substâncias de fator “*Killer*”, atuando na membrana de células sensíveis de fungos filamentosos, por meio da redução do pH intracelular e extravasamento de íons potássio e ATP (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA et al., 2010).

Diversas espécies de leveduras vêm sendo utilizadas com sucesso como agentes de controle biológico. *Candida oleophila*, Montrocher 1967 e *Rhodotorula glutinis*, Fresen. F. C. Harrison, 1928, no controle da antracnose (GAMAGAE et al., 2003; FRANÇA et al., 2014); *Sporothrix flocculosa* Traquair, L.A. Shaw; Jarvis 1988, *Botrytis cinerea* Pers. 1794 (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006); *Kluyveromyces marxianus*, Van der Walt 1971, e *Saccharomyces crataegensis*, Kurtzman; Antonie van Leeuwenhoek 1973, contra *Penicillium digitatum*, (Pers.) Sacc, (CHEN et al., 2011; PIMENTA et al., 2010), respectivamente.

Tristão et al. (2012), em trabalho envolvendo leveduras associadas à frutos de abacaxi e sua utilização como agentes de controle biológico, verificaram que as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, e *Pseudozyma flocculosa* Traquair, L.A. Shaw & Jarvis, permaneceram viáveis na superfície do fruto por até 20 dias,

correspondente ao período de vida útil do produto, aumentando o tempo de prateleira e diminuindo a aplicação de insumos químicos.

A levedura *Meyerozyma caribbica* é um agente de biocontrole eficaz. Demonstraram a eficiência da levedura em pós-colheita contra *Colletotrichum gloeosporioides* em mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. 'Ataulfo', inibindo 86,7% da antracnose do fruto, proporcionada pelos mecanismos de ação, como a competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas, parasitismo e formação de biofilmes (ROSALES et al., 2013).

Não existe até o momento relatos com a levedura *M. caribbica* no controle da fusariose do abacaxizeiro, entretanto, já foi identificada em isolamento de casca de frutos e folhas de abacaxizeiro para fabricação de bebidas fermentadas, que se manteve viável em armazenamento refrigerado, durante 21 dias (AMORIM; PICCOLI; DUARTE, 2018), já sua atividade após secagem e atomização com finalidade comercial, a levedura *M. caribbica* conseguiu manter 95 % de viabilidade, durante um período de seis meses à 4° C (GUITRÓN et al., 2018), essas informações citadas, acoplado ao potencial antagônico (ROSALES et al., 2013), confere a essa levedura ganhos promissores para a utilização em doenças pós-colheita, incluindo à fusariose do abacaxizeiro, devido a sua viabilidade comercial e capacidade em baixas temperaturas.

Além disso, a pós-colheita foi considerado um ambiente adequado ao uso bem-sucedido de agentes antagônicos (FRANÇA et al., 2015). Por todas essas características e pelo surgimento de produtos comerciais à base de leveduras, verificando o sucesso do controle biológico de diversos fitopatógenos, como exemplo a *P. flocculosa*, no produto comercial Sporodex® (NEVEU et al., 2007), Aspire® e Nexy®, que têm como princípio ativo a levedura *Candida oleophila* (COELHO et al., 2013), esses microrganismos têm sido largamente estudados quanto a prospecção de agentes de biocontrole.

4.2 ESPÉCIES DE *Trichoderma* NO CONTROLE BIOLÓGICO

Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, são os agentes de biocontrole mais utilizados no controle biológico, atraindo atenção devido a sua efetividade contra uma ampla gama de patógenos de plantas (HERMOSA et al., 2012; SRIRAM et al., 2013). São encontrados com prevalência em todos os tipos de solos cultiváveis, crescendo em torno das raízes, protegendo-as contra doenças radiculares. Devido ao seu potencial antagônico

podem conferir também proteção contra doenças foliares, se tratando de um organismo simbiote avirulento oportunista (MATEI et al., 2012).

As espécies de *Trichoderma* atuam por meio de vários mecanismos, incluindo: (a) antibiose; (b) parasitismo; (c) indução de resistência da planta hospedeira; (d) competição; (e) tolerância ao estresse; e (f) solubilização de nutrientes inorgânicos (MATEI et al., 2012; VOS et al., 2015; NASEBY; PASCUAL; LYNCH, 2000; CARD et al., 2009).

A antibiose é uma correlação positiva em espécies antagônicas de *Trichoderma*. Ocorre devido à liberação de compostos como enzimas 1,3- β -glucanase, quitinase, celulase, hemicelulase, entre outras, inibindo diretamente o crescimento de fitopatógenos, degradando a parede das células (EL-KOMY et al., 2015). A maioria dos mecanismos atuam mutuamente, por exemplo, no microparasitismo as hifas do *Trichoderma* spp. crescem em direção do patógeno, enrolando-se firmemente, ao mesmo tempo que competem por nutrientes, como no caso do *T. atroviride* LU132 à *B. cinerea* (CARD et al., 2009).

A indução de resistência proporcionada por espécies de *Trichoderma* podem melhorar o metabolismo da planta, como a capacidade de absorção de nutrientes, como distribuição e suprimento adequado (BUCIO; PELAGIO; HERRERA, 2015; CAI et al., 2015), como moléculas podem também mediar como elicitores, ativando a expressão de genes envolvidos na resistência sistêmica, estimulando o crescimento da planta, o desenvolvimento do sistema radicular, favorecendo a assimilação de nutrientes e protegendo contra fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles veiculados por solo (VINALE et al., 2008).

Muitas espécies são utilizadas visando o controle de doenças de plantas (VERMA; HANSCH, 2007), como *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. harzianum*, *T. viride* e *T. virens* (STEYAERT et al., 2010; BENÍTEZ et al., 2004; GUPTA et al., 2014). Experiências *in vitro* e *in vivo* mostram a efetividade do *Trichoderma* spp. em reduzir o crescimento de diferentes espécies de *Fusarium* (EL-KOMY et al., 2015; SARAVANAKUMAR; KIM; KIM, 2017; SOBOWALE et al., 2010; CHAROENRAK; CHAMSWARNG, 2016; CHEN et al., 2012). A espécie *T. asperellum*, em estudos *in vitro*, foi relatada como supressora de *F. oxysporum* (EL-KOMY et al., 2015) e *F. verticillioides* (VEENSTRA; RAFUDEEN; MURRAY, 2018), já *T. asperelloides* pode suprimir ativamente a produção de óxido nítrico elicitada por *F. oxysporum* em raízes de milho (*Arabidopsis* sp.) e impactar na expressão para desenvolvimento da doença (GUPTA et al., 2014).

Diante à escassez de informações acerca do uso de agentes de controle biológico antagonicos a *Fusarium* spp. agente causal da fusariose do abacaxizeiro, espécies de leveduras e *Trichoderma* apresentam base científica relevante para futuras investigações a respeito dos mecanismos de ação específica, à produção de compostos de interesse biotecnológico, associações com produtos químicos e formulações, assim como aplicabilidade efetiva nos manejos fitossanitários, em diversos sistemas produtivos e sob diferentes condições ambientais.

Objetivou-se nesse estudo: i) Obter, identificar e avaliar a patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. do abacaxizeiro; Selecionar isolados antagonicos a *Fusarium* spp. através de testes *in vitro*; ii) Avaliar a capacidade antagonica de leveduras e *Trichoderma* spp. em frutos e mudas micropropagadas cv. Pérola à fusariose do abacaxizeiro; iii) identificar os isolados de leveduras e *Trichoderma* spp. com potencial bicontrolador sobre a fusariose do abacaxizeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, J. C.; PICCOLI, R. H.; DUARTE, W. F. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. **Food Research International**, Netherlands, v. 107, p. 518-527, 2018.
- BARRAL, B.; CHILLET, M.; MINIER, J., LECHAUDEL, M.; SCHORR-GALINDO, S. Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. **Fungal biology**, Oxon, v. 121, n. 12, p. 1045-1053, 2017.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODON, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, Spain, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BUCIO, L. J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia horticulturae**, Netherlands, v. 196, p. 109-123, 2015.
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. **BRS Ajubá, nova cultivar de abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2008. 4 p. (Comunicado Técnico - INFOTECA-E).
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. Imperial, a new pineapple cultivar resistant to fusariosis. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 822, n. 1, p. 47-50, 2009.
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P.; SOUTO, G. F. Reação de germoplasma de abacaxi à inoculação com *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 7, p. 787-791. 1985.
- CAI, F.; LI, R. X.; PANG, G.; SHEN, Q. R.; LI, R.; CHEN, W. Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0130081, 2015.
- CARD, S. D.; WALTER, M.; JASPERS, M. V.; SZTEJNBERG, A.; STEWART, A. Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, Pisa, v. 38, n. 2, p. 183-192, 2009.

CARTWRIGHT, D. K.; SPURR J., H. W. Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on tobacco seedlings with non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Athens, v. 30, n. 3, p. 1879-1884, 1998.

CHAROENRAK, P.; CHAMSWARNG, C. Efficacies of wettable pellet and fresh culture of *Trichoderma asperellum* biocontrol products in growth promoting and reducing dirty panicles of rice. **Agriculture and Natural Resources**, Sch Law, v. 50, n. 4, p. 243-249, 2016.

CHEN, P. S.; HU, M.; UL-MAQ, M. R.; LAI, K.; QU, F.; ZHANG, Y. Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. **International Journal of Food Microbiology**, Korea, v. 151, n. 2, p. 190-194, 2011.

CHEN, L. H.; HUANG, X. Q.; ZHANG, F. G.; ZHAO, D. K.; YANG, X. M.; SHEN, Q. R. Application of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 bio-organic fertiliser significantly controls *Fusarium* wilt and affects the microbial communities of continuously cropped soil of cucumber. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 92, n. 12, p. 2465-2470, 2012.

COELHO, A. R.; NÓBREGA, G. M. de A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1879-1892, 2013.

CRESTANI, M.; BARBIERI, R. L.; HAWERROTHL, C. F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1473-1483, 2010.

CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. (Ed) **O abacaxizeiro - cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa, 1999, p. 17-51. (Boletim Técnico).

DI FRANCESCO, A.; MARTINI, C.; MARI, M. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: How many mechanisms of action? **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 145, p. 711–717, 2016.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; GHAOUTH, A. E.; WILSON, C. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. **Postharvest Biology and Technology**, Auckland, v. 27, n. 2, p. 127-135, 2003.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. DROBY, SAMIR. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. **Postharvest biology and technology**, Netherlands, v. 52, n. 2, p. 137-145, 2009.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; TEIXIDÓ, N.; SPADARO, D.; JIJAKLI, M. H. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. **Postharvest Biology and Technology**, Netherlands, v. 122, p. 22-29, 2016.

DUKARE, A. S.; PAUL, S.; NAMBI, V. E.; GUPTA, R. K.; SINGH, R.; SHARMA, K.; VISHWAKARMA, R. K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, Philadelphia, p. 1-16, 2018.

EL KOMY, M. H.; SALEH, A. A.; ERANTHODI, A.; MOLAN, Y. Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. **The plant pathology Journal**, Suwon, v. 31, n. 1, p. 50, 2015.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In S. A. M. H. Naqvi (Ed.), **Diseases of fruit and vegetables**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers - The Netherlands - Springer, 2004. v. 2, p. 511-535).

EL-TARABILY, K. A.; SILVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil borne fungal plant pathogens and as plants growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, n. 6, p. 25-35, 2006.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, Campinas, v. 28, n. 5, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Anuário estatístico da 'FAOstat' de produção agrícola**. Statistical database. Roma:

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

Anuário estatístico da ‘FAOstat’ de produção agrícola. Statistical database. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

FRANÇA, G. S.; DA COSTA, C. R. R.; NEVES, R. P.; ARAUJO, E. R.; LARANJEIRA, D. Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 31, n. 2, 2015.

FUENTEFRIA, A. M. **Bioprospecção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos.** 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

GAMAGAE, S. U.; SIVAKUMAR, D.; WIJERATNAM, R. W.; WIJESUNDERA, R. L. C. Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. **Crop Protection**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 775–779, 2003.

GÜITRÓN, A. L.; SANTOYO, C. M.; BASURTO, O. R. I.; ROSALES, B. P. U.; SÁNCHEZ, R.J. A. Optimisation of the spray drying process of formulating the post-harvest biocontrol agent *Meyerozyma caribbica*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxon, p. 1-17, 2018.

GUPTA, V. G.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I. TUOHY, M. (Ed.). Newnes: Elsevier, **Biotechnology and biology of Trichoderma**, 2014. v. 87, 549 p.

HATANO, K. I.; TAKAHASHI, K.; TANOKURA, M. Bromelain, a Bromelain Inhibitor from Pineapple Stem: Structural and Functional Characteristics. **Protein and peptide letters**, Gainesville, v. 25, n. 9, p. 838-852, 2018.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, New York, v. 158, n. 1, p. 17-25, 2012.

IBRAHIM, N. F.; MOHD, M. H.; NOR, N. M. I. M.; ZAKARIA, L. First report of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* associated with pineapple rot in Peninsular Malaysia. **Plant Disease**, St Paul, v. 99, n. 11, p. 1650-1650, 2015.

IBRAHIM, N. F.; MOHD, M. H.; NOR, N. M. I. M.; ZAKARIA, L. *Fusarium fujikuroi* causing fusariosis of pineapple in peninsular Malaysia. **Australasian Plant Disease Notes**, Ottawa, v. 11, n. 1, p. 21, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados**. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2017/lspa_201712.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2017/lspa_201712.pdf)>. Acesso em 18 de dez de 2017.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathol**, St Paul, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

JANISIEWICZ, W. J. Control of postharvest diseases of fruits with biocontrol agents. **Food & Fertilizer Technology Center**, Taipei, p. 56-68, 1991.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 39, n. 3, p. 131-133, 1964.

KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. "Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex" **Fungal divers**, Texas, v. 34, n.1, p. 1-21, 2009.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. **Blackwell Publishing**, Oxford, v. 2, n. 10, p. 369, 2006.

MATEI, S.; MATEI, G. M.; CORNEA, P.; POPA, G. Characterization of soil *Trichoderma* isolates for potential biocontrol of plant pathogens. **Soil Forming Factors and Processes from the Temperate Zone**, Pitesti, v. 10, n. 1, p. 29-37, 2012.

MATOS, A. P. Doença e seu controle. In: CUNHA, DA G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. (Eds.). **O abacaxizeiro: Cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa, 1999, v. 2, p. 269-305 (Boletim Técnico).

- MATOS, A. P. Métodos de inoculação com *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* MR & RG em abacaxi 'Pérola'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.1, n. 1, p. 37-41, 1978.
- MATOS, A. P. Pineapple fusariosis in Brazil: an overview. **Fruits**, France, v. 42, n. 7, p. 417-422, 1987.
- MATOS, A. P.; CABRAL, J. R. S. **Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2005, p. 2. (Boletim técnico - Abacaxi em Foco, 32).
- MATOS, A. P.; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: Characteristics, Research and Perspectives. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 822, n. 1, p. 25-36, 2009.
- MONTEIRO, N. C. **Respostas de defesa em *Nicotiana tabacum* cv. SR1 induzidas pela peptideogalactomanana presente na parede celular de *Fusarium oxysporum***. 2017, 87 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.
- MOREIRA, B. C.; JUNIOR, P. P.; JORDÃO, T. C.; DA SILVA, M. D. C. S.; STÜRMER, S. L.; SALOMÃO, L. C. C.; KASUYA, M. C. M. Effect of inoculation of symbiotic fungi on the growth and antioxidant enzymes' activities in the presence of *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* in pineapple plantlets. **Acta physiologiae plantarum**, Heidelberg, v. 38, n. 10, p. 235, 2016.
- NASCENTE, A. S.; DA COSTA, R. S. C.; COSTA, J. N. M. **Cultivo do abacaxi em Rondônia**. Rondônia: Embrapa, 2005, p. 29-05 (Boletim Técnico – Sistema de Produção, 3).
- NASEBY, D. C.; PASCUAL, J. A.; LYNCH, J. M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 88, n. 1, p. 161-169, 2000.

- NEVEU, B.; LABBÉ, C.; BÉLANGE, R. R. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: A case study with *Pseudozyma flocculosa*. **Journal of Microbiological Methods**, Korea, v. 68, n. 2, p. 275–281, 2007.
- NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, Wallingford, v. 17, n. 1, p. 35N-44N, 1996.
- OLIVEIRA, M. E. M.; DE ANDRADE, F. P.; GOIS, G. N. S. B.; DA SILVA, I. C. C.; DA SILVA, L. M. O.; DE SOUZA, J. E. A.; DE SOUZA, A. A. K. The importance of monitoring the identity and quality standards in fruit pulp industry. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 17-26, 2016.
- PIMENTA, R. S.; SILVA, J. F. M.; COELHO, C. M.; MORAIS, P. B. Integrated control of *Penicillium digitatum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. **Brazilian Journal of Microbiology**, Korea, v. 41, n. 2, p. 404-410, 2010.
- PINTO, V. Z.; RODRIGUES, V. N.; DOS SANTOS, D. F.; DOS SANTOS, G. H. F.; BITENCOURT, T. B. Market research, elaboration and characterization of pineapple liqueur. **Revista Produção e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 34-42, 2017.
- RAMALLO, L. A.; MASCHERONI, R. H. Quality evaluation of pineapple fruit during drying process. **Food and bioproducts processing**, Rugby, v. 90, n. 2, p. 275-283, 2012.
- ROMANAZZI, G.; SMILANICK, J. L.; FELIZIANI, E.; DROBY, S. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. **Postharvest Biology and Technology**, Netherlands, v. 113, p. 69-76, 2016.
- ROSA, M. M.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sblinolum* in sorgum. **World Journal Microbiol biotechnol**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 1491-1502, 2010.
- ROSALES, B. P. U.; SANTOYO, S. M.; VILLEGAS, S. R.; ÁLVAREZ, O. N. A.; SÁNCHEZ, R. J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control

of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, San Diego, v. 65, n. 3, p. 293–301, 2013.

SANTOS, R. L. M. S. Técnicas de inoculação com *Fusarium subglutinans* em folhas destacadas de abacaxizeiro e estudos da interação patógeno/hospedeiro. 1996, 45 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 1996.

SARAVANAKUMAR, G.; KIM, J.; KIM, W. J. Reactive-Oxygen-Species-Responsive Drug Delivery Systems: Promises and Challenges. **Advanced Science**, Hoboken, v. 4, n. 1, p. 1600124, 2017.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, San Diego, v. 50, p. 205–221, 2009.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 21-43, 2010.

SOBOWALE, A. A.; ODEBODE, A. C.; CARDWELL, K. F.; BANDYOPADHYAY, R.; JONATHAN, S. G. Antagonistic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and *T. hamatum* resident on maize (*Zea mays*) plant against *Fusarium verticillioides* (Nirenberg) isolated from rotting maize stem. **Archives of Phytopathology and Plant protection**, London, v. 43, n. 8, p. 744-753, 2010.

SOUZA, E. H. **Pré-melhoramento e avaliação de híbridos de abacaxi e banana para fins ornamentais**. 2010, 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

SOUZA, W. C. O.; NASCIMENTO, L. C.; OLIVEIRA, M. D.; PORCINO, M. M.; SILVA, H. A. Genetic diversity of *Fusarium* spp. in pineapple ‘Pérola’ cultivar. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 150, n. 4, p. 853-868, 2018.

SPADARO, D. D. S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends Food Science Technology**, Netherlands, v. 47, p. 39–49, 2016.

SRIRAM, S.; SAVITHA, M. J.; ROHINI, H. S.; JALALI, S. K. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oligonucleotide barcode and morphological characters. **Current Science**, Bangalore, p. 1332-1340, 2013.

STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; MENDOZA-MENDOZA, A.; STEWART, A. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. **Microbiology**, Netherlands, v. 156, n. 10, p. 2887-2900, 2010.

TALIBI, I.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E. H.; AIT BEM, A. A. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. **Journal of applied microbiology**, Hoboken, v. 117, n. 1, p. 1-17, 2014.

TRISTÃO, G. B.; MALTA, C. M.; BORGES, A. K. P.; DE MORAIS, P. B.; DA SILVA, J. F. M.; PIMENTA, R. S. Leveduras associadas a frutos de abacaxi (*Ananas comosus*) e sua utilização como agentes de controle biológico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, Espirito Santo do Pinhal, v. 9, n. 2, 2012.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. **Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos**. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 41-55.

VEENSTRA, A.; RAFUDEEN, M. S.; MURRAY, S. L. *Trichoderma asperellum* isolated from African maize seed directly inhibits *Fusarium verticillioides* growth in vitro. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, p. 1-5, 2018.

VENTURA, J. A.; MAFFIA, L. A.; CHAVES, G. M. Field induction of fusariosis in pineapple fruits with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wr. & Reg. **Fruits**, Paris, v. 36, n. 11, p. 707-710, 1981.

VERMA, R. P.; HANSCH, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical–biological functions and (Q) SARs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 2223-2268, 2007.

VIANA, F. M. P.; LIMA, J. R.; LIMA, J. S. **Leveduras no controle de doenças pós-colheita de frutas**. In: FARINA, R. S. I.; ARAÚJO, B. L. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo: RAPP, 2012. p.125-140.

VIANAI, S. E.; REISI, R. C.; DE JESUSI, J. L.; JUNGHANSII, D. T.; SOUZAIII, F. V. D. Caracterização físico-química de novos híbridos de abacaxi resistentes à fusariose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 7, 2013.

VICENTE, F. A.; LARIO, L. D.; PESSOA JR, A.; VENTURA, S. P. Recovery of bromelain from pineapple stem residues using aqueous micellar two-phase systems with ionic liquids as co-surfactants. **Process Biochemistry**, Perth, v. 51, n. 4, p. 528-534, 2016.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2008.

VOS, T.; BARBER, R. M.; BELL, B.; BERTOZZI-VILLA, A.; BIRYUKOV, S.; BOLLIGER, I.; DUAN, L. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, Lodon, v. 386, n. 9995, p. 743-800, 2015.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, Barcelona, v. 101, n. 1, p. 292–297, 2010.

CAPÍTULO II

First report of *Fusarium sororula* causing fusariosis of pineapple in Brazil

First report of *Fusarium sororula* causing fusariosis of pineapple in Brazil

T.S. Santos, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **I.L. Coelho**, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **T.R.P. Almeida**, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **M.G. Oliveira**, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **T.B. Torres**, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **W.C.O. Souza**, Department of Phytotechny, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 58397-000, Paraíba, Brazil; **L.C. Nascimento**, Department of Phytotechny, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 58397-000, Paraíba, Brazil; **D. Laranjeira***, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil.

* Corresponding author

In the Northeast of Brazil, the production of pineapple (*Ananas comosus* L.) represents important economic value, but is significantly affected by fusariosis, caused by *Fusarium* spp. In November 2014, pineapple plants of the Pérola variety were diagnosed with rot symptoms in a production area located in Pombos, Pernambuco State, Northeast Brazil (8°08'21.2"S 35°23'49.9"W). Plants and fruits exhibited resin exudation and, internally, symptoms of rot, with tissue of soft consistency and dark brown coloration. Fragments of fruit tissue were removed from the symptomatic transition region, were surface disinfected (30 s in 70%, alcohol 1 min in 1% NaOCl and washed twice in sterile water), plated in

potato dextrose agar medium - PDA and incubated for 7 days at 26 °C. Ten isolates morphologically similar to *Fusarium* were obtained after the purification of the colonies and were preserved by the Castellani method. Pathogenicity tests were performed on fruits and pineapple plants of the same variety as above (four fruits or plants/isolate) piercing the tissue with toothpicks previously infected with spore suspension at 1×10^6 spores ml^{-1} (two inoculation points/fruit or plant). The negative control was represented by fruits perforated with toothpicks, immersed in sterile water. Differently from the negative control that did not present symptoms of rot, the inoculated fruits and plants expressed the same symptoms observed in the field, after 12 and 60 days of incubation at 22 °C and 70% RH and 28 °C and 78% RH, respectively. Performing the Koch postulates, the pathogen was re-isolated from the symptomatic tissues. In PDA, the colonies of *Fusarium* presented hyphae with pink to white color, adherent to the medium, forming unicellular and hyaline microconidia which were ovoid or ellipsoid and 1.0-3.0 μm long x 1.0-2.0 μm wide. Macroconidia, produced in small quantities, were elongated, ellipsoid and slightly curved, 5.0-14.0 μm long and 1.0-2.0 μm wide. In the reverse of the plates, the colonies present sectoral patches or large parts with purple to dark purple coloration, phenotypically resembling the characteristics of *F. sororula* (Herron et al., 2015). The ten isolates were partially sequenced at the *rpb2* locus and, after a comparative analysis among the ten isolates and finding haplotype similarity, a representative isolate – CFS 212 was selected for additional sequencing of *tefl-a* and ITS (access numbers NCBI: KX437647, MK316363 and MK314466) and comparison with other *Fusarium* species described. Compared with other taxa in the NCBI database, CFS 212 was 99% similar (e-value = 0) to CMW: 40578, a member of the *F. fujikuroi* Species Complex (FFSC). Phylogenetic analyses of Maximum Likelihood - ML and Bayesian Inference - BI, including previously published sequences of species belonging to FFSC (Moussa et al., 2017), grouped the CFS 212 in the clade of *F.*

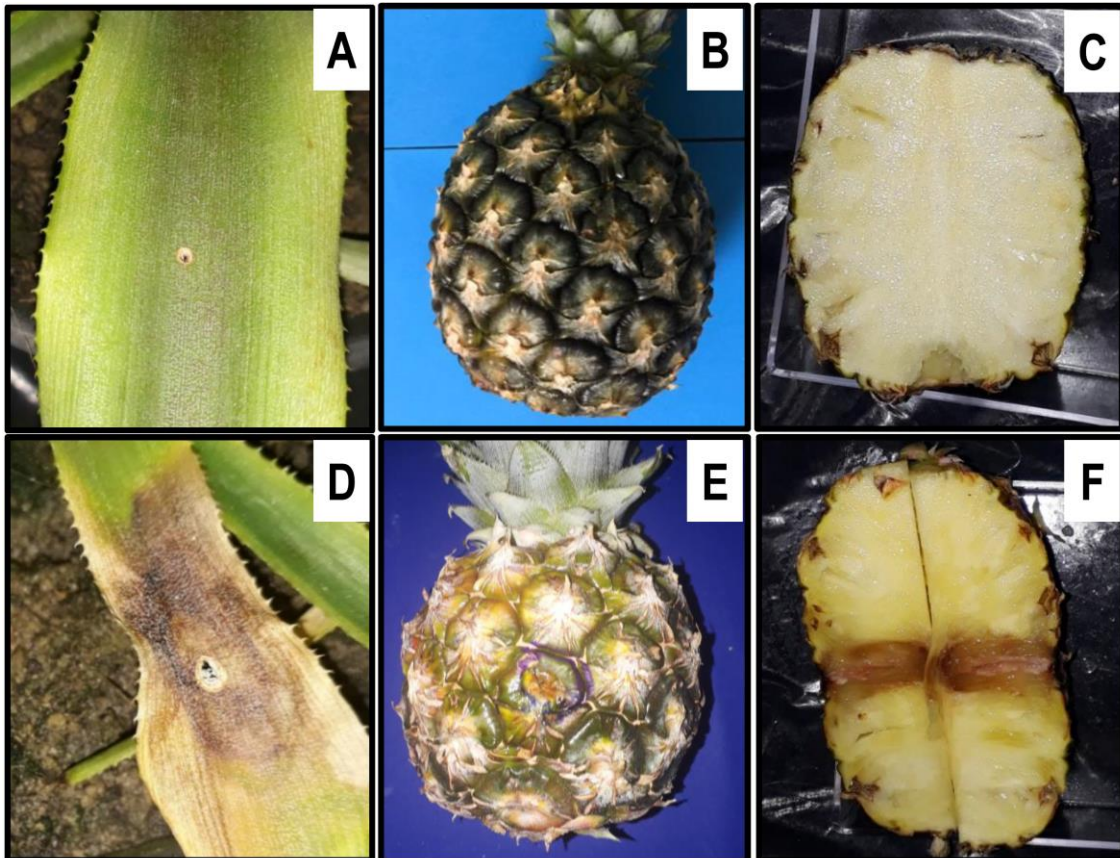
sororula with 87% bootstrap support and 0.92 posterior probability. *F. gutiforme*, *F. ananatum* and other species belonging to FFSC, were previously described as causal agents of fusariosis in pineapple in Brazil (Stepien et al., 2013), however, this is the first report of *F. sororula* in association with *A. comosus* in the world.

Reference:

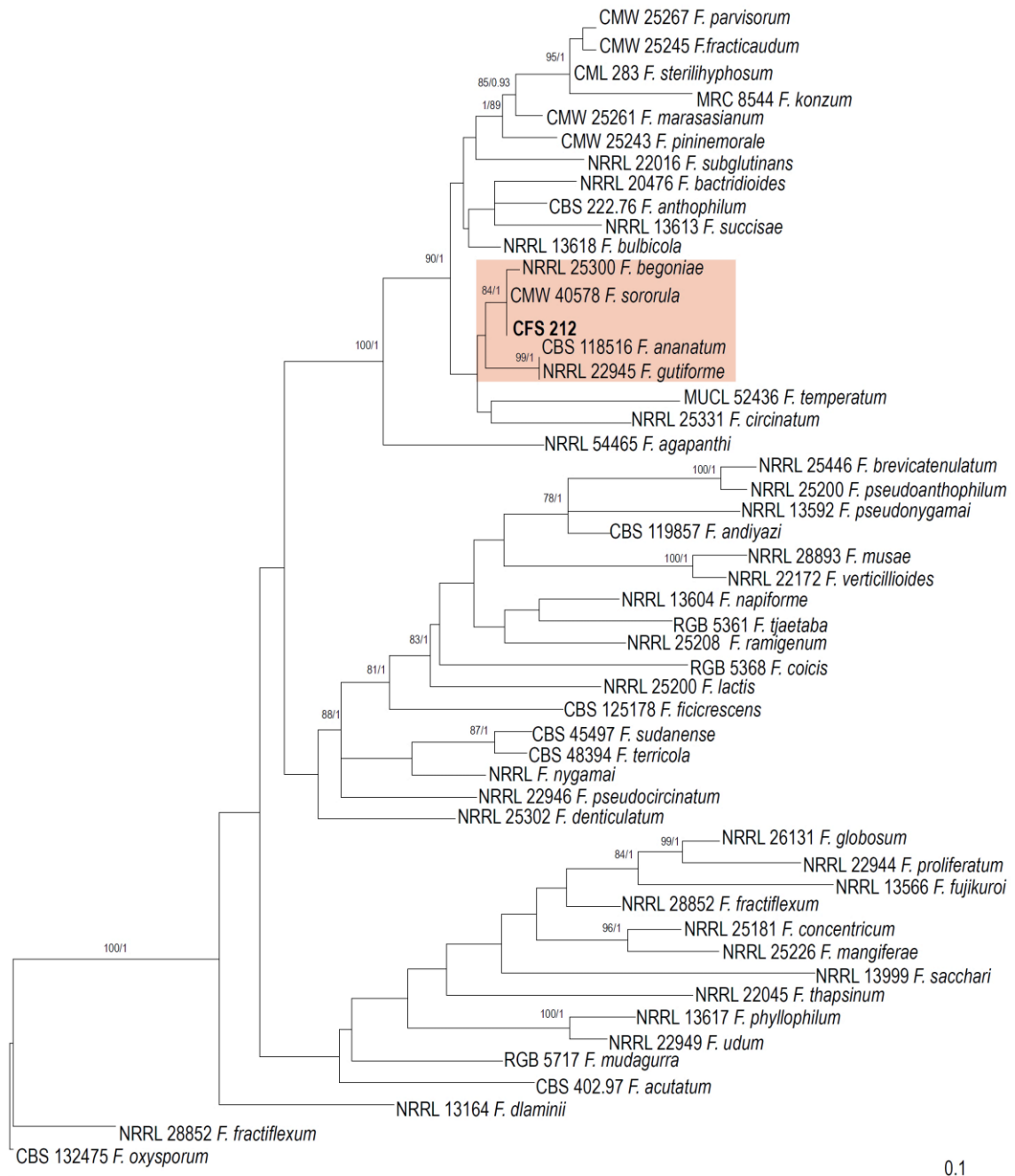
Herron D.A., Wingfield M.J., Wingfield B.D., Rodas C.A., Marincowitz S., Steenkamp E.T., 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology* 80:131-150.

Moussa T.A.A., Al-Zahrani H.S., Kadasa N.M.S., Ahmed S.A., Hoog G.S., Al-Hatmi M.S., 2017. Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 110 (6):819-832.

STEPIEN L.; GRZEGORZ K.; AGNIESKA W. 2013. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. *Journal of applied genetics* 54 (3): 367-380.



Supplementary figure 1. Fusariosis in *Ananas comosus* L.: asymptomatic leaf (A) and fruit (B, C); External symptoms of necrotic lesion in leaf (D) and fruit rot (E); Internal symptoms in fruits, with softening, rotting and darkening, exhibiting dark brown coloration of the tissues (F) inoculated with *Fusarium sororula* by wounding with a toothpick.



Supplementary figure 2. Phylogenetic tree generated by Maximum Likelihood – ML and Bayesian Inference – BI analysis, of 50 taxa belonging to the species described in the complex *Fusarium Fujikuroi*, with 1922 characters, 50,000,000 generations and 4 mcmc, based on the *tef1- α* , ITS and *rpb2* gene regions. The tree was rooted with the specie *F. oxysporum* (CBS 132475). Bootstrap values above 70% (indicating ML / MP) and posterior probability above 0.9 are arranged in the branches, close to the nodes. The taxon in bold was obtained in this study and is in the highlighted group.

CAPÍTULO III

Potencial antagônico de *Meyrozyma caribbica* em *Fusarium* spp. do abacaxizeiro

Potencial antagônico de *Meyrozyma caribbica* em *Fusarium* spp. do abacaxizeiro

Tarciana Silva dos Santos^{a*}, Iwanne Lima Coelho^a, Thais Regina Pintino de Almeida^a, Igor Alexander de Melo Pimentel^a, Wilza Carla Oliveira de Sousa^b, Luciana Cordeiro do Nascimento^c, Delson Laranjeira^{a*}

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil

^b Doutora em Agronomia, Rua Manoel da Gama Neto, nº 588, Jardim Amazonas, CEP: 56318-380, Petrolina-PE, Brasil

^c Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, Campus II, Centro, CEP: 58397-000, Areia-PB, Brasil

* Autores correspondentes. Endereço de E-mail: tarcianaagronomia@gmail.com (Tarciana Silva dos Santos) e delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira).

Resumo

Nas regiões produtoras de abacaxi, a fusariose, causada por *Fusarium* spp. ocasiona perdas significativas na produtividade. Foram avaliados dois isolados de *Fusarium* spp. (*F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213) quanto a sua patogenicidade e virulência, visando selecionar biocontroladores eficazes. Isolados de leveduras obtidas epifiticamente do abacaxizeiro foram aplicados sobre folhas destacadas cv. Pérola, e avaliadas quanto a sua atividade antagônica ao CFS212. Leveduras foram selecionadas por inibir o progresso da doença, e avaliadas quanto a produção de biofilme, fator *Killer*, ação antibiótica ao CFS212 e a produção de enzimas hidrolíticas, *in vitro*. Após os testes, cinco isolados se destacaram e foram identificados molecularmente como *Meyerozyma caribbica*, por comparação filogenética da região gênica ITS. Ensaio *in vivo*, com *M. caribbica* contra os isolados CFS212 e CFS213, foram executados com frutos e mudas da cv. Pérola. Em frutos, a levedura inibiu o desenvolvimento da lesão causada por os *Fusarium* spp., no SST (°Brix) não foi observado variação no teor de açúcares e detectada baixa acidez total ao CFS212. Em mudas, as leveduras reduziram significativamente à área abaixo da curva de progresso da doença e a profundidade de lesão para os dois *Fusarium* spp. Através do microparasitismo de *M. caribbica* sobre os *Fusarium* spp. foram observadas, mal formação, degradação, extravasamento, vaculose nas hifas dos patógenos, e um possível biofilme de *M. caribbica* próximo as hifas dos patógenos incubados em BDA. Os resultados mostram um alto potencial de *M. caribbica* para inibição de *Fusarium* spp. *in vivo* e *in vitro*, o que impulsionam expectativas acerca do biocontrole para a fusariose do abacaxizeiro.

Palavras chave: *Ananas comosus*, controle biológico, leveduras, *Fusarium sororula*, *Fusarium oxysporum*

1. Introdução

O Brasil, por ser um grande celeiro agrícola tropical, apresenta grande expressão econômica na exportação de frutas para várias regiões do mundo. A cultura do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr. var. *comosus*) é uma cultura adaptada as condições climáticas dos trópicos e os seus frutos muito apreciados pelos consumidores, características que conferem ao Brasil primeira posição no *ranking* mundial de produção dessa fruta (FAO, 2013). Duas regiões brasileiras são destaque nacional na produção de abacaxi, na região Nordeste o estado da Paraíba, seguindo pela a região Norte o estado do Pará (IBGE, 2016).

Entre os principais problemas fitossanitários que acometem essa cultura, encontra-se a fusariose, causada por *Fusarium* spp. Esta doença estar presente em todas as regiões produtoras do Brasil (Nogueira et al., 2014). Sua ocorrência afeta a comercialização dos frutos (FAO, 2009), com perdas estimadas em torno de 30-40% dos frutos e 15-20% do material propagativo (Ventura et al., 2009). A utilização de material propagativo infectado, por sua vez, representa como o principal veículo transmissor da doença, principalmente no tangente cultivo das variedades ‘Smooth Cayenne’ e ‘Pérola’, extremamente susceptíveis a doença, porém mantidas entre as mais cultivadas no Brasil (Aquiye et al., 2010), o que dificulta o manejo fitossanitário dessa doença.

O principal manejo recomendado para o *Fusarium* spp. em abacaxizeiro baseia-se no método químico, entretanto, o uso intensivo de fungicidas sistêmicos têm favorecido a seleção de patógenos resistentes (Santos et al., 2002). Assim alternativas que reduza o emprego de defensivos agrícolas tem despertado grande interesse econômico e, nesse contexto, o biocontrole ganha destaque, sabendo-se que várias espécies fúngicas podem suprimir doenças em plantas (Hilber-bodmer et al., 2017; Mendes et al., 2013; Champarro et al., 2012).

As leveduras participam desse cenário, como potenciais agentes antagônicos, no tocante a fusariose do abacaxizeiro existe apenas um relato científico com biocontrole desempenhado por leveduras, citando as espécies *Candida Krusei* (Castellani) Berkhout (1923) e *Kloeckera apis* Lavie ex M.T. Sm., Simione & S.A. Mey. (1977) à *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (1998) (Korres et al., 2011). Com relação à levedura *Meyerozyma caribbica* (Vaughan-Mart., Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill) Kurtzman & M. Suzuki (2010), ainda não há relatos sobre utilização e/ou ação sobre *Fusarium* spp., entretanto, já foi evidenciado um alto potencial antagônico a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc (1984) em mangas, por exemplo (Bautista-Rosales et al., 2013).

A capacidade biocontroladora de leveduras sobre fitopatógenos depende dos seus vários mecanismos antagônicos como: competição por espaço e nutrientes; produção de antibióticos; parasitismo direto; secreção enzimática; produção de biofilme; toxinas *Killer* e inibição de crescimento (Li et al., 2011; Liu et al., 2010; Godoy; Ganga, 2017; Batista-Rosales et al., 2013; Bajaj et al., 2013), além da capacidade de se manter viáveis em diversas condições de estresse, como: altas e baixas temperaturas (Perez et al., 2016).

Diante do exposto, tais informações aguçam o interesse pelo desenvolvimento de estratégias e novas metodologias, por meio da seleção de micro-organismos que tenham efeitos antagônicos, a serem empregadas no controle de fitopatógenos, corroborando para a produção de alimentos saudáveis. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade biocontroladora da levedura *M. caribbica* sobre *Fusarium* spp., em frutos e mudas de abacaxizeiro da cv. Pérola.

2. Material e métodos

2.1 Isolados patogênicos

Os isolados de *Fusarium* spp. utilizados foram *F. sororula* – CFS212 proveniente de Pombos-PE (8°08'21.2"S 35°23'49.9"W) e *F. oxysporum* – CFS213, coletado em Alhandra-PB (7°25'56.1"S 34°54'42.3"W) previamente identificados como componentes do Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi* – FFSC, e do Complexo de Espécies *Fusarium oxysporum* – FOOSC, respectivamente (Souza et al., 2018), no qual ambos cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Campus II, Areia-PB.

Todos os isolados foram mantidos por cultivos periódicos em meio Batata Dextrose Ágar – BDA (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil), sob uma temperatura de 25 ± 2 °C, e preservados a 10 °C em tubos criogênicos de acordo com Castellani (Castellani, 1963).

2.2 Obtenção dos isolados de leveduras

As leveduras foram obtidas a partir de tecidos de frutos e folhas da coroa do abacaxizeiro cv. Pérola, coletados em feiras livres nos municípios de Camaragibe – PE (08°01'13"S 34°58'54"W) e Areia – PB (06° 57'48"S 35°41'30"W), segundo metodologia de Assis et al. (1999).

Os isolados foram mantidos por cultivos periódicos em meio Sabouraud Dextrose Ágar – SDA (Sigma Aldrich, USA), suplementado com extrato de levedura (1,5 g l⁻¹), sob temperatura de 25 ± 2 °C e preservadas de acordo com o método Castellani (1963), como descrito acima, e em tubos criogênicos contendo meio sabouraud dextrose ágar – SDA, acrescido de óleo mineral após crescimento das colônias conforme descrito por Mariano et al. (2007). Todos os isolados obtidos foram depositados na Coleção de Fungos de Solo –

CFS do laboratório de Fungos de Solo da Universidade Federal Rural do Pernambuco – LAFSOL/UFRPE.

2.3 Patogenicidade e agressividade de *Fusarium* spp.

O teste de patogenicidade foi realizado em folhas destacadas de abacaxizeiro da cv. Pérola. As folhas foram desinfestadas com NaOCl 0,5% por cinco minutos, lavadas em água corrente e secas em ambiente natural sobre papel toalha. Depois de acomodadas em bandejas de polietileno, em sua porção central com auxílio de uma agulha hipodérmica foi efetuado um pequeno ferimento nas folhas, e sobre este depositado um disco de BDA (5 mm) contendo estruturas fúngicas de cada isolado de *Fusarium* spp. (*F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213), separadamente.

Para cada tratamento utilizou-se cinco repetições e como testemunha depositou-se no lugar do ferimento um disco de BDA (5 mm), sem estruturas fúngicas patogênicas. As folhas pós-inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas, a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, mantendo-as incubadas por dez dias, aferindo-se diariamente o diâmetro das lesões em eixos perpendiculares, com auxílio de um paquímetro digital.

A patogenicidade foi verificada pela presença ou não de sintomas típicos e a agressividade pela média de dois eixos da lesão, calculada através da área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD, pela soma das médias em cada intervalo de avaliação. O período de incubação foi determinado de acordo com o intervalo de tempo entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas.

2.4 Seleção dos isolados de leveduras

O potencial biocontrolador de leveduras à fusariose do abacaxizeiro foi determinado a partir de ensaios *in vivo* utilizando todos os isolados obtidos de leveduras. A

suspensão de células de leveduras (1×10^7 células mL^{-1}), foi preparada em água destilada esterilizada - ADE, a partir de colônias cultivadas em meio SDA por três dias, acrescida de Tween 20 (1%), e pulverizada sobre folhas destacadas de abacaxizeiro (cinco folhas/isolado).

Após incubação de 24 h, as folhas foram inoculadas por ferimento e depositado um disco de BDA (5 mm) contendo estrutura de *F. sororula* - CFS212. Como controle, as folhas foram pulverizadas com ADE no lugar dos isolados de leveduras, e inoculadas o patógeno no local do ferimento.

Após 24 h de incubação em câmara úmida as folhas foram mantidas sob fotoperíodo de 12 h a 25 °C por dez dias, com aferição do diâmetro das lesões a cada 48 horas, com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados das avaliações foram submetidos ao cálculo para a AACPD através da soma das médias das lesões com o intervalo de avaliações, para comparação dos dados.

2.5 Caracterização das leveduras antagônicas *in vitro*

2.5.1 Produção de biofilme

As leveduras selecionadas foram cultivadas por três dias em SDA líquido e a concentração de células ajustada para 1×10^7 células ml^{-1} . Alíquotas de 100 μl suspensão foram depositadas (em quadruplicata) em poços de microplacas de microtitulação (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil) e, na testemunha a suspensão de células foi substituída por meio de cultivo estéril. As microplacas foram incubadas por três horas à 28 °C em agitação de 75 rpm, os procedimentos de lavagem, reposição de meio, coloração com cristal violeta (0,4%) e descolaração com etanol (95%) foram realizados conforme Shin et al. (2002) e Naves et al. (2008). A capacidade de formação de camadas de biofilme foi observada qualitativamente por meio da comparação de intensidade de coloração de cada

isolado, proveniente da absorção e acúmulo de cristal violeta pelas células leveduriformes, em relação ao tratamento controle.

2.5.2 Fator Killer

Aos isolados de leveduras selecionados foram avaliados quanto à capacidade de expressão do fator “Killer” durante a interação com uma levedura previamente caracterizada como killer sensível. Para a levedura sensível *Kodamaea ohmeri* - cFS044 preparou-se suspensão de células a 1×10^6 células mL⁻¹ em tampão fosfatado salino - TFS e, com o auxílio de “Swab estéril”, a suspensão foi uniformemente semeada em meio SDA acrescido de azul de metileno (0,005%). As leveduras a serem caracterizadas foram depositadas em arranjos pontuais equidistantes (Woods e Bevan, 1968). Como controle negativo, utilizou-se um isolado previamente caracterizado como “Killer” negativo. Após incubação a 22 ± 2 °C por 24 a 48 h, as colônias que apresentaram coloração azul nas bordas e/ou um halo translúcido de inibição foram consideradas, positivas quanto à produção do fator *killer*.

2.5.3 Ação antibiótica

A ação antagônica por antibiose foi avaliada através de cultivos pareados entre o fitopatógeno e antagonista em meio BDA. As leveduras selecionadas foram semeadas pontualmente, em arranjo radial e equidistante, nas extremidades da placa de Petri aproximadamente 0,5 mm de distância da borda, com auxílio de “Swab estéril”. Posteriormente, um disco de meio de cultivo - BDA (0,5 mm de diâmetro), contendo estruturas do patógeno (*Fusarium sororula* – CFS212), foi depositado no centro da placa.

Como testemunha, um tratamento foi realizado sem a utilização da deposição das leveduras na extremidade da placa. Os ensaios foram realizados em quadruplicata e as

placas incubadas por dez dias à 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, avaliando-se a presença ou ausência do halo de inibição entre o crescimento do patógeno e o antagonista.

2.5.4 Avaliação enzimática em meios sólidos

A avaliação de expressões enzimáticas foi realizada qualitativamente em meios indicadores semissólidos, para: (a) lipase de acordo com o meio de Sierra (1957), acrescido de Tween 80; (b) amilase por Lodder (1952), contendo 0,2% de amido solúvel Conn et al. (1957); (c) celulase conforme Lewis (1988), usando um meio de sais minerais-ágar (Tuite, 1969), suplementado com celulose; (d) pectinase segundo Hankin et al. (1971); (e) protease através de Smiberg e Krieg (1981); (f) fosfatase e esterase foi determinada segundo Taylor (1974).

Em cada meio específico, as leveduras foram semeadas pontualmente com auxílio de um palito de madeira estéril, sendo uma linhagem de levedura por placa, em quadruplicata. Como testemunha um tratamento foi conduzido sem a deposição da levedura nos meios enzimáticos avaliados.

As placas foram incubadas a 25 ± 3 °C e após 24 horas, observou-se diariamente a formação ou não de um halo translúcido para amilase, protease, lipase e esterase, em volta das colônias leveduriformes. Para verificação das enzimas celulase e pectinase, após o período de 24 horas utilizou-se, respectivamente, as soluções reveladoras de vermelho congo (5 ml/placa) e ácido clorídrico - HCl (5 ml a concentração de 2N/placa), respectivamente, a fim de evidenciar a presença de halo em volta das colônias no meio (Damaso et al., 2012).

2.6 Identificação de espécies

Para os isolados de leveduras selecionadas em testes antagônicos *in vitro*, a identificação a nível específico foi realizada a partir de DNA genômico, extraído segundo protocolo modificado de Murray e Thompson (1980), amplificação e sequenciamento de regiões gênicas. A região ITS foi amplificada, utilizando os Primers ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3').

As ciclagens térmicas das PCRs foram realizadas em um termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Scientific, Waltham, USA), sob a condição: desnaturação inicial 95 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 45 seg, 57 °C durante 30 seg, 72 °C durante 1 min/30 seg e extensão final a 72 °C durante 5 min. Os produtos de PCR foram corados com SYBR™ Gold (Thermo Scientific, Waltham, USA), e visualizados em gel de agarose (1%) e as amplificações bem sucedidas foram purificadas com kit PureLink™ PCR, de acordo com o fabricante, e o produto sequenciado diretamente por um método de eletroforese capilar em aparelho ABI3730 (Myleus Facility, Belo Horizonte, Brasil).

As sequências foram editadas em contigs e as sequências consenso comparadas via BLAST na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) e por Análise de Máxima Verossimilhança - MV e Inferência Bayesiana - IB aproximada com as sequências referência de ex-tipo, recuperadas no Genbank, no portal CIPRES (<https://www.phylo.org>). Novas sequências incluídas nesse estudo foram depositadas no GenBank.

2.7 Potencial antagônico *in vivo*

O potencial biocontrolador de *Fusarium* spp., por ação antagônica da levedura *in vivo*, foi avaliado em frutos e em mudas de abacaxizeiro, inoculadas com os isolados *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213.

2.7.1 Frutos

Os frutos de abacaxizeiro da cv. Pérola, provenientes de produção comercial localizada no município de Santa Rita-PB e selecionados de acordo com: sanidade, tamanho, estágio de maturação e cor, foram desinfestados por imersão em NaOCl 1% (20 min), lavados em água corrente, secos em papel toalha, e posteriormente, acondicionados em bandejas de polietileno.

Após secagem, os frutos foram imersos em suspensão de células da levedura selecionada, preparada em ADE a concentração de 1×10^8 células ml^{-1} + 1% de Tween 20 e acondicionados individualmente em bandejas de polietileno para secagem a 22 °C. Após 24 horas de incubação, os isolados patogênicos *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 foram inoculados em dois pontos da superfície dos frutos de abacaxi por meio da penetração e remoção de um palito de madeira (2,4 mm de diâmetro x 1,5 cm de profundidade), infestado com a concentração de 1×10^6 esporos ml^{-1} , para isso o palito foi previamente esterilizado em autoclave vertical por 30 min (Oliveira et al., 2011).

Os frutos foram acondicionados em câmara úmida por 24 horas e incubados por dez dias a 22 °C, 70% UR, e fotoperíodo de 12 horas. Após período de incubação, avaliou-se tamanho da lesão – TL com o seccionamento dos frutos, onde foram inoculados os patógenos; o nível de sólidos solúveis totais – SST (°Brix), e ácidos totais - AT conforme a metodologia do Instituto Adolfo Lutz – IAL (Adolfo, 1985).

O delineamento experimental foi utilizado em Blocos Casualizados – DBC, com quatro blocos e cada um com quatro repetições. Como padrão de comparação, foram utilizados três tipos de controle: controle absoluto - CA (frutos desinfestados sem inoculação dos patógenos); controle positivo – CP (frutos com a aplicação de ADE e inoculados com os patógenos); e controle químico – CQ (frutos tratados com Cercobim 700 PM[®] - 70 g p. c. /100 l⁻¹ de água e inoculados com os patógenos.

2.7.2 Mudas

As mudas utilizadas no experimento eram micropropagadas de abacaxizeiro da cv. Pérola, comercializadas pela empresa Clona-Gem® (Joinville-SC), a fim de garantir o alto padrão fitossanitário. Após o transplante, as mudas foram adaptadas e mantidas em casa de vegetação, cultivadas em vasos com capacidade para três litros contendo substrato esterilizado. As plantas foram mantidas por irrigação periódica (100 ml/dia), conforme sua necessidade hídrica, e adubadas com macro e micronutrientes Qualifol®, a cada 15 dias.

Após 60 dias, quando as plantas atingiram um crescimento médio de 30 cm de altura, as folhas foram tratadas por aspersão de suspensão de células da levedura selecionada, preparada em ADE + 1% de Twen 20 (1×10^8 células ml^{-1}).

A inoculação dos patógenos constituiu na base da folha D, em duas folhas por planta, com os fitopatógenos *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213, após 24 horas ao tratamento com a levedura selecionada, com um palito de madeira infestado com a suspensão de esporos de *Fusarium* spp. (1×10^5 esporos ml^{-1}), conforme descrito acima na inoculação de frutos.

As plantas inoculadas foram acondicionadas em câmara úmida por 48 horas e mantidas em casa de vegetação por 90 dias, em médias de 28 °C e 73 % de umidade relativa. A cada 15 dias avaliou-se o tamanho da lesão, para cálculo de área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD, através da soma das médias das lesões com o intervalo de avaliações, a expansão da doença com a profundidade dos sintomas no tecido vascular até a região radicular da planta - PL. O experimento foi conduzido em blocos casualizados - DBC, com quatro blocos, cada um com quatro repetições. Assim como no experimento com os frutos, contou com três tipos de controle: CA, CP e CQ.

2.8 Comportamento micoparasítico da levedura sobre *Fusarium* spp.

O micoparasitismo da levedura selecionada sobre os isolados *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 foi avaliado pelo método de cultivo pareado. Em meio BDA, vertido em placas de Petri (90 cm) em espessura de aproximadamente 0,5 cm, foi adicionado o isolado antagonista qual foi disposto paralelamente, a uma distância aproximada de 1 cm do patógeno, um isolado por vez, sendo empregado quatro repetições por cada combinação levedura/isolado.

Após incubação por 48 h a 28 °C, fragmentos de meio de cultivo contendo regiões de transição entre as hifas do patógeno e colônia do antagonista, foi removido, com auxílio de uma lâmina de bisturi e observados em um microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E600), com objetivas com aumento de 100x, a fim de estudar as interações entre os micro-organismos (Matroudi et al., 2009).

2.9 Análises estatísticas

As comparações e determinações de potencial biocontrolador, entre isolados utilizados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram realizadas separadamente, por meio de análise de variância - ANOVA. Para as análises significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Scott-knott e Least Significance Difference – LSD de Fisher a 5% de probabilidade, utilizando software Sisvar v5.6 (Ferreira, 2011).

3. Resultados

3.1 Obtenção dos isolados de leveduras

Um total de 100 isolados de leveduras, listados na **Tabela 1**, foram obtidos de folhas da coroa (50 isolados) e frutos (50 isolados) de abacaxizeiro, cv. Pérola. Em relação

ao local de coleta, 55 isolados de leveduras corresponderam de material obtido em feiras livres da cidade de Areia – PB e 45 de Camaragibe – PE.

3.2 Patogenicidade e agressividade de *Fusarium* spp.

Nos testes de patogenicidade em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. Pérola, os dois isolados *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213, pertencentes aos Complexos de Espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) e *Fusarium oxysporum* (FOSC), respectivamente, foram patogênicos, provocando lesões necróticas elípticas com contornos bem definidos, deprimidas e de coloração escura, **Figura 1**. O período de incubação, determinado pelo surgimento dos primeiros sintomas, foi o mesmo para ambos os isolados avaliados. Quanto à agressividade após 11 dias da data de inoculação, estimada pelos valores médios de AACPD, o *F. sororula* – CFS212 foi mais agressivo significativamente que o *F. oxysporum* – CFS213 (**Tabela 2**).

3.3 Seleção dos isolados de leveduras

Na triagem dos isolados de leveduras, em folhas destacadas de abacaxizeiro mostrou que, do total de 100 isolados, 55% deles inibiram significativamente o desenvolvimento do patógeno, segundo os valores de AACPD de *F. sororula* – CFS212 (**Tabela 3**). Os 66 isolados potencialmente antagônicos, que se distinguiram positivamente neste teste preliminar sobre *F. sororula* – CFS212, foram selecionados para outros testes antagônicos *in vitro*.

3.4 Caracterização das leveduras antagônicas *in vitro*

3.4.1 Produção de biofilme

Para a capacidade de produção de biofilme (PB), dos 66 selecionados e avaliados, apenas cinco isolados (L7; L24; L30; L56 e L63), foram capazes de formar biocamadas aderidas as parede dos poços em microplacas de microtitulação (**Tabela 4**).

3.4.2 Fator Killer

A maioria dos isolados de leveduras avaliados, em exceção dos isolados L33 e L79, foram capazes de expressar a produção de toxinas *Killer*, formando um halo inibição de desenvolvimento ou morte celular característico, ao redor da colônia leveduriforme, indicando presença dessa toxina *in vitro* (**Tabela 4**).

3.4.3 Ação antibiótica

Na avaliação da ação antibiótica, apenas seis isolados de leveduras (L7; L30; L46; L56; L63 e L77) produziram substâncias inibidoras a *F. sororula* – CFS212, agente causal da fusariose do abacaxizeiro, não permitindo que o fungo crescesse em direção das mesmas em meio de cultivo BDA (**Tabela 4**).

3.4.4 Avaliação o enzimática em meios sólidos

Para o experimento de avaliação qualitativa envolvendo a capacidade de produção enzimática em meios sólidos, **Tabela 5**, observou-se que, dos 66 isolados selecionados, 14 não foram capazes de expressar a produção de nenhum tipo de enzima avaliada (protease, esterase, fosfatase, celulase, amilase, pectinase e lipase). Em contrapartida, 18 isolados produziram ao menos um tipo de enzima, entre eles, cinco isolados de leveduras (L7; L24; L30; L56 e L63) se destacaram pela expressão de maior diversidade dessas enzimas (protease, esterase, fosfatase, celulase e amilase). As enzimas pectinase e lipase não foram

produzidas por nenhum dos isolados de leveduras epifíticas do abacaxizeiro, utilizadas nesse estudo.

3.5 Identificação das espécies

Para os cinco isolados de leveduras selecionadas, a partir dos testes antagônicos, as ampliações e sequenciamento da região ITS proporcionaram fragmentos de aproximadamente 700 pb. Com base nas topologias das árvores de MV e IB, geradas pelas análises filogenéticas desses fragmentos verificou-se que todos os isolados (L7, L24, L30, L56 e L63) foram agrupados com representantes tipo correspondentes a espécie *Meyerozyma caribbica*, em um único clado bem suportado com 99 de bootstrap, e depositados na plataforma Genbank sob os números de acesso:.....(Ainda não depositados).....

3.6. Potencial antagônico in-vivo

3.6.1 Frutos

Durante um período de 12 dias de incubação, nos frutos de abacaxi – cv. Pérola, tratados com suspensão de *M. caribbica* e inoculados com *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 observou-se uma redução significativa no desenvolvimento do progresso da doença. Para os valores de tamanho da lesão (TL), quando comparado ao controle (CP), houve uma redução de 28 % para *F. sororula* – CFS212 e de 59 % para *F. oxysporum* – CFS213 (**Tabela 6**), observado na **Figura 2**.

Quando comparamos o tratamento com a levedura *M. caribbica* e o tratamento com o fungicida Cercobim® (CQ), os resultados são destoantes e para ambos os patógenos. Sobre patógeno *F. sororula*, o controle químico (CQ) não desempenhou controle significativo, pelo contrário, provocou um aumento drástico da profundidade da lesão,

diferentemente o tratamento com a levedura *M. caribbica* foi significativamente eficiente. Para o patógeno *F. oxysporum*, o controle químico (CQ) e a levedura obtiveram resultados similares e significantes, controlando o avanço da doença nos frutos, quando comparado com o controle (CP) (**Tabela 6**).

A avaliação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) nos frutos mostrou que em nenhum dos tratamentos, com os isolados *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 apresentaram diferenças significativas, revelando que não ocorreu variação no nível de açúcares (**Tabela 6**).

No teor de acidez total (AT), para o isolado *F. oxysporum* – CFS213, os frutos em todos tratamentos permaneceram significativamente estáveis, diferentemente ao isolado *F. sororula* – CFS212, no qual o controle químico (CQ) proporcionou aumento significativo da acidez, quando comparados com o controle positivo (CP), no qual houve um nível intermediário de acidez, e com a levedura *M. caribbica*, em que para todos os tratamentos houve redução no nível da acidez (**Tabela 6**).

3.6.2 Mudanças

Segundo as avaliações, feitas quinzenalmente em mudas de abacaxizeiro – cv. Pérola durante 90 dias, percebeu-se que tratamentos com a levedura *M. caribbica*, para os isolados *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213, proporcionaram valores iguais estatisticamente para AACPD, indicando nível de controle semelhantes com menores índices de progressão da doença (**Figura 3**). Sequencialmente, o controle químico (CQ) com o uso do Cercobim®, e por último o controle (CP), retratarem maiores tamanhos de lesão (**Tabela 6**).

Ao final de 60 dias, em mudas tratadas com a *M. caribbica* e selecionadas para avaliação da extensão da doença, em profundidade da lesão nas raízes (PL), e, verificou-se

que para ambos isolados *F. sororula* e *F. oxysporum* houve redução do tamanho da lesão, quando comparado com os outros tratamentos (**Tabela 6**).

3.7 Comportamento micoparasítico da levedura sobre *Fusarium* spp.

As avaliações micoparasíticas da levedura *M. caribbica* à *Fusarium* spp. em particular as espécies *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 em meio de cultura BDA indica o efeito antagônico (**Figura 4**), com efeito sinérgico em suas hifas, como: mal formação (MF), degradação da parede (DH), edema (EF), extravasamento celular (EC), vaculose (VAC), e aproximação/agregação de células leveduriformes (ACL) nas hifas dos dois patógenos.

4. Discussão

Superfícies de vegetais e frutas são bons habitats para as espécies de leveduras (Ghosh et al., 2018), essas superfícies são ricas em monossacarídeos, dissacarídeos e sacarose que conferem as leveduras capacidade de assimilar esses nutrientes (Sparadaro et al., 2010). Para o abacaxizeiro em particular, características como a textura seca, aspecto áspero, presença de arranhaduras no caso dos frutos, ou de pilosidades como observado nas folhas da coroa do abacaxi, podem conferir um ambiente ideal para o desenvolvimento desses micro-organismos, protegendo estes das adversidades do meio.

O desenvolvimento de doenças e o quadro sintomatológico dependem de vários fatores, e podem tomar proporções diferentes, dependendo do órgão vegetal afetado, estádios de maturação e variabilidade de isolados fúngicos (Gu et al., 2015; Souza et al., 2010). Souza et al. (2018), avaliando a diversidade genética e níveis de agressividade de *Fusarium* spp. em abacaxi da cv. Pérola, isolados *F. oxysporum* foram considerados mais agressivos em comparação às linhagens do complexo *F. fujikuroi*, resultado diferente

encontrado nesse estudo para a agressividade das espécies *F. sororula* e *F. oxysporum* dos mesmos complexos avaliadas em folhas de abacaxizeiro.

A infecção de *Fusarium* spp. em abacaxizeiro, não se restringe a apenas um órgão vegetal, pois o fitopatógeno possui capacidade de infectar e colonizar toda a planta (Verzignassi et al., 2009). A capacidade de colonização de folhas, frutos, desempenhada por populações de leveduras, seja em condições naturais sobre tecidos sadios ou durante um processo de infecção por *Fusarium* spp. do abacaxizeiro, reforçam a hipótese de que elas possam inibir potencialmente a doença por ação competitiva.

Muitos fungos fitopatogênicos, como espécies de *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Botryosphaeria*, *Monilinia*, *Rhizopus*, inclusive de *Fusarium* (Paiva et al., 2017; Rosales et al., 2013; Chen et al., 2018; Terão et al., 2017; Grzegorzczuk et al., 2017; Netié et al., 2014) já foram relatados através do desempenho de espécies de leveduras no biocontrole.

Para o sucesso da obtenção de pelo menos uma espécie de levedura, com potencial de biocontrole a fitopatógeno, é preciso uma grande quantidade de isolados antagônicos (Abraham et al., 2010; Grzegorzczuk et al., 2017; Chen et al., 2018). Abraham et al. (2010) realizando uma triagem preliminar com 60 leveduras visando biocontrole de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc (1881), apenas dez reduziram os sintomas de bolor verde em laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck.), obtendo em torno de 50% de redução da área de infecção. Colaborando com nosso trabalho, que o número final de isolados com bom desempenho antagônico e bicontrolador pode ser considerado reduzido quando comparados à quantidade inicial utilizada.

Quanto maior a quantidade de características positivas antagônicas sobrepostas à um isolado de levedura, como: potencial produtivo de biofilme, fator *Killer*, antibiose e enzimas hidrolíticas, como visualizado neste trabalho, maior será a chance de sucesso

como agente biocontrolador. No entanto, vale ressaltar que tais características são válidas primordialmente, como métodos seletivos, nos testes *in vitro*, por exemplo (Droby et al., 2009).

Resultados diferentes foram observados por Chen et al., (2018), avaliando e selecionando leveduras antagonistas no controle biológico de *Botrytis cinerea* P. Micheli ex Haller (1768) em frutos de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), nenhuma das leveduras estudadas possuíam todos mecanismos antagônicos testados, algumas tinham capacidade de produzir biofilme, outras compostos inibidores difusíveis, algumas voláteis e outras enzimas hidrolíticas.

A capacidade de formação de biofilme, desempenhada por isolados de leveduras visualizadas no nosso trabalho, pode representar importante expressão no biocontrole, pois as leveduras que possuem capacidade de colonizar as superfícies dos frutos, folhas, multiplicarem-se e formarem biocamadas, conseguem proteger os tecidos vegetais, possíveis portas de entradas de infecção patogênica, evitando o contato direto do patógeno com o hospedeiro (Spadaro e Droby, 2016; Bassam et al., 2009), por esse motivo essa ação é tão importante no que tange o manejo de *Fusarium* spp. em abacaxizeiro, e em outras culturas que possam a ser testadas.

A relação dos isolados de leveduras que formaram biofilme e a capacidade de reduzir o crescimento filamentoso de *F. sororula* – CFS212 em testes de antibiose, visualizadas nesse estudo, são frequentemente correlacionadas em outros testes antagônicos usando leveduras, segundo Ianiri et al. (2013). Esses efeitos cumulativos e expressados, são colaborados com os estudos Chen et al. (2018), os quais verificaram que as leveduras *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (1918) e *Wickerhamomyces anomalus* (E.C. Hansen) Kurtzman, Robenett & Basehoar-Powers (2008), apresentaram

atividade formadora de micro colônias e comprometiam o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*.

A secreção de substâncias antimicrobianas, nocivas a micro-organismos sensíveis, expressadas nesse trabalho, através da expressão de toxinas *Killer*, desempenhadas por isolados de leveduras epifíticas do abacaxizeiro, representa um diferencial no processo antagônico sobre vários fitopatógenos (Spadaro e Samir, 2015), entretanto, é bom salientar que não são todas as espécies e/ou isolados de leveduras capazes de expressar tal mecanismo, como observado no controle de *Botryoshaeria dothidea* (Moug. Ex Fr.) Ces. & De Not. (1863), utilizando seis isolados de leveduras, na qual nenhuma foi efetiva na produção de substâncias tipo *Killer* (Terão et al., 2017)

Conforme já mencionado, a soma de diferentes mecanismos antagônicos em um micro-organismo pode caracterizá-lo como um biocontrolador eficaz, sendo capaz de interferir negativamente sobre os fitopatógenos. No entanto, a elucidação dos mecanismos antagônicos nem sempre é simples, e a escolha de avaliação desses mecanismos torna-se crucial.

As enzimas podem agir direta e indiretamente no controle de fungos fitopatogênicos, assim como observado na levedura *A. pullulans*, que desempenhou efetividade na atividade antagônica e liberação de enzimas extracelulares como glucanases, quitinases e proteases (Zhang et al., 2010).

Todas as enzimas, aqui estudadas, são largamente utilizadas para fins industriais, como para a produção de álcoois, aldeídos, cetonas e sulfetos (Duffy et al., 2003), na amilase através do processo fermentativo, produzindo álcoois, e já para as esterases os sulfetos, entretanto, essas substâncias podem auxiliar os mecanismos de antagonismo aos fitopatógenos. As surfactinas, presentes em esterases, podem ter ação tensoativas, ou seja, surfactantes, partindo do princípio de que alguns fungicidas possuem esse componente,

ajudando na eficácia do produto químico, como se supõe que também no controle biológico, para a fixação das células leveduriformes as superfícies foliares, frutos etc.

Levanta-se a hipótese que as surfactinas, presentes na enzima esterases, está associada ao processo de biofilme, ajudando no processo tensoativos das células leveduriformes compilando para o processo biocontrolador, como observada em estudos com a bactéria *P. syringae*, na verificação da presença de surfactinas associadas à formação do biofilme (Bais et al., 2004).

A presença de algumas classes de microrganismos facilita a nutrição vegetal secretando enzimas como fosfatases, que atuam na solubilização de fosfatos inorgânicos a orgânicos e conseqüentemente, na disponibilidade do nutriente à planta (Sharma et al., 2013). As fosfatases podem desencadear o efeito da indução de resistência a patógenos, através do efeito “priming”, elicitando defesas rápidas no sistema vegetal (Walters et al., 2013). Já no caso da celulase, alguns patógenos conseguem assimilar essa enzima prontamente disponível, atrasando o processo patogênico (Saravanakumar et al., 2018).

Assim, a avaliação das atividades enzimáticas pode representar significativo papel na caracterização antagônica (Pretscher et al., 2018; Lanchance, 2016), além de ser largamente estudada acerca da supressão biológica da infecção dos patógenos vegetais (Banani et al., 2014; Zhang et al., 2012; Stoykov et al., 2015).

O fato de todos os isolados selecionados no presente trabalho, por seus melhores desempenhos antagônicos, serem classificados como sendo a espécie *Meyerozyma caribbica*, compilamos a importância em outros eventos de biocontrole (Aguirre et al., 2018; Rosales et al., 2013; Yallappa, 2015) e, inclusive a formulações como agente antagônico a doenças pós-colheita (Guitrón et al., 2018).

Nesse trabalho, *M. caribbica* apresentou-se como antagonista eficaz a *F. sororula* e *F. oxysporum*, em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola, de tal forma que

essa efetividade foi equivalente a do fungicida químico (Cercobin®). Um agente antagonico que consegue inibir duas espécies causadoras de uma mesma doença é um efeito desejável, sabendo-se que, o manejo químico da doença é voltado apenas para uma única espécie *F. subglutinans* (AGROFIT, 2016).

A modulação do ambiente exercido pelas leveduras pode ser um mecanismo de competição, no caso da redução da acidez total dos frutos de abacaxi tratados com *M. caribbica* para o patógeno *F. sororula* – CFS212, possivelmente originado devido a levedura está em um ambiente rico em carboidratos, reduzindo o processo respiratório, tornando os nutrientes indisponíveis e/ou desfavoráveis para o processo infeccioso da doença. Colaborando com nossos resultados, Rosales et al. (2013) em avaliação de *M. caribbica* em frutas de manga comprovaram a capacidade desta levedura de competir por nutrientes com o patógeno *C. gloeosporioides* de maneira eficiente.

Sobre o processo natural de estabilidade do teor de sólidos solúveis totais - SST (°Brix), em frutos, visualizamos que os abacaxis tratados com *M. caribbica* não influenciou o processo de variação acelerada da transpiração, regulando a sucosidade dos frutos durante os 12 dias de armazenamento. Essa estabilização está diretamente relacionada com a manutenção das características físicas-químicas e o prolongamento do tempo de conservação dos frutos, segundo Zhang et al. (2015).

As alterações morfológicas nas hifas dos *Fusarium* spp. induzidas provavelmente presença da levedura *M. caribbica* no micoparasitismo presumi a atuação sinérgica da inibição do patógeno, incluindo o hiperparasitismo e a competição por espaço. Segundo Korres et al. (2013) avaliando a interação física de *K. apis* a *F. guttiforme* também observou anormalidades na hifa do patógeno, como: adesão das células formando um possível biofilme, com hifas largas e a presença de vaculose, comprometendo em nível celular, como também a performance do patógeno.

As leveduras são boas candidatas ao controle biológico (Korres et al., 2013). Os resultados assinalados no presente estudo representam os primeiros relatos de *M. caribbica*, presente naturalmente na microbiota de abacaxizeiro, bem como seu sucesso na inibição da infecção dos patógenos *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213, pertencentes aos grupos FFSC e FOFC, respectivamente, por meio de potenciais antagonismos *in vitro* e biocontrolador *in vivo*. Além disso, o conjunto de informações compiladas neste estudo possibilitam entendermos um pouco mais sobre os muitos mecanismos desempenhados por *M. caribbica*, incluindo a ação da toxina *Killer*, antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas, indução de resistência, formação de biofilme e competição por nutrientes e espaço.

Esses resultados preliminares abordam informações relevantes à comunidade científica, assinalando a espécie *M. caribbica* como um agente potencialmente aplicável no manejo da fusariose do abacaxizeiro e oportunizam pesquisas futuras direcionadas a elucidação de compostos de interesse biotecnológico, efeitos e associações com produtos químicos e com formulações efetivas.

5. Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil), pela concessão de bolsa de estudo. Os autores agradecem ao Laboratório de Fungos de Solo da Universidade Federal Rural do Pernambuco – LAFSOL e o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba – LAFIT, pelo auxílio durante as coletas de campo, ao desenvolver de experimentos e disponibilização de estrutura física.

6. Referências

- Abraham, AO, Laing, MD, & Bower, JP. (2010). Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. *Biological control*, 53(1): 32-38.
- Adolfo, LUTZ. (1985) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 1 (3), São Paulo: Grupo Binagri.
- AGROFIT. (2016). Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários — Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Brasil.
- Aguirre-Güitrón, L, Calderón-Santoyo, M, Ortiz-Basurto, RI, Bautista-Rosales, PU, & Ragazzo-Sánchez, JA. (2018). Optimisation of the spray drying process of formulating the post-harvest biocontrol agent *Meyerozyma caribbica*. *Biocontrol Science and Technology*, 1-17.
- Aquije, GMFV, Zorzal, PB, Buss, DS, Ventura, JA, & Fernandes, AAR. (2010). Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant Cell Reports*, 29: 1109–1117.
- Assis, S, M, Mariano, R, L, Michereff, S, J, Silva, G, Maranhão, E, A, 1999). Antagonism of yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. *Revista de Microbiologia*, 30:191-195.
- Bais, HP, Fall, R, & Vivanco, JM. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134(1): 307-319.
- Bajaj, BK, Raina, S, & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of basic microbiology*, 53: 645-656.

- Banani, H, Spadaro, D, Zhang, D, Matic, S, Garibaldi, A, & Gullino, ML. (2014). Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *International journal of food microbiology*, 182: 1-8.
- Bassam, AA, Fratamico, PM, & Smith, JL. (2009). Scientific status summary: quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of food science*, 74(1): R24-R37.
- Bautista-Rosales, PU, Calderon-Santoyo, M, Servin-Villegas, R, Ochoa-Alvares, NA, & Ragazzo-Sánchez, JA. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological control*, 65: 293-301.
- Castellani, A. (1963) The" water cultivation" of pathogenic fungi. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 283-284.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48: 489-499.
- Chen, PH, Chen, RY, Chou, JY. (2018). Screening and Evaluation of Yeast Antagonists for Biological Control of *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruits. *Mycobiology*, 46(1): 33-46.
- Conn, Hj, Bartholomew, Jw, & Jennison, Mw. (1957). Staining methods in" *Manual of Microbiological Methods*". NK, USA: Society of American Bacteriologists.
- Damaso, M, C, T, Terzi, S, D, C, Farias, A, X, Oliveira, A, C, P, D, Fraga, M, E, & Couri, S. (2012). Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55: 513-520.

- Droby, S, Hofstein, R, Wilson, CL, Wisewski, M, Fridlender, B, Cohen, L, Weiss, B, Daus, A, Timar, D, & Chalutz, E. (1993). Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agente for postharvest diseases of citrus fruit. *Bio Control*, 3: 47-52.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). Production of Pineapple - banco de dados agregados. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acessado em: 29 jul. 2018.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). Anuário estatístico da 'FAOstat' de produção agrícola. <http://www.fao.org/home/en/>. Acessado 13 outubro 2018.
- Ghosh, S, A, Droby, S, & Korine, C. (2014). Seasonal and plant-dependent variations in diversity, abundance and stress tolerance of epiphytic yeasts in desert habitats. *Environmental microbiology reports*, 6: 373-382.
- Godoy, L, & Ganga, A. (2017). Use of yeast as a method of biological control. *Applied Food Science Journal*, 1: 1.
- Gomes, E, Pinto, K, Souza, A, Souza, E, Leite, R, Nascimento, L, & Mendonça, R. (2009). Incidência de fusariose em frutos de abacaxi 'Gold'. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, 6(3): 1-5.
- Grzegorzcyk, M, Żarowska, B, Restuccia, C, & Cirvilleri, G. (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food microbiology*, 61: 93-101.
- Gu, H, Zhan, RL, Zhang, LB, Gong, DQ, & Jia, ZW. (2015). First report of *Fusarium ananatum* causing pineapple fruitlet core rot in China. *Plant Disease*, 99(11): 1653-1653.

- Güitrón, L, A, Calderón-Santoyo, M, Ortiz-Basurto, R, I, Bautista-Rosales, P, U, & Ragazzo-Sánchez, J, A. (2018). Optimisation of the spray drying process of formulating the post-harvest biocontrol agent *Meyerozyma caribbica*. *Biocontrol science and technology*, 28: 574-590.
- Hankin, L, Zucker, M, & Sands, DC. (1971). Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied Microbiology*, 22: 205–209.
- Hilber-Bodmer, M, Schmid, M, & Freimoser, F. M. (2017). Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. *BMC microbiology*, 17: 1-4.
- Ianiri, G, Idnurm, A, Wright, SA, Durán-Patrón, R, Mannina, L, Ferracane, R, & Castoria, R. (2013) Searching for genes responsible for patulin degradation in a biocontrol yeast provides insights into the basis for resistance to this mycotoxin. *Applied and environmental microbiology*, AEM: 03851-12.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2018). Sistema IBGE de Produção Agrícola.
ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201501.pdf. Acessado 12 outubro 2018.
- Jacobs, A, Van Wyk, PS, Marasas, WF, Wingfield, BD, Wingfield, MJ, & Coutinho, TA. (2010) *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal Biology*, 114(7): 515-527.
- Korres, AMN, Buss, DS, & Fernandes, PMB. (2011). *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. *Fungal biology*, 12: 1251-1258.
- Korres, N, O'Kiely, P, Benzie, J, A, & West, J, S. (Eds.). (2013). *Bioenergy production by anaerobic digestion: using agricultural biomass and organic wastes*. Routledge.

- Lachance, M.A. (2016). Metschnikowia: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast*, 11: 563-574.
- Lewis, KJ. (1988) Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler. Tese (PhD Thesis), University of Sheffield, Sheffield.
- Li, R, Zhang, H, Liu, W, & Zheng, X. (2011). Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodoturula mucilaginoso* and possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 151–156.
- Liu, X, Fang, W, Liu, L, Yu, T, Lou, B, & Zheng, X. (2010). Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 30–35.
- Lodder, J & Kreger-Van, RIJ (1952). The yeasts-a taxonomic study. *The yeasts-a taxonomic study*, 31: 36-50.
- Matić, S, Spadaro, D, Garibaldi, A, & Gullino, ML. (2014). Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. *Biological control*, 73: 59-67.
- Matos, AP, & Cabral, JRS. (2005 julho). Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro. *Embrapa – CNPMF*. Obtido de. <http://www.cnpmf.embrapa.br>.
- Matroudi, S, & Zamani, MR. (2009). Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. *Egyptian Journal of Biology*, 11: 1.
- Murray, M, G, & Thompson, W, F, (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8: 4321-4326.
- Naves, P, Del Prado, G, Huelves, L, Gracia, M, Ruiz, V, Blanco, J & Soriano, F. (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of applied microbiology*, 105: 585-590.

- Nogueira, SR, Lima, FS, Rocha, EM, & Araújo, DH. (2014). Fungicidas in fusariosis pineapple control in the estate of Tocantins, Brazil. *Revista de Ciências Agrárias*, 4, 447–455.
- Oliveira, MDM, Nascimento, LC, & Leite, RP. (2011). Incidência de fusariose e avaliação de métodos de inoculação de *Fusarium gutiforme* em folhas de abacaxizeiro. *Revista Caatinga*, 24: 1.
- Paiva, E, Serradilla, MJ, Ruiz-Moyano, S, Córdoba, MG, Villalobos, MC, Casquete, R, & Hernández, A. (2017) Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. *International journal of food microbiology*, 241: 276-282.
- Perez, MF, Contreras, L, Garnica, NM, Fernandez-Zenoff, MV, Farias, ME, Sepulveda, M, & Dib, JR. (2016). Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PloS one*, 11: e0165590.
- Pretscher, J, Fischkal, T, Branscheidt, S, Jäger, L, Kahl, S, Schlander, M, & Claus, H. (2018). Yeasts from Different Habitats and Their Potential as Biocontrol Agents. *Fermentation*, 4(2): 31.
- Rosales, PUB, Santoyo, MC, Villegas, RS, Álvarez, NAO, & Sánchez, JAR. (2013) Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological control*, 65(3): 293-301.
- Santos, BA, Laércio, V, & Vale, FXR. (2002). Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl em abacaxizeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 1: 101-103.
- Saravanakumar, K, Dou, K, Lu, Z, Wang, X, Li, Y, & Chen, J. (2018). Enhanced biocontrol activity of cellulase from *Trichoderma harzianum* against *Fusarium*

- graminearum* through activation of defense-related genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103: 130-136.
- Sela, I, Ashkenazy, H, Katoh, K, & Pupko, T. (2015). GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research*, 43: W7-W14.
- Sharma, SCD, Shovon, MS, Jahan, MS, Asaduzzaman, AKM, Rahman, MA, Biswas, KK & Roy, N. (2013). Antibacterial and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus*-SCS2012 isolated from soil. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(4): 2293.
- Shin, JH, Kee, SJ, Shin, MG, Kim, SH, Shin, DH, Lee, SK, & Ryang, DW. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1244-1248.
- Sierra, G. (1957). Studies on bacterial esterases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23: 241-265.
- Smibert, RM, & Krieg, NR. (1981) General characterization. In: Gerhart, P. Manual of Methods of General Bacteriology. *American Society of Microbiology*. 30: 409-443.
- Souza, C, R, S, de Oliveira Barbosa, A, C, Ferreira, C, F, Souza, F, V, D, de Souza Rocha, L, de Souza, E, H, & de Oliveira, S, A, S. (2019). Diversity of microorganisms associated to *Ananas* spp. from natural environment, cultivated and ex situ conservation areas. *Scientia Horticulturae*, 243: 544-551.
- Souza, WCO, Nascimento, LC, Oliveira, MD, Porcino, MM, & Silva, HA. (2018). Genetic diversity of *Fusarium* spp. in pineapple 'Pérola' cultivar. *European Journal of Plant Pathology*, 150: 853-868.

- Spadaro, D, & Droby, S. (2016) Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47: 39-49.
- Spadaro, D, & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47: 39-49.
- Spadaro, D, Ciavarella, a., Zhang, D, Garibaldi, A, & Gullino, M, L, (2010) Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal of Microbiology*, 56, 128-137.
- Stepien, L, Koczyk, G, & Waskiewicz, A. (2013). Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. *Journal of applied genetics*, 54(3): 367-380.
- Stoykov, YM, Pavlov, AI, & Krastanov, AI. (2015). Chitinase biotechnology: production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences*, 15(1): 30-38.
- Tamura, K, Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28: 2731-2739.
- Taylor, JB. (1974). Biochemical tests for identification of mycelial cultures of basidiomycetes. *Annals of Applied Biology*, 78(2): 113-123.
- Terao, D, Nechet, KL, & Vieira, BAH. (2017). Competitive and colony layer formation ability as key mechanisms by yeasts for the control *Botryosphaeria dothidea* fruit rot of mango. *Tropical Plant Pathology*, 42(6): 451-457.
- Tuite, J. (1969). *Plant pathological methods*. Fungi and bacteria.

- Vero, S, Garmendia, G, González, MB, Bentancur, O, & Wisniewski, M, Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus× domestica*). *FEMS yeast research*, 13(2): 189-199.
- Verzignassi, JR, Santos, MDF, Matos, APD, Benchimol, RL, Poltronieri, LS. Fusariose do abacaxizeiro no Pará. (2009). *Summa Phytopathologica*, 35(4): 329–330.
- Walters, DR, Ratsep, J, & Havis, ND. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of experimental botany*, 64(5): 1263-1280.
- Woods, DR, & Bevan, EA. (1968). Studies on the nature of the *killer* factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 51: 115-126.
- Yallappa, M. (2015). Functional Diversity of Yeasts in Plantation and Fruit Crops of Hassan District. Doctoral dissertation, University of Agricultural Sciences Gkvc, Bengaluru.
- Zhang, D, Spadaro, D, Garibaldi, A, & Gullino, ML. (2010). Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*, 54(3): 172-180.
- Zhang, X, Lin, L, Chen, M, Zhu, Z, Yang, W, Chen, B, & An, Q. (2012). A nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain enhances phytoextraction of heavy metals by the hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *Journal of hazardous materials*, 229: 361-370.
- Zhang, Y, Zeng, L, Yang, J, Zheng, X, & Yu, T. (2015). 6-Benzylaminopurine inhibits growth of *Monilinia fructicola* and induces defense-related mechanism in peach fruit. *Food Chemistry*, 187: 210-217.

Tabela 1. Local de coleta, órgão e número de acessos de leveduras isoladas do abacaxizeiro cv. Pérola, Recife-PE.

Acessos de Leveduras	Local de Coleta	Orgãos de Isolamento
L1 à L20	Camaragibe - PE	Frutos
L21 à L50	Areia - PB	
L51 à L73	Camaragibe - PE	Folhas
L74 à L100	Areia - PB	

Tabela 2. Período de incubação e agressividade de *Fusarium sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 em folhas destacadas de abacaxizeiro – cv. Pérola, após 11 dias de avaliação.

Acesso	Complexo	Origem	PI ^y	AACPD ^z
CA ^k	---	---	---	00,0 a
CFS212	FFSC ^x	Pombos - PE	4	98,6 c
CFS213	FOSC ^x	Mari - PB	4	67,6 b
MG	---	---	---	67,58
CV%	---	---	---	30,06

^yPI: Período de Incubação (dias): determinado pelo intervalo de tempo entre a inoculação e o surgimento dos primeiros sintomas;

^kCA: Controle Absoluto: folhas inoculadas com um disco de BDA (5mm) sem estruturas fúngicas;

^zAACPD: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (mm²): valores médios ± valores de desvio médio;

^xFFSC: Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi*; e FOSC: Complexo de Espécies *Fusarium oxysporum*.

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (p≤0,01) pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

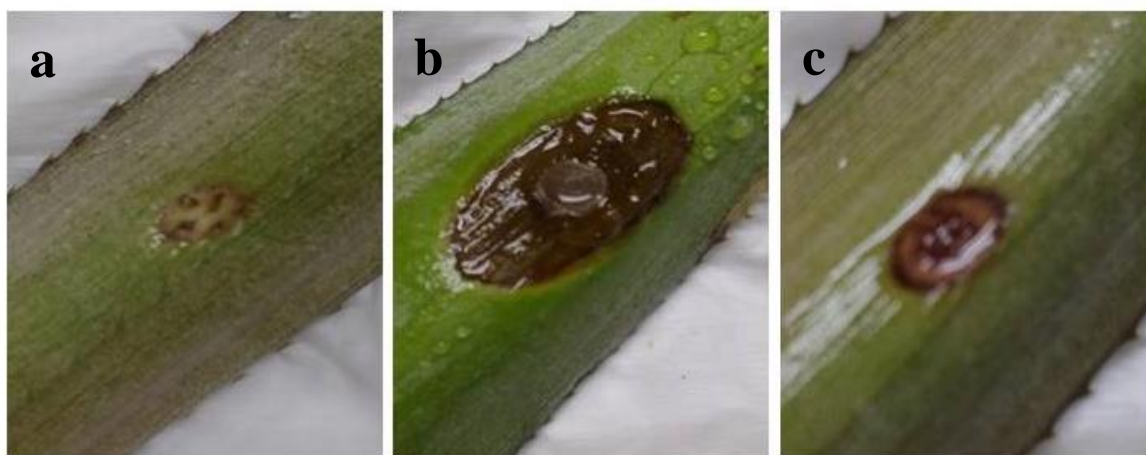


Figura 1. Podridão em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. Pérola: sintomas observados 11 dias após a inoculação de *Fusarium* spp.: controle absoluto (a), folhas inoculadas com um disco de BDA, sem a presença de estruturas fúngicas; *Fusarium sororula* - CFS212 (b); e *F. oxysporum* - CFS213 (c).

Tabela 3. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas destacadas de abacaxizeiro da cv. Pérola, inoculadas com *Fusarium sororula* – CFS212 e tratadas com leveduras, prospecção de agentes biocontroladores.

TRAT ^y	AACPD ^z	TRAT ^y	AACPD ^z	TRAT ^y	AACPD ^z	TRAT ^y	AACPD ^z
CA^k	40,00 a	L25	40,03 a	L51	96,39 d	L76	59,99 b
CP^x	78,45 c	L26	69,50 c	L52	48,54 a	L77	42,24 a
L1	56,58 b	L27	44,73 a	L53	55,76 b	L78	49,57 a
L2	85,84 d	L28	64,33 b	L54	62,83 b	L79	46,87 a
L3	86,18 d	L29	48,85 a	L55	56,07 b	L80	44,65 a
L4	67,49 b	L30	43,06 a	L56	42,65 a	L81	61,41 b
L5	80,27 c	L31	57,45 b	L57	78,51 c	L82	43,53 a
L6	66,49 b	L32	78,11 c	L58	72,88 c	L83	50,87 a
L7	40,00 a	L33	42,24 a	L59	66,49 b	L84	40,51 a
L8	65,40 b	L34	40,00 a	L60	80,24 c	L85	40,00 a
L9	74,79 c	L35	64,63 b	L61	79,91 c	L86	50,21 a
L10	86,50 d	L36	96,87 d	L62	79,91 c	L87	47,47 a
L11	68,24 c	L37	71,85 c	L63	43,12 a	L88	45,84 a
L12	70,47 c	L38	57,53 b	L64	109,5 d	L89	62,15 b
L13	69,96 c	L39	101,1 d	L65	92,00 d	L90	48,22 a
L14	71,78 c	L40	95,74 d	L66	58,63 b	L91	64,70 b
L15	58,82 b	L41	89,85 d	L67	43,63 a	L92	57,93 b
L16	53,62 a	L42	94,85 d	L68	62,59 b	L93	60,17 b
L17	68,88 c	L43	106,3 d	L69	71,78 c	L94	40,76 a
L18	56,46 b	L44	94,12 d	L70	57,63 b	L95	47,07 a
L19	62,59 b	L45	63,72 b	L71	59,99 b	L96	77,27 c
L20	70,41 c	L46	40,00 a	L72	70,93 c	L97	63,27 b
L21	55,13 a	L47	63,52 b	L73	53,62 a	L98	61,79 b
L22	49,55 a	L48	64,55 b	L74	61,46 b	L99	57,91 b
L23	64,63 b	L49	89,85 d	L75	43,38 a	L100	68,84 c
L24	51,78 a	L50	62,26 b				
MG							63,96
CV%							19,70

^yTRAT: tratamentos;

^zAACPD: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (mm²): valores médios ± valores de desvio médio;

^kCA: Controle absoluto;

^xCP: Controle apenas com o patógeno;

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (p≤0,01) pelo teste de Scoot-Knott a 5% de probabilidade; Valores médios, em negrito, representam menores valores de AACPD.

Tabela 4. Expressão¹ da produção de biofilme, do fator *Killer* de leveduras isoladas do abacaxizeiro e sua ação antibiótica à *Fusarium sororula*, *in vitro*.

Tratamentos	PB ^z	FK ^y	ANT ^x	Tratamentos	PB ^z	FK ^y	ANT ^x
CA ^k	-	-	-	L73	-	+	-
L7	+	+	+	L75	-	+	-
L16	-	+	-	L77	-	+	+
L21	-	+	-	L78	-	+	-
L22	-	+	-	L79	-	-	-
L24	+	+	-	L80	-	+	-
L25	-	+	-	L82	-	+	-
L27	-	+	-	L83	-	+	-
L29	-	+	-	L84	-	+	-
L30	+	+	+	L85	-	+	-
L33	-	-	-	L86	-	+	-
L34	-	+	-	L87	-	+	-
L46	-	+	+	L88	-	+	-
L52	-	+	-	L90	-	+	-
L56	+	+	+	L94	-	+	-
L63	+	+	+	L95	-	+	-
L67	-	+	-				

^kCA: Controle absoluto;

^zPB: Produção de Biofilme;

^yFK: Fator *Killer*;

^xANT: Ação Antibiótica à *Fusarium sororula*;

¹Fenótipo positivo, caracterizado pela formação de halo inibidor para ANT e FK e coloração das células leveduriformes, para PB (+); Fenótipo negativo, sem produção de halo e/ou presença de coloração (-); leveduras em destaque, negrito, representam expressão de pelo menos dois mecanismos antagônicos.

Tabela 5. Produção enzimática de leveduras isoladas do abacaxizeiro, em meios sólidos, Recife- PE.

Trat ^z	Enzimas*							Trat ^z	Enzimas*						
	Pr	Es	Fo	Ce	Am	Pe	Li		Pr	Es	Fo	Ce	Am	Pe	Li
CA ^x	-	-	-	-	-	-	-	L73	-	-	-	-	-	-	-
L7	+	+	+	+	+	-	-	L75	-	-	-	-	-	-	-
L16	-	-	-	-	-	-	-	L77	-	-	-	-	-	-	-
L21	-	+	+	-	-	-	-	L78	-	-	-	-	-	-	-
L22	-	+	+	-	-	-	-	L79	-	+	-	-	+	-	-
L24	+	+	+	+	+	-	-	L80	-	-	-	-	-	-	-
L25	-	+	+	-	-	-	-	L82	-	-	-	-	-	-	-
L27	-	+	+	-	-	-	-	L83	-	-	-	-	-	-	-
L29	-	+	-	-	-	-	-	L84	-	+	+	-	-	-	-
L30	+	+	+	+	+	-	-	L85	-	+	+	-	-	-	-
L33	-	+	+	-	-	-	-	L86	-	-	-	-	-	-	-
L34	-	-	-	-	-	-	-	L87	-	-	-	-	-	-	-
L46	-	-	-	-	-	-	-	L88	-	-	-	-	-	-	-
L52	-	+	+	-	-	-	-	L90	-	+	+	-	-	-	-
L56	+	+	+	+	+	-	-	L94	-	+	+	-	-	-	-
L63	+	+	+	+	+	-	-	L95	-	+	-	-	-	-	-
L67	-	-	-	-	-	-	-								

^zTrat: Tratamentos;

^xCA: Controle Absoluto;

*Enzimas: (Pr) protease; (Es) esterase; (Fo) fosfatase; (Ce) celulase; (Am) amilase; (Pe) pectinase; (Li) lipase;

¹Fenótipo positivo, caracterizado pela formação de halo inibidor (+); Fenótipo negativo, sem produção de halo (-); leveduras em destaque, negrito, representam isolados de maior expressão enzimática.

Tabela 6. Reação¹ de *Fusarium sororula* - CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 em frutos e mudas micropropagadas de abacaxi (*Ananas Comosus*) da cv. Pérola, previamente tratados com a levedura *Meyerozyma caribbica*, Recife – PE.

Orgão	Tratamentos*	<i>F. sororula</i>			<i>F. oxysporum</i>		
		TL ^y	°Brix ^x	AT ^z	TL ^y	°Brix ^x	AT ^z
Frutos	CA	00,0 a	8,65 ^{ns}	1,18 a	00,0 a	7,98 ^{ns}	1,18 ^{ns}
	CP	23,1 c	7,52 ^{ns}	1,32 b	21,8 c	9,32 ^{ns}	1,30 ^{ns}
	CQ	90,2 d	9,40 ^{ns}	1,50 c	14,3 b	9,32 ^{ns}	1,30 ^{ns}
	<i>M. caribbica</i>	16,7 b	9,54 ^{ns}	1,14 a	08,9 b	8,14 ^{ns}	1,30 ^{ns}
	MG	2,44	8,87	1,22	1,20	8,92	1,3
	CV%	25,0	27,8	17,9	9,3	18,27	22,94
Orgão	Tratamentos*	<i>F. sororula</i>		<i>F. oxysporum</i>			
		AACPD ^k	PL ^a	AACPD ^k	PL ^a		
Mudas	CA	00,0 a	00,0 a	00,0 a	00,0 a		
	CP	18,7 d	06,2 c	17,5 d	05,2 d		
	CQ	14,0 c	06,2 c	16,1 c	03,0 c		
	<i>M. caribbica</i>	07,9 b	03,0 b	11,5 b	02,5 b		
	MG	0,99	0,36	1,13	0,28		
	CV%	16,68	12,04	26,63	11,96		

*CA: controle absoluto, para inoculação a utilização de ADE; CP: controle com inoculação do patógeno, sem meios de tratamentos; e CQ: controle químico, ação do fungicida Cercobin 700 PM® - 70 g p. c. /100 l⁻¹ de água;

^yTL: tamanho da lesão, expressa em (mm²);

^xBRIX: sólidos solúveis totais - SST, expressa em (ml) de açúcares;

^zAT: ácidos totais, expressa em (ml) de ácido;

^kAACPD: área abaixo da curva de progresso da doença, expressa em (mm²): valores médios ± valores de desvio médio;

^aPL: profundidade de lesão, expressa em (mm²);

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si (p≤0,01) pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

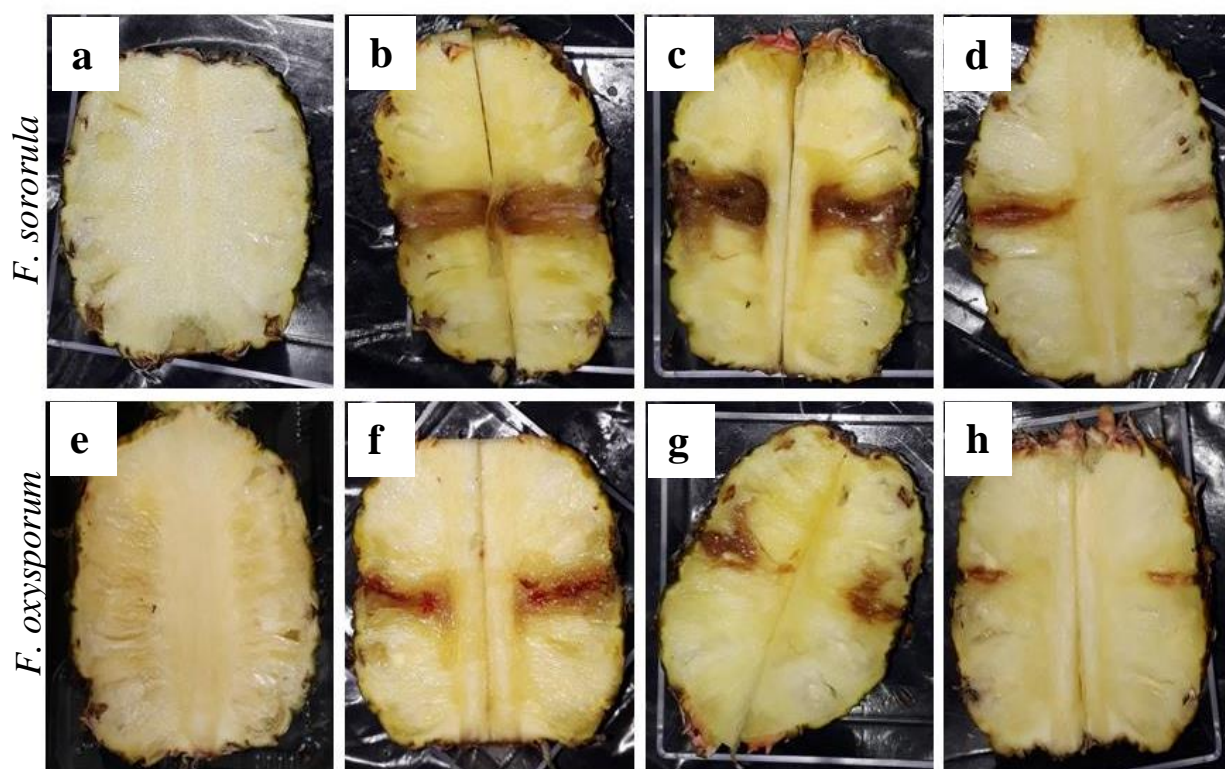


Figura 2. Frutos de abacaxi cv. Pérola tratados com *Meyerozyma caribbica* à *Fusarium* spp., após 12 dias de armazenamento. Frutos assintomáticos inoculados com fragmentos de meio de cultivo (a, e.); frutos sintomáticos inoculados com *F. sororula* – CFS212 (b.), e *F. oxysporum* – CFS213 (f.), sem tratamentos; CFS212 (c.) e CFS213 (g.) manejados com Cercobin®; CFS212 (d.) e CF213 (h) após controle com *M. caribbica*.

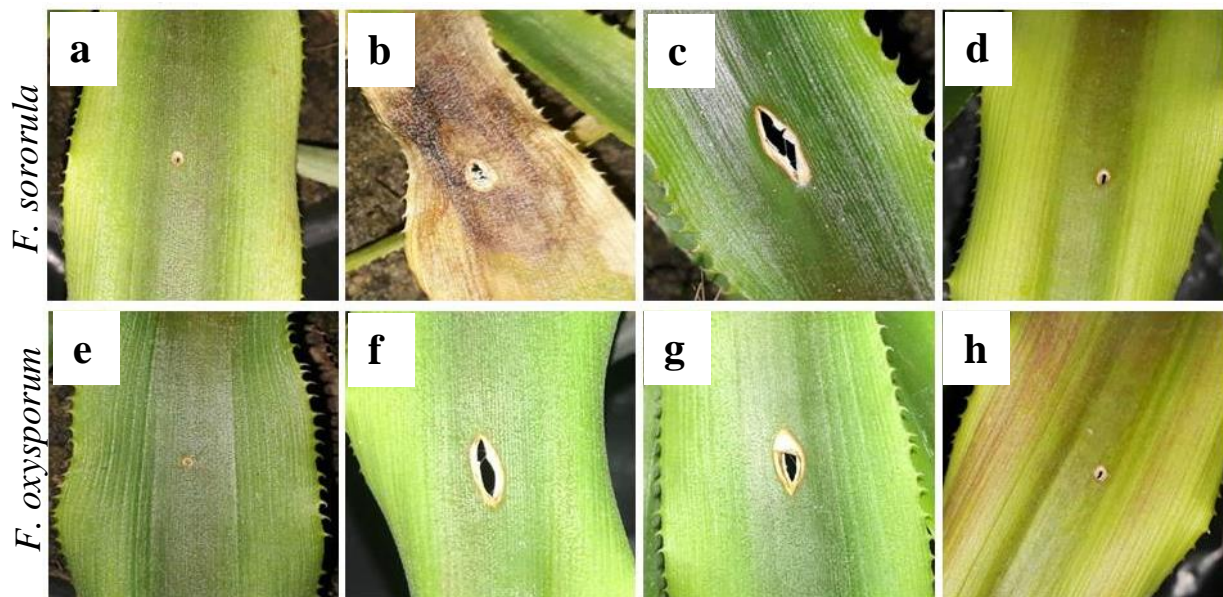


Figura 3. Mudas de abacaxizeiro cv. Pérola, tratadas com *M. carribica* à *F. sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213, após 60 dias de incubação em casa de vegetação. CFS212 (a, b, c, d.) e CFS213 (e, f, g, h.); folhas assintomáticas, inoculadas com meio de cultivo (a, e.); folhas sintomáticas, inoculadas com os patógenos, sem tratamentos (b, f.); folhas manejadas com Cercobin® (c, g.); folhas após controle com *M. caribbica*.

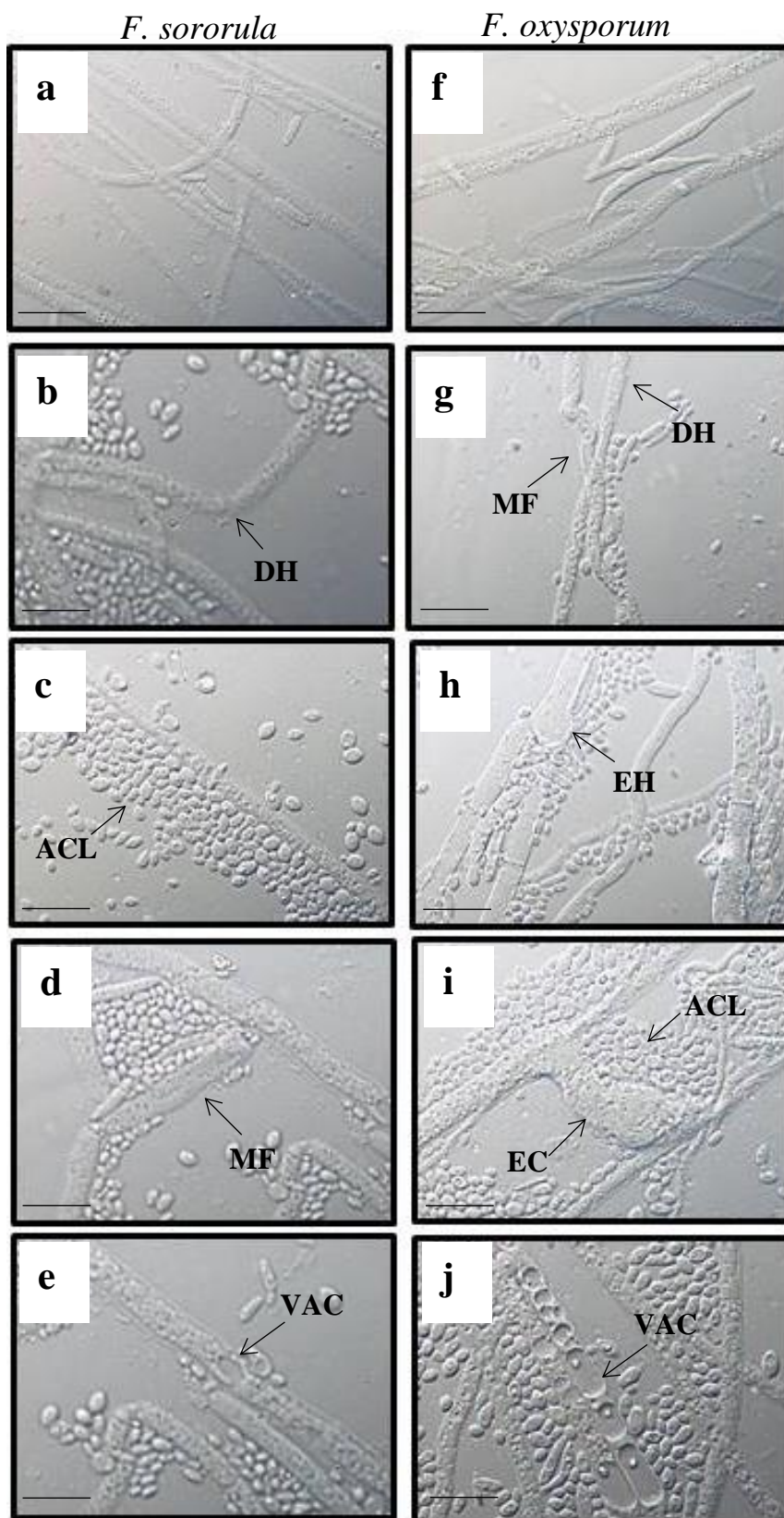


Figura 4. Interação da levedura *Meyerozyma caribbica* na superfície de hifas de *Fusarium sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213 em cultura. (a, b, c, d, e.) CFS212; (f, g, h, i, j.) CFS213; (a, f.) testemunhas, ausência da interação com a levedura; (MF) mal formação

das hifas; (ACL) aproximação das células leveduriformes nas hifas; (EH) edema hifal; (DH) degradação de paredes das hifas; (EC) extravasamento do conteúdo celular; e (VAC) vacuolose. Bar = 10 μm .

CAPÍTULO IV

Desempenho de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma asperelloides* no controle da fusariose do abacaxizeiro

Desempenho de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma asperelloides* no controle da fusariose do abacaxizeiro

Tarciana Silva dos Santos^{a*}, Iwanne Lima Coelho^a, Thais Regina Pintino de Almeida^a, Igor Alexander de Melo Pimentel^a, Wilza Carla Oliveira de Sousa^b, Luciana Cordeiro do Nascimento^c, Delson Laranjeira^{a*}

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil

^b Doutora em Agronomia, Rua Manoel da Gama Neto, nº 588, Jardim Amazonas, CEP: 56318-380, Petrolina-PE, Brasil

^c Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, Campus II, Centro, CEP: 58397-000, Areia-PB, Brasil

* Autores correspondentes. Endereço de E-mail: tarciana.agronomia@gmail.com (Tarciana Silva dos Santos) e delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira).

Destaques da pesquisa

-Atividade hiperparasitica de *Trichoderma* spp. a espécies de *Fusarium* spp.

-Bioproteção de *Trichoderma* spp. à patógenos fúngicos *F. sororula* e *F. oxysporum* do abacaxizeiro.

-*T. asperellum* e *T. asperelloides*, inibindo sintomas da murcha de fusário em mudas de abacaxizeiro.

Resumo

Entre os principais problemas fitossanitários que acometem a produtividade nos cultivos de abacaxizeiro, destacam-se a fusariose, considerada uma das principais doenças incidentes na cultura. Associados aos métodos tradicionais, medidas de biocontrole, baseadas no uso de micro-organismos antagonistas, podem contribuir efetivamente no manejo fitossanitário de doenças de plantas. A este respeito, objetivou-se avaliar o desempenho biocontrolador de *Trichoderma* spp. sobre agentes causais da fusariose do abacaxizeiro - *Fusarium sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213. Foram avaliados preliminarmente 36 isolados de *Trichoderma* spp. em testes de antagonismo *in vitro* contra o CFS212, avaliando-se inibição de crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento e a escala de notas quanto a ação antagonista. Foram selecionados cinco isolados antagonistas e avaliados quanto ao potencial biocontrolador de *Fusarium* spp. em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola, contra os isolados CFS212 e CFS213. Durante 60 dias as mudas foram observadas e aferidas os diâmetros das lesões, determinada através da área abaixo da curva de progresso da doença - AACPD e a profundidade da lesão, após corte de seccionamento das mudas na zona de crescimento da raiz. Todos isolados selecionados mostraram atividade antifúngica significativa *in-vivo* para os dois isolados patogênicos, no entanto sobre CFS212 a atividade inibidora foi mais elevada em relação aos testes com o CFS213. Os cinco isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma* foram identificados como *T. asperellum* (T021 e T173) e *T. asperelloides* (T158, T165 e T182). Foi avaliado também a interação micoparasítica dos antagonistas identificados contra os dois isolados patogênicos, *in vitro*, após 24 horas de incubação em meio BDA. No ensaio de micoparasitismo os antagonistas *T. asperellum* e *T. asperelloides* contra os patógenos de *Fusarium* spp., mostrou alterações morfológicas importantes, como enrolamento de suas hifas sobre as hifas dos fungos patogênicos e penetração direta, sendo visualizadas hifas secas seguidas de hifas com conteúdo citoplasmático. Conclui-se que *T. asperellum* e *T. asperelloides* mostram um bom desempenho na inibição a *F. sororula* e *F. oxysporum*, surgindo como novas alternativas para o uso desses micror-organismos independentes ou integrado a outros manejos à fusariose do abacaxizeiro.

Palavras chave: *Ananas comosus*, biocontrole, doenças de plantas; *Fusarium sororula*; *Fusarium oxysporum*; *Trichoderma* spp.

1. Introdução

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) é uma planta tropical, seus frutos são mundialmente apreciados pelos mais diversos tipos de consumidores, devido a diversos fatores, como suas características organolépticas, textura suculenta e alto valor nutricional (Liu et al., 2017). A Costa Rica e o Brasil lideram a produção mundial de abacaxi, que por sua vez, ocupa o terceiro lugar, entre as frutas tropicais consideradas mais importantes da região Equatorial, superado apenas pela manga e banana (FAO, 2016; FAO, 2015).

O potencial produtivo do abacaxizeiro é afetado por doenças fúngicas que incidem a cultura, destacando-se a fusariose, uma das doenças mais destrutivas durante a produção, pré-colheita e pós-colheita (Ploetz, 2003). Esta doença é ocasionada por várias espécies do gênero *Fusarium*: *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (1976); *F. guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (1988); *F. oxysporum* Schltdl. (1824); *F. solani* (Mart.) Sacc. (1881); *F. ananatum* e *F. funjikuroi* (Wineland) Kuhlman (1982) que incidem sobre o abacaxizeiro causando a murcha de fusário (Vilaplana et al., 2018; Jacobs et al., 2010; Ibrahim et al., 2015; Ibrahim et al., 2016).

A fusariose do abacaxizeiro pode incidir em folhas, caules, frutos e raízes com sintomas típicos de podridão, com coloração marrom a castanho escuro, lesões deprimidas e exsudação de goma (Ploetz, 2006), podendo causar perdas superiores a 80%, quando a incidência da doença coincide com o período da floração/frutificação associados a períodos propícios ao desenvolvimento do patógeno, como: alta umidade e intensificados quando acompanhado com o cultivo de variedades susceptíveis (Benfica et al., 2011).

O manejo da doença engloba a utilização de variedades resistentes, material propagativo livre do patógeno, controle de vetores e proteção das inflorescências com aplicação de fungicidas (Ploetz, 2006), sendo o último, na maioria das vezes, método único e mais utilizado como controle preventivo ao patógeno. No entanto, o uso intensificado desse método têm resultado na ocorrência de resistência de linhagens fúngicas, contaminação ambiental, riscos à saúde humano, como também impossibilitado a exportação mundial de frutos devido os altos níveis residuais, representando uma grande barreira ao crescimento econômico do país (PARA, 2015).

Métodos alternativos, livre de resíduos ou que minimizem o uso dos agrotóxicos têm ganhado destaque (Farzaneh et al., 2015). Os produtos biológicos, que têm potencial no controle de doenças de plantas, têm sido praticamente utilizados no campo e relatados com sucesso no meio científico, por exemplo, agentes antagônicos do gênero *Trichoderma*

(Naglot et al., 2015; Trivedi et al., 2016; Innocenti et al., 2015), como as espécies *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (1999) e *T. asperelloides* Samuels (2010) que são relatadas como importantes no controle de fitopatógenos, como: *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. (1880), *Pythium myriotylum* Drechsler (1930), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884) (Ghosh et al., 2018; Mbarga et al., 2012; Sumida et al., 2018).

Considerando que muitas espécies de *Trichoderma* são micoparasitas eficientes, devido a sua capacidade de interação e predação de hifas de patógenos que causam doenças em plantas, o objetivo do presente trabalho foi investigar o desempenho de *T. asperellum* e *T. asperelloides* no biocontrole de *F. sororula* e *F. oxysporum*, agentes causais da murcha de fusário em abacaxizeiro.

2. Materiais e Métodos

2.1. Isolados, manutenção e preservação

Dois isolados de *Fusarium* spp. foram cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Campus II, Areia-PB, isolados a partir de frutos de abacaxi com sintomas da doença, nos estados do Pernambuco e Paraíba, coordenadas (8°08'21.2"S 35°23'49.9"W; 7°25'56.1"S 34°54'42.3"W), respectivamente, e identificados molecularmente como *Fusarium sororula* – CFS212 e *F. oxysporum* – CFS213, como participantes do Complexo de Espécies *Fusarium fujikuroi* – FFSC, e do Complexo de Espécies *Fusarium oxysporum* – FOOSC, respectivamente (Souza et al., 2018).

Os 36 isolados do gênero *Trichoderma* foram cedidos e recuperados da Coleção de Fungos de Solo – CFS do Laboratório de Fungos de Solo – LAFSOL, na Universidade Federal Rural do Pernambuco - UFRPE, informações descritas na **Tabela 1**.

Todos os isolados foram mantidos, por cultivos periódicos em meio de cultivo batata dextrose ágar – BDA, incubados a uma temperatura de 25 ± 2 ° C. As colônias de aproximadamente quatro dias foram purificadas pela técnica de repique por ponta de hifa. e, a partir dessas colônias, discos de BDA de 5 mm de diâmetro, contendo estruturas fúngicas, foram fragmentados e depositados em tubos criogênicos com água destilada esterilizada – ADE (Castellani, 1963) para depósito e manutenção dos novos isolados no CFS/LAFSOL/UFRPE.

Tabela 1. Informações dos acessos dos isolados de *Trichoderma* spp. usados na pesquisa.

Acesso	Referência	Fonte de Inóculo	Origem
T013	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T014	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T015	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T016	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T017	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T019	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T020	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T021	LAFSOL	Feijoeiro	Fortaleza-CE
T022	LAFSOL	---	Recife - PE
T024	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T025	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T026	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T083	EMBRAPA	---	Petrolina-PE
T147	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T148	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T149	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T150	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T151	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T152	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T153	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T155	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T157	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T158	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T161	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T165	LAFSOL	Solo	Recife-PE
T169	LAFSOL	---	Recife-PE
T172	LAFSOL	---	Recife-PE
T173	LAFSOL	---	Recife-PE
T176	LAFSOL	---	Recife-PE
T177	LAFSOL	---	Recife-PE
T179	LAFSOL	---	Recife-PE
T180	LAFSOL	---	Recife-PE
T181	LAFSOL	---	Recife-PE
T182	LAFSOL	---	Recife-PE
T183	LAFSOL	---	Recife-PE
T186	LAFSOL	---	Recife-PE

2.2. Patogenicidade dos isolados

Um teste para comprovação de patogenicidade dos isolados foi realizado em folhas destacadas de abacaxizeiro, cv. Pérola. As folhas foram desinfestadas com NaOCl 1% por um minuto, lavadas duas vezes em ADE, secas em papel toalha e acondicionadas em caixas plásticas tipo gerbox, quatro folhas por recipiente. No centro de cada folha efetuou-

se um pequeno ferimento, com auxílio de uma agulha hipodérmica esterelizada, e sobre ele depositou-se um disco de BDA contendo estruturas fúngicas de *Fusarium* spp (*F. sororula* e *F. oxysporum*), separadamente.

2.3. Atividade antagonista *in vitro*

Os 36 isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados quanto ao seu desempenho antagonístico pelo método de pareamento de colônias *in-vitro*. Em placas de Petri, contendo o meio BDA, foram depositados paralelamente dois discos miceliais (5mm): um do isolado de *Trichoderma* e outro de *F. sororula*, ambos a aproximadamente 5 mm de distância em relação a borda da placa. No tratamento controle o isolado foi depositado, paralelamente, dois discos fúngicos do isolado fitopatogênico, totalizando 37 tratamentos, com quatro repetições cada.

As placas foram incubadas por sete dias a 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas e, a cada 48 horas, foram aferidos os raios de crescimento micelial do patógeno e do antagonista, com auxílio de um paquímetro digital. A partir dos valores aferidos foram calculados valores de porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC = [(diâmetro da testemunha – diâmetro do tratamento / diâmetro da testemunha) / 100] e o índice de velocidade de crescimento micelial – IVC = [(diâmetro final da colônia / número de dias de incubação) / 100].

Ao final do período de incubação das placas, o índice antagonístico entre os isolados foi avaliado qualitativamente através da escala de notas proposta por Bell et al. (1982), onde: o antagonista cresce por toda a placa de Petri (1); o antagonista cresce sobre 2/3 da placa (2); o antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa (3); o patógeno cresce sobre 2/3 da placa (4); o patógeno cresce por toda placa de Petri (5). Aplicando-se o cálculo percentual de McKinney (1923) adaptado, onde: $InANT = [\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100 / (\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}) - 100]$.

2.4. Desempenho antagonístico *in vivo*

Mudas micropropagadas da cv. Pérola, fornecidas pela empresa Clona-Gen® (Joinville-SC), com aproximadamente 12 cm de comprimento, foram aclimatadas em casa de vegetação em vasos com capacidade para três litros, contendo substrato previamente autoclavado, por pelo menos 60 dias, até que atingissem um tamanho de 30 cm, tamanho ideal para que fossem inoculadas. Durante a condução experimental, as mudas foram

irrigadas conforme sua necessidade hídrica e adubadas quinzenalmente com macro e micronutrientes Qualifol®, para seu amplo desenvolvimento.

Os isolados antagônicos de *Trichoderma* spp. selecionados foram cultivados em meio BDA, por sete dias a 28 ± 2 °C e a partir da raspagem superficial das colônias puras, preparou-se suspensões de esporos em ADE a 1×10^8 conídios mL⁻¹. Alíquotas da suspensão (2 mL) foram injetadas, com auxílio de uma agulha hipodérmica, em sacos plásticos contendo 200 g de arroz parbolizado autoclavado (121 °C; 40 min), posteriormente, os sacos com substrato inoculado foram vedados hermeticamente e mantidos em câmara de incubação, com agitação manual diária para homogeneização do substrato, por um período de dez dias sob temperatura de 28 ± 2 °C e alternância luminosa, 12 horas claro e 12 horas escuro (Santos et al., 2009).

O substrato colonizado foi depositado no solo, em um sulco em volta do caule da muda e, após 24 horas, os isolados patogênicos *F. sororula* e *F. oxysporum* foram inoculados na base de duas folhas D (dois pontos de inoculação) pelo método de picada com um palito de madeira contaminado (2,4 mm de diâmetro), por imersão em suspensão de 1×10^5 conídios mL⁻¹ (Oliveira et al., 2011) e as folhas mantidas em câmara úmida por 48 horas.

O experimento foi conduzido em Delineamento em Blocos Casualizados – DBC, com 16 repetições distribuídas em quatro blocos. Como controles comparativos, foram utilizadas mudas não inoculadas considerada como (**Controle negativo – CN;**) mudas inoculadas com os patógenos consideradas como (**Controle Positivo-CP;**) e mudas pulverizadas com Cercobim 700 PM® - 70 g. p. c. /100 L⁻¹ de água e posteriormente inoculadas com os patógenos (**Controle Químico – CQ**). Os fatores climáticos foram verificados periodicamente durante toda a condução do experimento, que compreendeu de abril a maio o período de adaptação das mudas, e de junho a agosto de 2018 a experimentação, obtendo média mensal de 28 °C de temperatura, 73% de umidade (**Figura 1**).

Para avaliação, foi observado a cada 15 dias o tamanho da lesão para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) através da soma das médias das lesões com o intervalo de avaliações e aos 90 dias após a inoculação as plantas foram seccionadas para verificação de profundidade da lesão na zona de crescimento da raiz (PL).

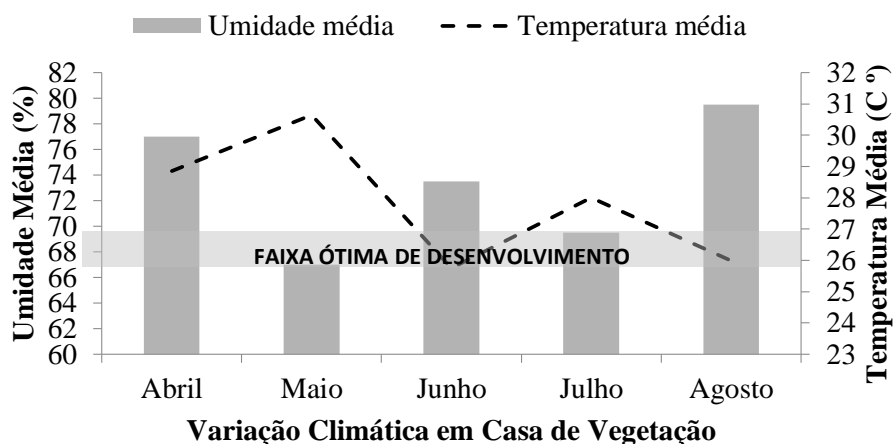


Figura 1. Dados médios mensais de temperatura ambiente, umidade relativa do ar no experimento em casa de vegetação (abril/agosto-2018), período de abril a maio (adaptação das mudas) e junho a agosto (experimentação).

2.5. Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

Para caracterização taxonômica dos isolados de *Trichoderma* spp., utilizou-se a amplificação e sequenciamento das regiões *tefl- α* e ITS, através dos oligonucleotídeos iniciadores EF1 (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') e EF2 (5' GGARGTA ACCAGTSATCATGTT 3') e ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') de acordo com Murray e Thompson (1980), sob as seguintes ciclagens e condições térmicas: 95 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1 min/30s e 72 °C por 5 min.

Os produtos da PCR foram corados com SYBRTM Gold (Thermo Scientific, Waltham, USA), visualizados em gel de agarose (1%), as amplificações bem sucedidas foram purificadas com PureLink® PCR Purification Kit (InvitrogenTM by life Technologies), seguido o protocolo fornecido pelo fabricante. O produto de sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar em aparelho ABI3730 (Myleus Facility, Belo Horizonte-MG, Brasil).

Os fragmentos sequenciados foram editados em contigs e as sequências obtidas comparadas com sequências de ex-tipo disponíveis no Genbank inseridas (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>), por análise de Máxima Verossimilhança – MV utilizando as ferramentas no portal CIPRES (<https://www.phylo.org>).

2.6. Interação micoparasítica antagonistas x patógenos

Microcultivos foram realizados com os patógenos *F. sororula* e *F. oxysporum* paralelamente aos isolados selecionados de *Trichoderma* spp., em placas de Petri contendo uma fina camada de meio BDA (5mm) com delimitação do local (área retangular de 24 x 32 mm) e os fragmentos fúngicos (patógeno x antagonista) depositados paralelamente a 5 mm da margem demarcada. As placas foram incubadas por 24 horas, a 28 °C sob 12 horas de alternância luminosa (claro/escuro). Como controle, o isolado patogênico foi cultivado pareado a si mesmo. Em todos os arranjos foram feitas quatro repetições.

Nas regiões onde as hifas de ambos os fungos se encontraram, foi adicionada uma alíquota do corante incolor Shears e uma lamínula sobreposta, a fim de observar as possíveis interações entre as hifas, sob um microscópico de contraste de fase (Nikon Eclipse E600), 20 µm.

2.7. Análise estatística

Os dados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram analisados separadamente utilizando o programa Sisvar 5.6. Todos os experimentos foram repetidos e as médias aritméticas foram calculadas e analisadas usando análise de variância unidirecional (ANOVA). Para as análises significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Scott Knott e Least Significance Difference - LSD de Fisher a 5 % de probabilidade, utilizando o software Sisvar v5.6 (Ferreira, 2011).

3. Resultados

3.1. Patogenicidade de isolados

A patogenicidade dos isolados de *F. sororula* e *F. oxysporum* foi comprovada após 10 dias de incubação, através da observação dos sintomas da doença em folhas, no local onde foi realizado o ferimento e a inoculação, apresentando lesões de consistência amolecida, bem delimitadas, e de coloração marrom escuro.

3.2. Atividade antagonista *in vitro*

Sobre o desempenho dos isolados de *Trichoderma* spp., avaliados contra *F. sororula*, os resultados indicaram que, dos 36 isolados, apenas dois não expressaram capacidade antagônica sobre a inibição micelial (PIC) do patógeno, quando comparados ao tratamento controle. Os demais desempenharam porcentagens de inibição que variavam

entre 11-18% (quatro isolados), 27-39% (16 isolados), 41-49% (12 isolados) e 64-68% (dois isolados). Para o índice de velocidade crescimento micelial (IVCM), apenas quatro isolados de *Trichoderma*, dos 36 avaliados em confronto com o *F. sororula in vitro*, obtiveram resultados não significativos, semelhantemente aos IVCM do tratamento controle (**Tabela 2**).

Tabela 2. Avaliação da atividade antagônica de espécies de *Trichoderma* contra isolados de *Fusarium sororula* – CFS212 *in vitro*.

Tratamentos	PIC ^a	IVCM ^b	InANT ^c	Tratamentos	PIC ^a	IVCM ^b	InANT ^c
CP*	0,01 e	0,02 c	20	T152	33,98 c	0,01 b	40
T013	30,01 c	0,02 c	40	T153	34,90 c	0,01 a	40
T014	31,23 c	0,01 b	40	T155	27,56 c	0,01 b	40
T015	15,34 d	0,01 b	40	T157	42,84 b	0,00 a	80
T016	28,48 c	0,00 a	40	T158	67,60 a	0,00 a	40
T017	26,65 c	0,00 a	40	T161	43,46 b	0,01 a	40
T019	37,65 c	0,01 b	40	T165	48,96 b	0,00 a	40
T020	33,07 c	0,00 a	40	T169	31,84 c	0,00 a	40
T021	63,93 a	0,00 a	80	T172	39,18 c	0,00 a	40
T022	16,56 d	0,00 a	40	T173	45,60 b	0,01 a	40
T024	2,93 e	0,02 c	60	T176	43,76 b	0,00 a	40
T025	31,54 c	0,00 a	40	T177	44,37 b	0,00 a	40
T026	5,86 e	0,01 b	60	T179	44,07 b	0,00 a	40
T083	17,17 d	0,01 b	40	T180	10,75 d	0,02 c	60
T147	36,12 c	0,00 a	40	T181	45,60 b	0,00 a	40
T148	35,51 c	0,00 a	40	T182	31,23 c	0,02 c	40
T149	35,51 c	0,00 a	40	T183	41,62 b	0,00 a	40
T150	42,85 b	0,00 a	40	T186	41,32 b	0,01 a	40
T151	40,71 b	0,01 a	40				
Média	33,83	0,01	-----	Média	33,83	0,01	-----
CV %	25,45	64,65	-----	CV %	25,45	64,65	-----

^a PIC: Inibição de Crescimento Micelial (mm²) = [(diâmetro da testemunha – diâmetro do tratamento / diâmetro da testemunha) / 100];

^b IVCM: Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (mm²) = [(diâmetro final da colônia / número de dias de incubação) / 100];

^c InANT: Índice Antagônico (%). Avaliado através de escala de notas de Bell et al., (1982), onde: o antagonista cresce por toda a placa de Petri (1); o antagonista cresce sobre 2/3 da placa (2); o antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa (3); o patógeno cresce sobre 2/3 da placa (4); o patógeno cresce por toda placa de Petri (5). Para cálculo percentual aplicou-se o índice Mckinney (1923) adaptado, onde: $[\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100 / (\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}) - 100]$.

*CP: Patógeno confrontado com ele mesmo em meio BDA.

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scoot Knott a 5% de probabilidade.

Com base no índice antagônico (InANT) observou-se que da totalidade dos isolados de *Trichoderma* avaliados contra o *F. sororula* (**Tabela 2**), 31 cresceram até a metade da placa de Petri, obtendo cerca de 40% de antagonismo, três isolados T024, T026

e T180 cresceram sobre 2/3 da placa, conseguindo 60% de antagonismo, e dois isolados T021 e T157 conseguiram se desenvolver por toda a placa, com melhores resultados, compreendendo cerca de 80% de antagonismo, notoriamente observado na **Figura 1**.

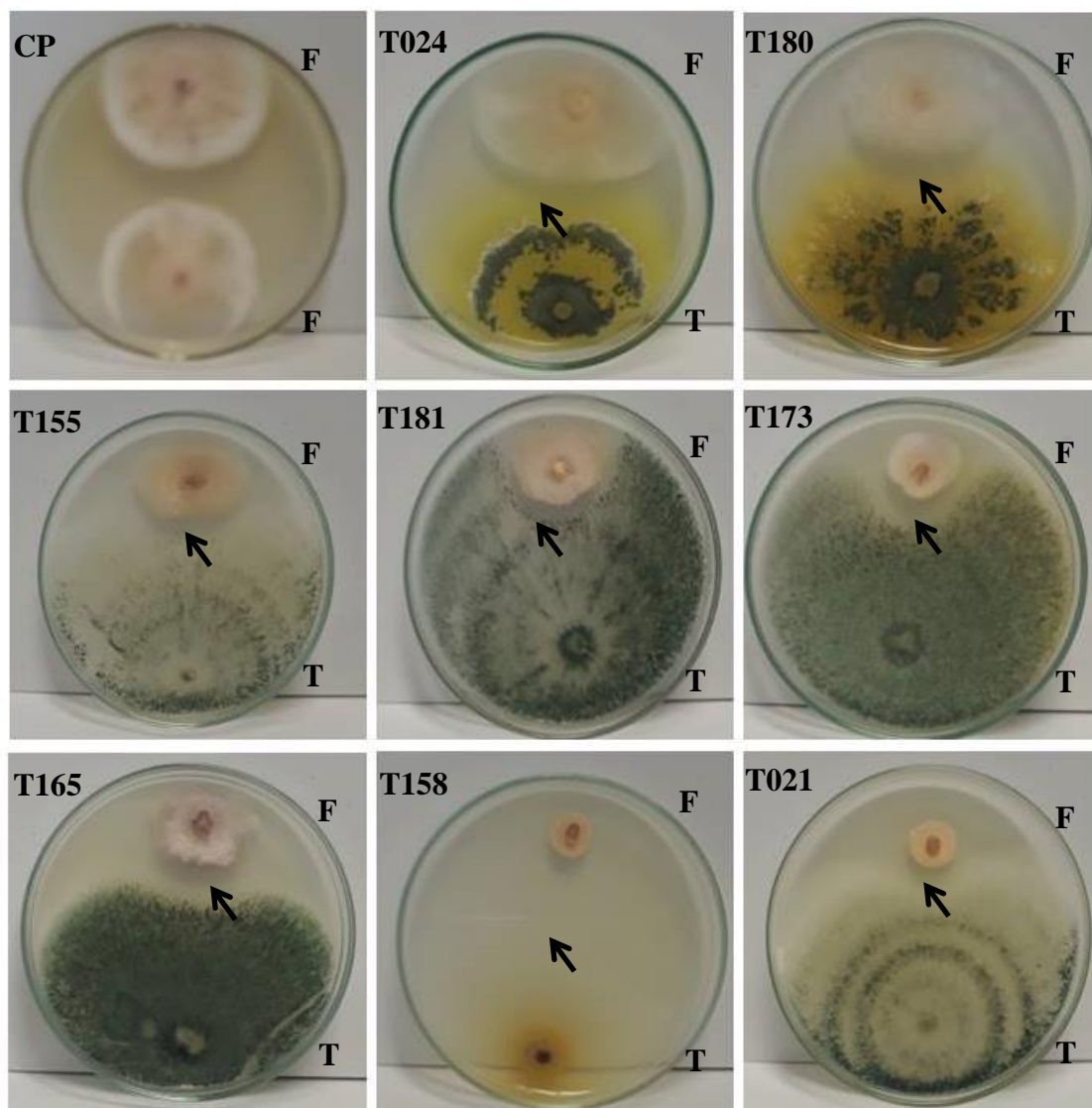


Figura 1. Atividade antifúngica *in vitro* de espécies de *Trichoderma* contra *Fusarium Sororula* em meio BDA. (T) Indica a posição do isolado de *Trichoderma*, (F) posição do *Fusarium sororula* e (seta) halo de inibição, zona limite de crescimento do patógeno através do contato físico ou metabólico produzido pelo antagonista.

Levando em consideração o desempenho antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *F. sororula*, segundo os resultados conjuntos de PIC, IVCM e InANT, foram

selecionados os isolados T021, T158, T065, T173 e T181 para os demais testes experimentais.

3.3. Desempenho antagônico *in vivo*

Os cinco isolados de *Trichoderma* selecionados foram avaliados *in vivo* em plantas micropropagadas de abacaxi cv. Pérola (**Tabela 3**), contra dois agentes da fusariose do abacaxizeiro *F. sororula* e *F. oxysporum*. Todos os isolados mostraram respostas positivas significativas contra os isolados patogênicos testados.

Tabela 3. Avaliação da atividade antagônica de espécies de *Trichoderma* contra isolados de *Fusarium sororula* e *Fusarium oxysporum* em mudas de abacaxizeiro, cv. Pérola.

Tratamentos	Mudas micropropagadas			
	<i>F. sororula</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	AACPD ¹	PL ²	AACPD ¹	PL ²
Test. ³	1.94 b	0.67 c	0.65 c	0.67 c
Cercobin ⁴	1.90 b	0.35 ab	0.35 a	0.32 b
T021	1.23 a	0.27 a	0.41 ab	0.37 b
T158	1.29 a	0.30 a	0.43 bc	0.30 ab
T165	1.28 a	0.30 a	0.43 bc	0.20 a
T173	1.14 a	0.40 b	0.45 bc	0.35 b
T181	1.03 a	0.32 ab	0.50 b	0.30 ab
Média	1.22	0.32	0.40	0.31
CV%	31.28	17.16	11.39	24.84

¹AACPD: Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (mm): através da soma das médias das lesões com o intervalo de avaliações.

²PL: Profundidade de lesão (mm);

³Test.: isolamento do patógeno sem aplicação de tratamentos;

⁴Cercobin: aplicação do produto químico Cercobin 700 PM® - 70 g. p. c. /100 L⁻¹

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre si pelo teste Least Significance Difference - LSD de Fisher a 5% de probabilidade.

Segundo os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) as melhores respostas de biocontrole foram observadas em mudas inoculadas com *F. sororula* e, já que os resultados evidenciando que todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram alto desempenho, variando entre 33-47% de inibição, em contraste com o controle químico (Cercobin) que proporcionou apenas 2% de inibição, quando comparados com o tratamento controle. Sobre *F. oxysporum*, o controle químico proporcionou 46% de inibição do desenvolvimento da doença e todos os isolados de *Trichoderma* foram

significativamente promissores reduzindo de 23 a 37% o tamanho da lesão, quando comparado com o controle (**Tabela 3; Figura 2**).

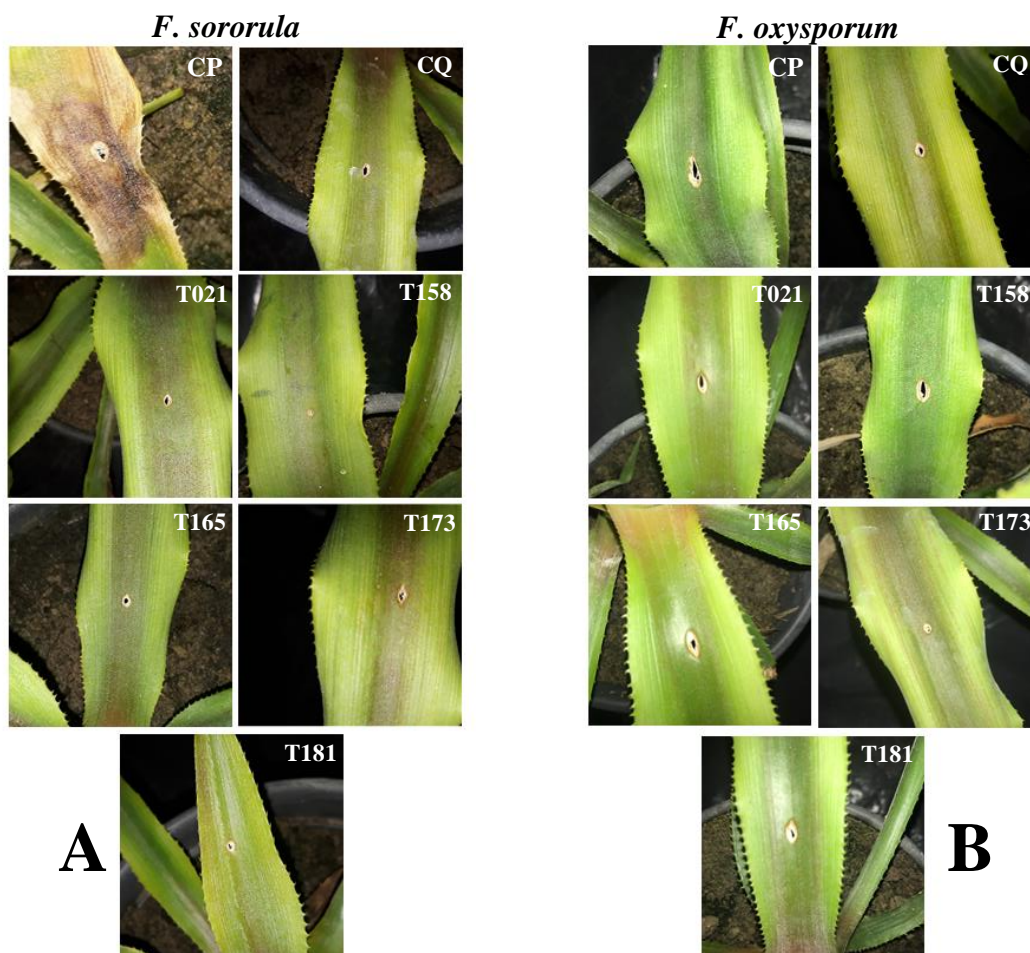


Figura 2. Atividade antifúngica de espécies de *Trichoderma* contra (A) *F. sororula*, (B) *F. oxysporum* em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola, 60 dias de incubação. (CP) Mudanças inoculadas com os patógenos e (CQ) mudas tratadas com o produto químico Cercobin 700 PM[®] - 70 g. p. c. /100 L⁻¹ de água.

Avaliando-se os resultados de profundidade de lesão (PL), observou-se que todos os isolados de *Trichoderma* expressaram relação antagônica significativa em todos os tratamentos contra *F. sororula* e *F. oxysporum* quando comparado com o tratamento controle. Os isolados T021; T158 e T165 se destacaram, proporcionando menor expressão do sintoma secundário causados por *F. sororula*, atingindo reduções sintomáticas de 60; 55 e 55%, respectivamente, consoantes ao controle químico, no qual houve 47% de inibição.

Para o *F. oxysporum*, os tratamentos com os isolados de *Trichoderma* proporcionaram pelo menos 44% de redução sintomática, equiparando-se ao controle químico, com destaque do isolado T165, que proporcionou redução sintomática de 70%, a todos os outros (**Tabela 3**).

3.4. Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

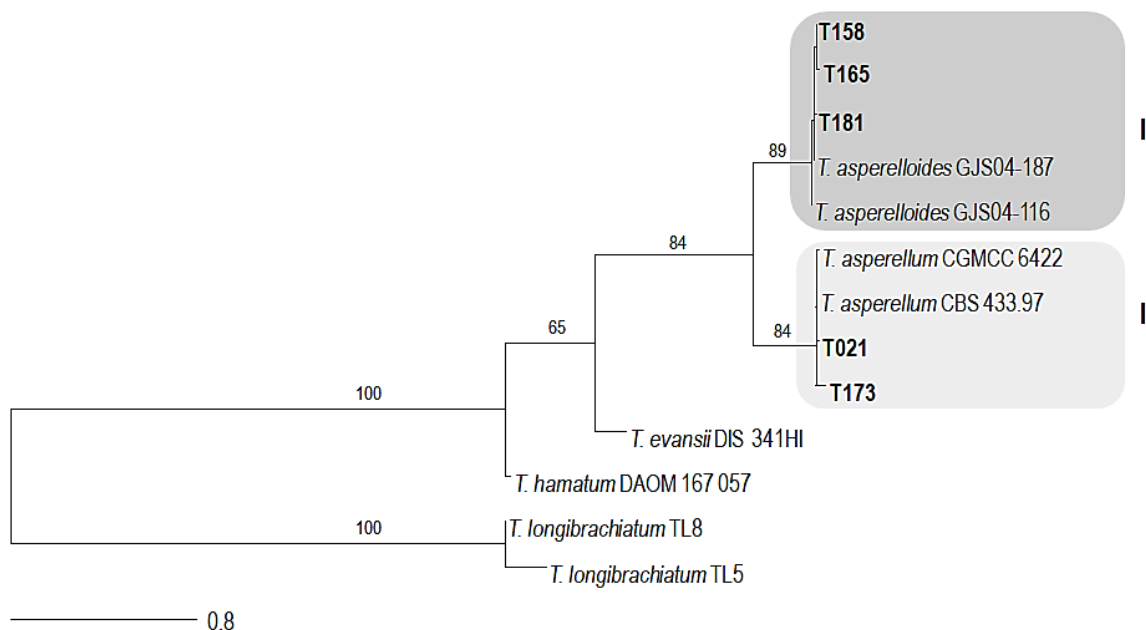


Figura 3. Árvore de Máxima Verossimilhança – MV de espécies de *Trichoderma*, com ocorrências descritas, baseada nas regiões gênicas ITS e *Efl- α* concatenadas, enraizada com *Trichoderma longibrachiatum* (TL8: JN039079 e JN039082; e TL5: JN039129 e JN039130). Os valores de Bootstrap acima de 70% (indicando ML/MP) estão dispostos nos ramos, próximos aos nós. Sequências em negrito foram obtidas nesse estudo e encontram-se destacadas nos subclados em destaque.

Através das ampliações e sequenciamento para caracterização antagônica dos cinco isolados selecionados de *Trichoderma* das regiões *tefl- α* e ITS, obtiveram fragmentos de aproximadamente 500 pb, em cada região. A partir do DNA genômico nas análises filogenéticas dos fragmentos amplificados da região *tefl- α* e ITS os táxons foram agrupados em um único clado, subdividido em dois grupos, ou subclados. Os isolados (T021 e T173) corresponderam a *T. asperellum* e (T158, T165 e T181) a *T. asperelloides* com valores de bootstrap bem suportados de 84 e 89, respectivamente (**Figura 3**). Após

depósitos das sequências gênicas na plataforma Genbank, os números de acessos obtidos foram: (ainda não depositados).

3.5. Interação microparasítica antagonistas x patógenos

Em observações microparasíticas das culturas dos fungos *T. asperellum* e *T. asperelloides*, observou-se que houve interações entre as hifas desses isolados antagônicos com os fungos patogênicos *F. sororula* e *F. oxysporum*, em apenas 24 horas de incubação. Genericamente, *T. asperellum* foi o antagonista inibidor que apresentou maior crescimento micelial em direção aos patógenos e sobre as interações diretamente parasíticas, ambos os fungos antagonistas apresentaram comportamento parasítico, agredindo a hifa do patógeno, enrolando-se nelas (parasitando-as), fixando-se por emissão de apressórios (**Figura 4**). Na relação entre *T. asperellum* e *F. sororula*, porções das hifas fitopatogênicas apresentaram morfologia de aspecto seco, seguidas por porções de hifas com a presença do conteúdo citoplasmático, indicando a presença de colonização local (**Figura 5**).

Em alguns casos, as hifas dos patógenos apresentaram estado mais avançado de degradação, decorrente da ação biocontroladora exercida pelos agentes antagônicos, como: decomposição de suas hifas, apresentando um aspecto enrugado, seco ou morto, indicando que, os agentes antagônicos estudados possuem capacidade de interagir através da antibiose. Além disso, todos os *Trichoderma* spp. atuaram sobre a produção conidial dos patógenos (dados não mostrados), havendo redução ou ausência quanto a produção conidial em todos os arranjos de pareamentos fúngicos, em comparação ao tratamento controle, no qual o cultivo foi pareado com o próprio patógeno (**Figura 4**).

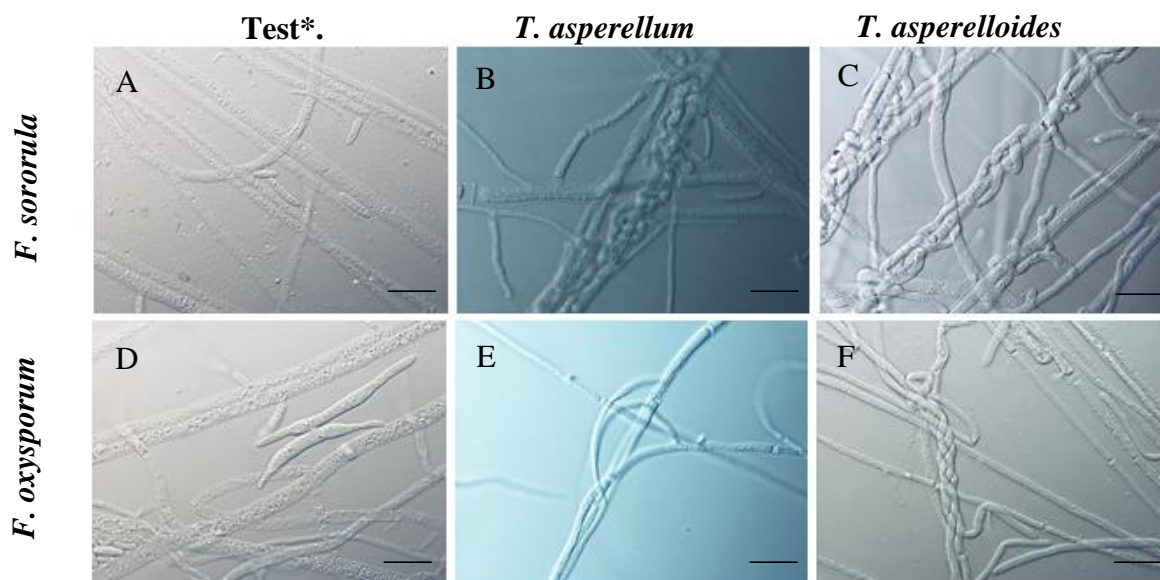


Figura 4. Fotomicroscopia (20 μm) mostrando a morfologia das hifas de *F. sororula* (A; B e C) e *F. oxysporum* (D; E e F) em interação com *T. asperellum* (B; E) e *T. asperelloides* (C e F) em BDA, 24 horas de incubação. ***Test.** testemunhas, ausência de interação com agentes antagônicos.

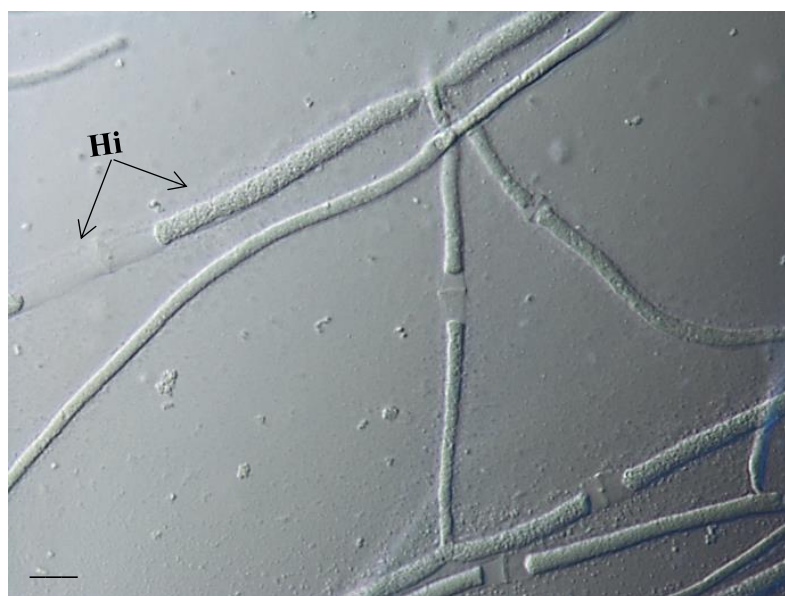


Figura 5. Fotomicroscopia (20 μm) da morfologia das hifas de *F. sororula* agredidas por *T. asperellum*, 24 horas de incubação em meio BDA. (**Hi**) setas indicando: hifas secas, seguidas de hifas com conteúdo citoplasmático, provenientes do parasitismo do antagonista.

4. Discussão

A experimentação *in vitro*, relacionada aos crescimentos e distribuição das colônias (antagonistas x patógeno) é uma forma de caracterizar e selecionar agentes com capacidade competitiva para o controle biológico (Schoneberg et al., 2015) e os resultados provenientes nesse trabalho reforçam essa assertiva. Segundo Taghdi et al. (2015) avaliando espécies de *Trichoderma* contra diferentes patógenos, o comportamento inibitório depende dos estímulos químicos do patógeno alvo. Os sucessos obtidos nos teste preliminares de seleção *in vitro*, com 36 isolados com *Trichoderma* apresentando potencial antagonico contra agentes causais da murcha de fusário no abacaxizeiro, comprovam que do controle de fitopatógenos dependerá das propriedades e mecanismos de ação do organismo antagonico à estímulos do patógeno.

Semelhantemente as proposta disposta nesse estudo, Souza et al. (2016) avaliaram a atividade biocontroladora de isolados de *Trichoderma* sobre a fusariose do abacaxizeiro causada por *F. guttiforme*, espécie pertencente ao mesmo complexo da espécie de *F. sororula* estudada nesse artigo, e nesse processo selecionaram 26 isolados, entre os 109 isolados de *Trichoderma* estudados, capazes de desempenhar níveis satisfatórios de controle *in-vitro*.

As linhagens de *Trichoderma* caracterizam-se por uma versatilidade de ações antagonicas, podendo participar de várias formas, como: parasitismo, antibiose, competição, indutores de resistência e na promoção de crescimento vegetal (Machado et al., 2012). Prioritariamente, o mecanismo destaque na nossa seleção preliminar, para a detecção de *Trichoderma* promissores no controle da fusariose do abacaxizeiro, em testes de pareamento foi à antibiose, por meio da presença de halos inibitórios entre as zonas de crescimentos do *F. sororula* e os isolados de *Trichoderma*.

A presença desses halos de inibição em antagonismo *in-vitro*, indica a existência de interações de contato direto, por ações físicas, ou indiretas, metabólicas, como por exemplo, as de digestão de enzimas hidrolíticas (quitinases, proteases, glucanases e lipases), e/ou competição, por nutrientes, água, luz, oxigênio, entre outros, que nos levam a crer que esses mecanismos possam interagir inibindo ou destruindo os propágulos do patógeno no hospedeiro, impactando diretamente no controle eficaz da doença.

Segundo Souza et al, (2016) a melhor abordagem de seleção de isolados de *Trichoderma* no controle da fusariose é realização de bioensaios *in vivo*. Os mecanismos antagonicos, desempenhados pelo agente biocontrolador, só podem ser completamente

evidenciados quando presentes em sistemas naturais, ou seja, à ausência do principal personagem “o hospedeiro”, em ensaios *in vitro*, acaba comprometendo a chance de selecionar de forma efetiva um agente de biocontrole, em comparação com ensaios *in-vivo* com o hospedeiro (Fravel, 1988).

As repostas inibitórias sobre o desenvolvimento sintomático primários e secundários da doença em mudas de abacaxizeiro, após tratamento com os cinco isolados de *Trichoderma* e inoculação com isolados de *Fusarium* spp., são categóricas e corroboram para a compreensão das atividades biocontroladoras e bioestimulantes exercidas pelos isolados antagônicos.

Além da ação direta sobre o fitopatógeno, é possível que os isolados de *Trichoderma* tenham favorecido o desenvolvimento radicular da planta, através de uma ação bioestimulante, promovendo seu crescimento, com desenvolvimento de raízes secundárias, melhorando a assimilação de nutrientes, eliciando o efeito *priming*, favorecendo a resistência das mudas a fatores bióticos não favoráveis e refletindo para a redução de sintomas secundários como a profundidade da lesão nas raízes, sintoma típico causado pela murcha de fusário em abacaxizeiro.

Resultados dessa natureza foram observados e reportados por Brotman et al. (2013), nos quais *T. asperelloides* ativou as defesas antioxidativo do vegetal, aumentando a liberação de ácido ascórbico pela planta e, conseqüentemente, promovendo uma maior proteção a danos oxidativos. Kapuganti et al. (2014) observaram a ocorrência de supressão do *F. oxysporum* incitada por *T. asperelloides*, que foi capaz de diminuir o desenvolvimento da doença necrotrófica em plantas de *Arabidopsis*. Essas informações podem ser associadas aos resultados obtidos em nossos experimentos, diretamente no tangente a redução dos sintomas secundários observados na região radicular das mudas de abacaxi, cv. Pérola, por ação de *T. asperellum* e *T. asperelloides*, duas importantes espécies relatadas e largamente estudadas no controle biológico de doenças de plantas (Marcelo et al., 2010; Harold et al., 2012; Taghdi et al., 2015; Brotman et al. 2013; Kapuganti et al. 2014).

A interação dos biocontroladores *T. asperellum* e *T. asperelloides* aos fitopatógenos *F. sororula* e *F. oxysporum*, indicam ação hiperparasítica. Essa ação revela uma visão posteriori acerca da possível morte dos fitopatógenos (Sivakumar et al., 2000). O contato físico do enrolamento hifal de espécies de *Trichoderma* sobre fitopatógenos também foi observado por Schoneberg et al. (2015) e Matarese et al. (2012).

O produto da capacidade micoparasítica, através do enrolamento de hifas antagônicas e estabelecimento de contato direto com o patógeno, são ações secundárias, com a finalidade de penetração, colonização, e, em muitos casos, liberação de compostos antibióticos ou enzimas que degradam a parede celular (Barnett e Lilly, 1962). Esses efeitos são claramente observados em neste trabalho por meio das imagens de microscopia entre interações de hifas de *T. asperellum* e *F. sororula*.

A capacidade adaptativa de isolados de *T. asperellum* representa uma versatilidade altamente promissora, principalmente para finalidades experimentais em cultivos. Uma vez que indivíduos dessa espécie têm a capacidade de desenvolvimento em intervalos de temperaturas entre 20 a 30 °C. (Hoyos et al., 2012) e o abacaxizeiro, por ser fruteira tropical adaptada a condições de temperatura elevada, a utilização de *T. asperellum* como organismos antagonista, aplicados ao manejo da fusariose do abacaxizeiro, torna-se aplicável e promissora.

Os resultados assinalados nesse trabalho estendem novas expectativas atreladas ao anseio de mudanças metodológicas e habituais, em nossa atual era química. Organismos potencialmente biocontroladores, com características antagônicas desejáveis tais como *T. asperellum* e *T. asperelloides*, representam uma alternativa promissora e aplicável, salubre ao ambiente, e eficiente contra espécies patogênicas como *F. sororula* e *F. oxysporum*, evitando o uso indiscriminado de insumos químicos no manejo dos mesmos.

Por meio da elaboração de formulações adequadas, os referidos agentes de controle biológico poderão expressar seu completo potencial sobre murcha de fusário em abacaxizeiro. Assim esse trabalho oportuniza o surgimento de novas pesquisas, visando a elucidação dos fatores que atuam sobre a eficácia nesse sistema de biocontrole como: substâncias antibióticas, enzimas, voláteis e de eficiência em campo.

5. Referências

- Atanasova. L., Le. C.S., Gruber. S., Culpier. F., Seidl-Seiboth. V., Kubicek. C.P., Druzhinina. I.S., 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. *BMC genomics*, 14: 121.
- Bell. D.K., Wells. H.D., Markham. C.R., 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, cidade, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

- Brotman. Y., Landau. U., Cuadros-Inostroza. A., Takayuki. T., Fernie. A.R., Chet. I., Viterbo. A., Willmitzer. L., 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*, 9: e1003221.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. *Produção de abacaxi*. FAO, Roma. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Acessado 13.09.18).
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. *Produção de abacaxi*. FAO, Roma www.fao.org/faostat3.fao.org/compare/E. (Acesso 14.10.18).
- Ferreira, S. R., de Araújo, J. V., Braga, F. R., Araujo, J. M., Frassy, L. N., Ferreira, A. S., 2011. Biological control of *Ascaris suum* eggs by *Pochonia chlamydosporia* fungus. *Veterinary research communications*, 35: 553-558.
- Fravel. D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 75-91.
- Ghosh. S.K., Banerjee. S., Pal. S., Chakraborty. N., 2018. Encountering epidemic effects of leaf spot disease (*Alternaria brassicae*) on Aloe vera by fungal biocontrol agents in agrifields—An ecofriendly approach. *PloS one*, 13: e0193720.
- Ibrahim. N.F., Mohd. M.H., Nor. N.M.I.M., Zakaria. L., 2015. First report of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* associated with pineapple rot in Peninsular Malaysia. *Plant Disease*, 99: 1650-1650.
- Ibrahim. N.F., Mohd. M.H., Nor. N.M.I.M., Zakaria. L., 2016. *Fusarium fujikuroi* causing fusariosis of pineapple in peninsular Malaysia. *Australasian Plant Disease Notes*, 11: 21.
- Jacobs. A., Van-Wyk. P.S., Marasas. W.F., Wingfield. B.D., Wingfield. M.J., Coutinho. T.A., 2010. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal biology*, 114: 515-527.
- Kapuganti. G.J., Mur. L.A.J., Brotman. Y., 2014. *Trichoderma asperelloides* suppresses nitric oxide generation elicited by *Fusarium oxysporum* in Arabidopsis roots. *Molecular plant-microbe interactions*, 27: 307-314.
- Machado. D.F.M., Parzianello. F.R., Silva. A.C.F.D., Antonioli ZI, 2012. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35: 274-288.
- Marcello. C.M., Steindorff. A.S., Da-Silva. S.P., Nascimento. S.R., Bataus. L.A.M., Ulhoa. C.J., 2010. Expression analysis of the exo- β -1, 3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, 165: 75-81.

- Matarese. F., Sarrocco. S., Gruber. S., Seidl. S.V., Vannacci. G., 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*, 158: 98–106.
- Mbarga. J.B., Ten hoopen., G.M., Kuatú. J., Adiobo. J.A., Ngonkeu. M.E.L., Ambang. Z., 2012. A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, 36: 18-22.
- Naglot. A., Goswami. S., Rahman. I., Shrimali. D.D., Yadav. K.K., Gupta. V.K., Veer. V., 2015. Antagonistic potential of native *Trichoderma viride* strain against potent tea fungal pathogens in North East India. *The plant pathology journal*, 31: 278.
- Oliveira, A. G., Junior, A. F. C., dos Santos, G. R., Miller, L. O., Chagas, L. F. B., 2012. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. *Revista Verde*, 7: 149-155.
- PARA - Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, 2015. *Gerência Geral de Toxicologia - ANVISA*. PARA, Brasília
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/LMR%252B2014-Atualizado%252Bem%252B23-2-2015.pdf/189629ae-a901-4696-b439-d5d1c3953303> (Acesso 13.04.18).
- Pastrana. A.M., Basallote-Ureba. M.J., Aguado. A., Khalid. A.K.D.I., Capote. N., 2016. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 55:109-120.
- Ploetz, R. C., 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, 96: 653–656
- Santos. F.J., Ferreira. J.M.S., Ribeiro. V.J.O., De-Oliveira. A.C.L., De-Azevedo. A.G.C., 2000. Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos II-Hirsutella thompsonii (Fischer). *Embrapa Tabuleiros Costeiros-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* (INFOTECA-E).
- Taghdi, Y., Hermosa, R., Dominguez, S., Rubio, M. B., Essalmani, H., Nicolas, C., Monte, E., 2015. Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathologia Mediterranea*, 232-240.

- Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R.S., Wijesundera, R.L.C., Marikar, F.M.T. and Abeyesekere, M., 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica* 28: 240-247.
- Souza, W. C., Nascimento, L. C., Oliveira, M. D., Porcino, M. M., Silva, H. A., 2018. Genetic diversity of *Fusarium* spp. in pineapple 'Pérola' cultivar. *European journal of plant pathology*, 150: 853-868.
- Sumida, C. H., Daniel, J. F., Araujod, A. P. C., Peitl, D. C., Abreu, L. M., Dekker, R. F., Canteri, M. G., 2018. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. *Biocontrol science and technology*, 28:142-156.
- Barnett. H.L., Lilly. V.G., 1962. A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. *Mycologia*, 54: 72-77.
- Murray, M. G., Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8: 4321-4326.
- Ploetz, R.C., 2003. 2 Diseases of Atemoya, Cherimoya, Soursop, Sugar Apple and Related Fruit Crops. In: *Diseases of Tropical Fruit Crops*. (Eds) R. C. Ploetz, CAP International, p. 21-34.
- Kunieda. A.S., Alfenas. A.C.E., Maffia. L.A., 2005. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. *Fitopatologia Brasileira*, 30:164-168.
- Lopes. R.B., 2009. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: Bettiol, W. e Morandi, M.A.B. (Ed.) - *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 15–28.
- Hoyos, H. A. V., Rueda-Lorza, E. A., Gilchrist-Ramelli, E., 2012. Antagonist activity of *Trichoderma asperellum* (fungi: ascomycota) at different temperatures. *Actualidades Biológicas*, 34: 103-112.
- Innocenti. G., Roberti. R., Piattoni. F., 2015. Biocontrol ability of *Trichoderma harzianum* strain T22 against *Fusarium* wilt disease on water-stressed lettuce plants. *BioControl*, 60: 573-581.
- Schoneberg. A., Musa. T., Voegelé. R. T., Vogelgsang. S., 2015. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium*

crookwellense varies depending on the experimental approach. *Journal of applied microbiology*, 118: 1165-1179.

Liu. J., He. C., Shen. F., Zhang. K., Zhu. S., 2017. The crown plays an important role in maintaining quality of harvested pineapple. *Postharvest Biol. Technol*, 124: 18–24.

Saravanakumar. K., Dou. K., Lu. Z., Wang. X., Li. Y., Chen. J., 2018. Enhanced biocontrol activity of cellulase from *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum* through activation of defense-related genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103: 130-136.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- A espécie *Fusarium sororula* compõe o complexo de espécies de *F. fujikuroi* - FFSC, assim como o *F. oxysporum* compreende ao complexo *F. oxysporum* - FOOSC, ambos relacionados com a fusariose do abacaxizeiro, no Nordeste brasileiro.
- Esse é o primeiro relato de *F. sororula* em abacaxizeiro no Nordeste brasileiro;
- Em relação à patogenicidade da fusariose do abacaxizeiro, *F. sororula* e *F. oxysporum*, comportam-se semelhantemente, assim devem ser consideradas como principais alvos do controle da murcha de fusarium na cultura do abacaxi;
- A levedura *Meyerozyma caribbica*, isolada da microbiota do abacaxizeiro, é um agente antagônico eficiente à *Fusarium sororula* e *F. oxysporum* em frutos e mudas, logo podendo ser considerada como espécie 'chave' na prospecção de um novo controle biológico para a murcha de fusarium na cultura do abacaxi;
- A levedura *M. caribbica* é produtora de biofilme, toxinas *Killer*, enzimas como protease, esterase, amilase, fosfatase e celulase, conferindo capacidade potencial de inibição outros patógenos;
- As espécies, *Trichoderma asperellum* e *T. asperelloides* apresentam potencialidade biocontroladora da fusariose do abacaxizeiro *in vitro* e *in vivo*, causada por *F. sororula* e *F. oxysporum*, podendo torna-se aplicável em sistemas de manejo integrado cultura, no entanto estudos complementares são necessários;
- O controle biológico usando fungos antagônicos para a fusariose do abacaxizeiro pode ser uma prática viável.