



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Leveduras e seleção de genótipos como estratégias para o
manejo da palma forrageira**

Michele Freitas Santiago

**Recife – PE
2017**

MICHELE FREITAS SANTIAGO

**LEVEDURAS E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS COMO ESTRATÉGIAS PARA O
MANEJO DA FUSARIOSE DA PALMA FORRAGEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: DELSON LARANJEIRA

Co-Orientadora: TEREZA CRISTINA DE ASSIS

Co-Orientadora: REJANE PEREIRA NEVES

**RECIFE - PE
Julho – 2017**

**LEVEDURAS E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS COMO ESTRATÉGIAS PARA O
MANEJO DA FUSARIOSE DA PALMA FORRAGEIRA**

MICHELE FREITAS SANTIAGO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/07/2017.

ORIENTADOR:

PROF. DR. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Rejane Pereira Neves (UFPE)

Alice Maria Gonçalves Santos (UFPI)

Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

**RECFE-PE
JULHO – 2107**

Aos meus pais, Jussara Maria de Freitas Santiago e Daniel Rodrigues Santiago. Aos meus familiares e amigos. E a todos que de alguma forma influenciaram na minha formação pessoal e profissional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, sabedoria e segurança, por manter-me sempre firme diante dos desafios;

Aos meus pais que sempre me incentivaram na realização dos meus sonhos;

Ao Comitê de Orientação Prof. Dr. Delson Laranjeira, Dra. Tereza Cristina de Assis e Profa. Dra. Rejane Pereira Neves por terem me recebido, acolhido e ensinado muito durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colaboradores de várias instituições pelos seus ensinamentos em diversas áreas Profa. Dra. Alice Maria Gonçalves Santos, Dr. Amaro Castro de Lira Neto, Dr. Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade, Dra. Luciana Melo Sartori Gurgel, Ms. Djalma Cordeiro dos Santos, Prof. Dr. Clécio Souza Ramos, Dra. Dyana Leal Veras.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA – UFPE), ao Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ), Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), pela utilização de seus espaços e infraestrutura.

Ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (Cnpq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Dra. Sônia Oliveira, Dra. Rosa Mariano, Dra. Elineide Barbosa, Dra. Elvira Pedrosa, Dra. Lilian Guimarães, PhD. Marcos Câmara; Dr. Sami Michereff, Dr. Gilvan Pio, Dr. Gaus Andrade, Dr. Ailton Reis, Dr. Marco Gama, Dr. Alessandro Nicoli, Dr. Ueder Lopes, pela dedicação com que transmitiram seus ensinamentos.

Aos amigos de laboratório e república: Alain, Ananda, Carlos, Carmem, Cecília, Celma, Cícero, Daniela, Diego, Emanuelle, Evelyn, Fabiane, Ferdner, Gabriel, Gabriela, Gerusa, Giovana, Gisely, Iwanne, Jessica, Líria, Loréna, Lúcia, Marcílio, Maurício, Mayumi, Nayara, Osséias, Pierrette, Poliana, Raycenne, Roberto, Simara, Soraya, Susan, Taís, Tarciana, Tarcio, Victor, Viviane, pelo companheirismo e cumplicidade.

Aos funcionários Darci, Romildo, Denise, Patrícia, Rafael e Ana Clara pela disponibilidade.

A todos os meus orientadores que me acompanharam desde o início da minha formação acadêmica: Dr. Bernardo Ueno, Prof. Dr. Juvêncio Luis Osorio Fernandes Pouey, Prof. Dr. Paulo Rudinei Soares Lopes, Prof. Dr. Edeimar Antônio Rossetto, Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras e Dr. Ivan Rodrigues de Almeida.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma participaram da minha trajetória me incentivando principalmente nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO GERAL..... | vii |
| GENERAL ABSTRACT..... | viii |
| CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL..... | 9 |
| 1.1. Origem da palma forrageira..... | 9 |
| 1.2. Importância da palma forrageira..... | 10 |
| 1.3. A palma forrageira..... | 11 |
| 1.4. A fusariose da palma forrageira..... | 13 |
| 1.5. Caracterização do gênero <i>Fusarium</i> | 14 |
| 1.6. Medidas de manejo de fusariose da palma forrageira..... | 15 |
| 1.6.1. Biocontrole com leveduras..... | 16 |
| 1.6.2. Controle genético com cultivares resistentes..... | 18 |
| 2. Referências Bibliográficas..... | 19 |
| CAPÍTULO 2 – LEVEDURAS NATIVAS, UMA NOVA OPÇÃO NO BIOCOTROLE DE FUSARIOSE EM PALMA FORRAGEIRA..... | 28 |
| Resumo..... | 29 |
| Introdução..... | 31 |
| Material e métodos..... | 32 |
| Resultados e Discussão..... | 36 |
| Conclusões..... | 39 |
| Agradecimentos..... | 40 |
| Referências..... | 40 |
| CAPÍTULO 3 – PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE <i>Candida carphophila</i> NO BIOCOTROLE DA FUSARIOSE DA PALMA FORRAGEIRA..... | 49 |
| Resumo..... | 50 |
| Introdução..... | 51 |
| Material e métodos..... | 52 |
| Resultados e Discussão..... | 56 |
| Conclusões..... | 59 |
| Referências..... | 60 |
| CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA RESISTENTES À FUSARIOSE..... | 68 |
| Resumo..... | 68 |
| Introdução..... | 68 |
| Material e métodos..... | 72 |
| Resultados e Discussão..... | 73 |
| Agradecimentos..... | 76 |
| Referências..... | 76 |
| CAPÍTULO 5. – CONCLUSÕES GERAIS..... | 84 |

RESUMO GERAL

Originária do México a palma forrageira é uma cultura bem adaptada às condições adversas do semiárido. Essa cactácea é intensamente cultivada nas regiões secas, alta rusticidade e alta conversão de água. Cultivada em áreas com acentuado nível de pobreza nos estados do Nordeste brasileiro, a palma forrageira tem grande importância socioeconômica para essa região, onde se tem longos períodos de estiagem, servindo principalmente de alimentação animal em pequenas propriedades. As doenças da palma forrageira têm sido pouco estudadas no Brasil e quase todos os trabalhos apenas descrevem a sintomatologia e a patogenicidade dos agentes causadores. Entre elas a fusariose causada pelos fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium equiseti*, afetam os cladódios-sementes e cladódios da base em plantas adultas, onde eles murcham e tombam sobre a planta poucos dias após a infecção. Os tecidos do cladódio infectado tornam-se aquosos, escurecem e expõem as estruturas internas lenhosas. As raízes apodrecem, exibindo coloração marrom-avermelhada. Os objetivos desse trabalho foram avaliar o potencial de leveduras no controle da fusariose em palma forrageira, com a utilização de biocontrole através de leveduras e controle genético através de variedades resistentes. Foram realizados testes de biocontrole em cladódios destacados e *in vitro*, com as leveduras *Cystobasidium slooffiae*, *Candida carpophila*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium pullulans*, *Cyrenella elegans* e *Debaryomyces hansenii*, todas apresentaram resultados promissores como fontes de compostos bioativos com ação antifúngica. Desses destaca-se a levedura *C. carpophila*, seu extrato clorofórmico demonstrou elevada eficiência comparado ao fungicida Tecto SC[®] no controle de *F. oxysporum* e *F. equiseti*. Nos ensaios com seleção de genótipos destacamos seis genótipos como sendo os mais promissores quanto à resistência à fusariose e esses poderão ser utilizados por melhoristas em futuros cruzamentos, para obtenção de palma forrageira resistente à fusariose. Com esse trabalho propomos alternativas viáveis para o manejo da fusariose da palma forrageira.

Palavras chave: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Nopalea cochenilifera*, semiárido.

GENERAL ABSTRACT

Native to Mexico, prickly pear cactus is a crop well adapted to the adverse conditions of the semiarid. This cactus is intensely cultivated in the dry regions, high rusticity and high conversion of water. Cultivated in areas with a high level of poverty in the states of Northeast Brazil, prickly pear cactus has great socioeconomic importance for this region, where there are long periods of drought, serving mainly animal feed in small properties. The diseases of the prickly pear cactus have been little studied in Brazil and almost all the studies only describe the symptomatology and the patogenicity of the causative agents. Among them, fusariosis caused by the fungi *Fusarium oxysporum* and *Fusarium equiseti*, affect the cladodes-seeds and cladodes of the base in adult plants, where they wither and fall on the plant a few days after the infection. The infected cladodium tissues become aqueous, darken and expose the internal woody structures. The roots rot, exhibiting reddish-brown coloration. The objectives of this work were to evaluate the potential of yeasts in the control of the control of fusariosis in prickly pear cactus, with the use of biocontrol through yeasts and genetic control through resistant varieties. Biocontrol tests were carried out in cladodes and in vitro with the yeasts *Cystobasidium slooffiae*, *Candida carpophila*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium pullulans*, *Cyrenella elegans* and *Debaryomyces hansenii*, all of which presented promising results as sources of bioactive compounds with antifungal action. Of these, yeast *C. carpophila* stands out, its chloroform extract showed high efficiency compared to the fungicide Tecto SC® in the control of *F. oxysporum* and *F. equiseti*. In the trials with genotype selection, six genotypes were the most promising for fusariosis resistance and could be used by breeders in future crosses to obtain fusariosis resistant prickly pear cactus. With this work we propose viable alternatives for the management of the fusariose of prickly pear cactus.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Nopalea cochenilifera*, semiarid.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

MANEJO INTEGRADO DA FUSARIOSE DA PALMA FORRAGEIRA EM PERNAMBUCO

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Origem da palma forrageira

A palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) tem sua origem Mexicana associada a economia agrícola do Império Asteca, juntamente com milho e agave, consideradas as espécies vegetais mais antigas cultivadas no território mexicano (NUNES, 2011). Quando os colonizadores chegaram ao México, existiam diversas variedades desta cactácea (REYES-AGUERO, AGUIRRE-RIVERA, HERNÁNDEZ, 2005). No entanto, análises biogeográficas recentes demonstraram que as espécies atuais possuem ancestrais comuns na América do Sul (MAJURE et al., 2012). Os cultivos de palma forrageira encontram-se distribuídos em todo o mundo, desde o Canadá até a Argentina, do nível do mar até 5.100 m de altitude no Peru. Sendo levada do México à Espanha em 1520, e depois para Portugal, África, Ásia, e Oceania (BARRIOS, MUÑOZ-URÍAS, 2001; HOFFMANN, 2001).

Acredita-se que a palma forrageira chegou no Nordeste do Brasil, aproximadamente em 1818, quando o governador da região solicitou à Coroa Brasileira, então instalada no Rio de Janeiro, o envio de várias plantas do Real Horto Botânico do Rio de Janeiro, e entre elas cactos, para os novos jardins botânicos instalados em Pernambuco (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012). A palma forrageira tem sua história de introdução no Brasil no século XIX, sua reintrodução se deu pela necessidade na época de produção da cochonilha do carmim (SIMÕES; SANTOS; DIAS, 2005). Posteriormente, a palma foi novamente introduzida no Nordeste brasileiro, no início do século XX, sendo disseminada por ordem do governo, após a seca de 1932 (LIMA; GAMA, 2001). As pequenas plantações já estabelecidas eram insistentemente procuradas por bovinos, caprinos e ovinos que as comiam. Assim, a planta forrageira passou a ser utilizada por criadores de animais (SEBRAE-PE, 2003).

A partir da década de 50 é que realmente começaram os estudos de caráter mais aprofundados sobre as espécies de palma forrageira buscando seu melhor aproveitamento. Entre os anos de 1979 e 1983, durante a estiagem prolongada ocorrida no Nordeste do Brasil, a palma forrageira adquiriu mais espaço no cenário semiárido. Desse ponto em diante

começaram-se inúmeros estudos voltados a palma forrageira (FIGUEREDO; SILVA; GOMES FILHO, 2010).

A palma forrageira voltou a ser cultivada em larga escala pelos criadores das bacias leiteiras e estima-se que hoje existam cerca de 500 mil hectares no Nordeste, estando boa parte concentrado nos estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Rio Grande do Norte e Bahia (OLIVEIRA; JUNQUEIRA; MASCARENHAS, 2011). A área de palma forrageira tem aumentado nos períodos mais prolongados de seca. Essa contém em média 90% de água, para o semiárido, uma valiosa contribuição no suprimento desse líquido para os animais (SANTOS et al., 2006).

A palma forrageira aparece como uma alternativa de cultivo, adaptada ao clima semiárido, visto ser uma cultura com mecanismo fisiológico especial, metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), no que se refere à absorção, aproveitamento e perda de água (SANTOS et al., 2012; SNYMAN, 2006), por meio deste, fecha seus estômatos durante o dia, evitando a perda excessiva de água através do processo de transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2004). Tornando-a uma planta bastante eficiente do ponto de vista do uso de água, a qual permite adaptar-se as condições de clima do semiárido (SAMPAIO, 2005). Em virtude de sua fisiologia, é bem adaptada também aos solos dessa região, podendo atingir elevados níveis de rendimento, ou seja, tem um grande potencial produtivo com alternativas sustentáveis de desenvolvimento (NUNES, 2011). Podem ser de 4 a 5 vezes mais eficiente na conversão de água do que as gramíneas (RUSSEL, FELKER, 1987). As mesmas produzem, em cultivos bem conduzidos, uma biomassa superior a 150 toneladas de matéria verde/ha/ano e 15 toneladas de matéria seca/ha/ano (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012; SANTOS et al., 2006). Importante como uma alternativa para a alimentação dos animais durante o período de estiagem, se apresenta eficaz para combater a fome e a desnutrição no semiárido nordestino, além de ser uma importante aliada nos tratamentos de saúde, rica em vitaminas A, complexo B e C e minerais como: cálcio, magnésio, sódio e potássio, além de 17 tipos de aminoácidos. A palma é mais nutritiva que alimentos como a couve, a beterraba e a banana, com a vantagem de ser um produto mais econômico (NUNES, 2011).

1.2. Importância da palma forrageira

A região Nordeste compreende uma área de 1.561.177,8 km², equivalente a 18,27% do território nacional, dos quais 61,67% estão contidos no “Polígono das Secas”, e dentro desse polígono 53,88% representam o semiárido nordestino. No “polígono das secas”, ocorrem

longos períodos de estiagem, as temperaturas são altas, as precipitações são escassas e possui grande déficit hídrico (MURILO, 2011). A criação de rebanhos, principalmente de pequenos ruminantes, representa uma das principais atividades, sendo a principal fonte de sustento alimentar, geração de emprego e manutenção da estrutura socioeconômica familiar no semiárido nordestino (COUTINHO et al., 2013). Entre os rebanhos destacam-se a caprino e ovinocultura, que abrangem 92% e 60,6% do rebanho nacional, respectivamente (FAO, 2015; IBGE, 2017).

A palma forrageira tem destacada importância por contribuir com o desenvolvimento das regiões semiáridas através da exploração econômica das várias espécies, com consequências positivas para o meio ambiente e para segurança alimentar (CHACCHIO, MESQUITA, RODRIGUES, 2006). Mundialmente, a palma forrageira é utilizada para produção de forragem e nutrição animal, na alimentação humana, medicina, indústria de cosméticos, fabricação de adesivos, fibras para artesanato, fabricação de papel, corantes, mucilagens, antitranspirantes, ornamentação, entre outras (CHACCHIO, MESQUITA, RODRIGUES, 2006; SANTOS et al., 2012).

O fenômeno da seca é natural e causa sérios prejuízos ao setor agropecuário (OLIVEIRA et al., 2010). A palma forrageira é um alimento importante na atividade pecuária sendo cultivadas em todo o mundo (HOFFMANN, 2001). É um alimento de grande importância para os rebanhos, principalmente nos períodos de estiagens prolongadas, pois além de fornecer um alimento verde, supre grande parte das necessidades de água dos animais nas épocas de escassez (BARBERA, 2001; SANTOS et al., 2006), sobretudo em virtude da economia em rações concentradas e pelo aumento de produtividade (OLIVEIRA; JUNQUEIRA; MASCARENHAS, 2011).

O bom rendimento dessa cultura está climaticamente relacionado às áreas com 400 a 800 mm anuais de chuva, umidade relativa acima de 40% e temperatura de 25°C (LOPES, SANTOS, VASCONCELOS, 2012). São espécies que não toleram umidade excessiva e apresentam extraordinária capacidade de extração de água do solo, a ponto de possuir cerca de 90-93% de umidade, o que torna importante para a região do 'polígono das secas' (SILVA; SANTOS, 2006).

Tem grande importância socioeconômica para o Nordeste brasileiro, sendo cultivada em áreas com acentuado nível de pobreza, longos períodos de estiagem, sendo utilizada principalmente, na alimentação animal, em pequenas propriedades (MENEZES et al., 2005).

E sua produtividade pode ser reduzida por vários fatores tais como: lesões mecânicas, monocultura e manejo fitossanitário inadequado (MÉNDEZ-GALLEGOS et al. 2009; SWART 2009).

1.3. A palma forrageira

A palma forrageira pertence à divisão Embryophyta, subdivisão Angiospermea, classe Dicotyledoneae, subclasse Archiclamideae, ordem Opuntiales e família das *Cactaceae* (SILVA, SANTOS, 2006). As cactáceas são plantas arbustivas, suculentas e ramificadas. Constituem um grupo extremamente diversificado, com um impressionante conjunto de estratégias adaptativas, evolutivas e ecológicas, que lhes conferem uma grande capacidade de desenvolvimento nos diferentes habitats (BARBERA, 2001; REBMAN, PINKAVA, 2001).

No Nordeste do Brasil, são encontrados quatro tipos distintos de palma: gigante (*Opuntia ficus indica* a (L.) Mill), redonda (*Opuntia* sp.), miúda e mão de moça (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck) (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012) e orelha de elefante (*O. stricta* Haw) (SANTOS et al., 2001).

A palma gigante é caracterizada pelo crescimento vertical, resistência à seca, alta produtividade, susceptível á falsa cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae* cockerell) e menos palatável, quando comparada com a palma miúda. A redonda apresenta característica que se assemelham as da variedade gigante, diferindo apenas, no formato dos cladódios e no hábito de crescimento da planta. Sendo mais produtiva do que a palma miúda em termos de massa verde. A palma orelha de elefante mexicana apresenta crescimento horizontal, rica em matéria seca em relação a variedade gigante, possui pelos e é resistente a falsa cochonilha do carmim. A palma miúda tem como características principais o crescimento vertical, a baixa resistência à seca, resistência à falsa cochonilha do carmim, além de ser mais rica em carboidratos e apresenta maior porcentagem de matéria seca, em relação à palma gigante (SANTOS et al., 2001), com exceção a mão de moça que é suscetível a cochonilha de escama *Diaspis echinocacti* (Bouché) (GAVA; LOPES, 2012). As áreas cultivadas com variedade orelha de elefante vêm aumentando nos últimos anos, pois é considerada resistente à cochonilha do carmim (*D. opuntiae*), principal inseto praga da cultura (LIMA et al., 2013).

1.4. A fusariose da palma forrageira

No Brasil, as doenças da palma forrageira têm sido pouco estudadas e, quase todos os trabalhos descrevem apenas a sintomatologia e a patogenicidade dos agentes causais, sendo limitadas as informações quanto a prejuízos, intensidade das doenças e medidas efetivas de controle. Doenças de origem fúngicas são as mais importantes nesta cultura, podendo afetar cladódios, sistema radicular e frutos nas fases de pré e pós-colheita (BARBOSA et al., 2012). Dentre as podridões de raízes e de cladódios da base que ocorrem na palma forrageira destacam-se a podridão de fusário por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., (BARBOSA et al., 2012; SOUZA et al., 2010) e *Fusarium lunatum* (Ellis & Everhart) Arx, ela apresenta sintomas similares, independentemente do patógeno, porém pode ter leves variações dependendo da espécie do *Fusarium* spp., das variedades da cultura e das condições climáticas (FLORES-FLORES et al., 2013).

No Nordeste brasileiro a palma forrageira foi descrita em Pernambuco, principalmente nos estados de Pernambuco e Alagoas, Santos et al., (2006) relataram *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como fitopatógeno da palma forrageira. Possivelmente, ainda não foi relatada em outros estados por falta de estudos sobre doenças na cultura da palma forrageira. A podridão no cladódio da base é de consistência mole e coloração esverdeada, os cladódios primários e secundários murcham e tombam sobre a planta poucos dias após a infecção. Os tecidos do cladódio infectado tornam-se aquosos, escurecem e expõem as estruturas internas lenhosas, as raízes apodrecem, exibindo coloração marrom-avermelhada (SANTOS et al., 2006; BARBOSA et al., 2012). As cultivares de *N. cochenillifera* têm-se mostrado mais suscetíveis a fusariose (BARBOSA et al., 2012).

1.5. Caracterização do gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* foi descrito por Link (1809) e mais tarde tornou-se um nome reconhecido por Fries (1821), sendo baseado na espécie tipo *Fusarium sambucinum* Nirenberg (HYDE et al., 2014). É um dos gêneros mais importantes na fitopatologia mundial, tendo nos últimos anos adquirido também importância devido à produção de micotoxinas responsáveis por doenças em humanos e animais, além de algumas espécies serem responsáveis por infecções oportunistas, principalmente naquelas com deficiência imunológica (VENTURA, 2000).

Este fungo é classificado no Reino Eumycota, Filo Ascomycota, Classe Euascomycota, Ordem Hipocreales e Família Hypocreaceae (GODOY, COLOMBO, 2004). O gênero *Fusarium* possuem dois tipos de conídios: os macroconídios que são multicelulares uninucleado e microconídios unicelulares e uninucleados, na fase assexual. O modo de formação de macro e micronídios e a formação de clamidósporos constituem características importantes para a diferenciação de espécies de *Fusarium* sp. (VENTURA, 1999).

A diversidade filogenética do gênero *Fusarium* varia de 8 a 10 clados importantes patógenos na medicina e agricultura, esses divididos em 20 complexos de espécies (*F. sambucinum*; *F. chlamyosporum*; *F. incarnatum-equiseti*; *F. tricinctum*; *F. heterosporium*; *F. fujikuroi*; *F. nisikadoi*; *F. oxysporum*; *F. redolens*; *F. badinda*; *F. concolor*; *F. lateritium*; *F. buharicum*; *F. buxicola*; *F. staphyleae*; *F. solani*; *F. decemcellulare*; *F. albidum*; *F. dimerum*; *F. ventricosum*) (O'DONNELL et al., 2013). Mais de 1.500 espécies estão listadas no MycoBank e Leslie; Summerell (2006) documentaram 72 espécies (HYDE et al., 2014).

O gene recomendado e mais utilizado para identificação de espécies do gênero *Fusarium* é o gene fator de alongação da tradução 1 α (TEF), sendo utilizado para identificações de rotina, e consulta no banco de dados FUSARIUMID (<http://isolate.fusariumdb.org/>). Este banco de dados é similar ao GenBank, mas é baseado em sequências identificadas com precisão de culturas validadas em coleções de referência (GEISER et al. 2004).

O fungo sobrevive como sapróbio no solo ou na forma de clamidósporos. Pode ser disseminado por raquetes-sementes infectadas, vento, água e implementos agrícolas. Solos compactados, ácidos e com umidade e adubação orgânica excessiva proporcionam maior severidade da doença (BARBOSA et al., 2012).

1.6. Medidas de manejo de fusariose da palma forrageira

O controle mais efetivo da fusariose é evitar que o patógeno chegue na plantação, utilizando solo e plantas não infestados (GRANATA, 2001). Deve ser ressaltado que, não existem indicações de medidas efetivas de controle, exceto o plantio na época seca para evitar a podridão da raquete-semente (BARBOSA et al., 2012), remoção e destruição dos cladódios afetados (BARBOSA et al., 2012; SOUZA et al., 2010). No Brasil, não existem produtos químicos registrados para o controle de fusariose da palma forrageira (MAPA, 2017).

1.6.1. Biocontrole com leveduras

O controle biológico é utilizado, com o significado de controle de um patógeno por um antagonista (MARIANO et al., 2002). O termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais destas espécies fitopatogênicas, podendo estes antagonistas se adaptar ecologicamente ao mesmo nicho ocupados por fitopatógenos (MORANDI, 2009). Os microrganismos antagonistas surgiram como uma alternativa promissora aos fungicidas, sendo que esta alternativa tem recebido uma atenção crescente em estudos direcionados para controle e manejo de doenças (DROBY et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

O controle biológico raramente elimina o patógeno do local, mas reduz a população de propágulos e, conseqüentemente, a sua habilidade de produzir doença, o que é caracterizado por diferentes modos de atuação, tais como: competição por espaço e nutrientes, antibiose, parasitismo e indução de resistência em plantas (MORAES, CAPALBO, MORAES, 1991).

As leveduras constituem um grupo de microorganismos unicelulares pertencentes ao Reino Fungi que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por fissão binária. Possuindo célula eucariótica, são aclorofiladas e produzem esporos que são células especializadas. No entanto, ao contrário dos fungos filamentosos, elas não formam corpos de frutificação (KURTZMAN, FELL, 1998).

Algumas leveduras inibem fitopatógenos por apresentarem a atividade “killer”, que consiste na produção de toxinas extracelulares de composição glicolipídica ou glicoproteica com ação antifúngica ou fungistática sobre outras leveduras e/ou fungos filamentosos (GOLUBEV, 2006). E produção de metabólitos voláteis e ácidos que afetam o desenvolvimento de fungos através da ação fungicida ou fungistática (EL-TARABILY, SIVSITHAMPARAM, 2006).

A compreensão e identificação de leveduras e suas interações em agroecossistemas demonstra uma ferramenta importante para o controle biológico de doenças de plantas, melhorando desta forma, o uso de práticas inviáveis na promoção de uma agricultura mais sustentável (BOTHIA, 2011).

Fungos endofíticos biossintetizam substâncias conhecidas como metabólitos secundários de grande interesse para a indústria agroquímica e farmoquímica, que são usadas

como moléculas modelos para a descoberta e desenvolvimento de novos pesticidas e fármacos (VIEIRA et al., 2012). Alguns exemplos de biocontroladores ideias são algumas espécies de leveduras, que são eficazes contra uma vasta gama de agentes patogênicos, não produzem metabolitos perigosos para a saúde humana e quase não são afetadas pelos pesticidas (LIU et al., 2013).

O aproveitamento do potencial de microrganismos nativos para a supressão de doenças através da aplicação de estratégias tem sido meta para os fitopatologistas (MAZZOLA; FREILICH, 2017). O mecanismo de ação e identificação de leveduras envolvidas em interações entre espécies hospedeiras e não hospedeiras no agroecossistemas é uma etapa crucial para o uso eficiente do controle biológico no combate a fitopatógenos e conseqüentemente, promover uma agricultura mais sustentável e ecologicamente viável (BOTH, 2011).

O potencial antagônico das leveduras foi verificado pela primeira vez nos anos 80, onde foi constatada a redução do crescimento e esporulação de alguns fitopatógenos (PUNJA, UTKHEDE, 2003). Entre os gêneros mais citados no biocontrole encontram-se *Candida* (Cif e Redaelli), *Saccharomyces* (Meyen) e *Rhodotorula* (F. C. Harrison). Um dos principais fatores que leva a utilização de leveduras como agentes de biocontrole é a baixa possibilidade toxigênica deste grupo, não tendo sido relatado casos de micotoxicose (COELHO, HOFFMANN, HIROOKA, 2003). A produção de diversas enzimas por organismos antagonistas é investigada por diversos autores como estando relacionada à eficiência exercida no controle de fitopatógenos (SARAVANAKUMAR, et al., 2009).

Existindo vários produtos comerciais derivados de levedura para o controle biológico de agentes patogênicos (DROBY et al., 2009). As espécies de levedura como *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud; *Cryptococcus albidus* (Saito) C. E. Skinner, *Metschnikowia fructicola* Kurtzman e Droby, *Candida oleophila* Montrocher isolado O, tem sido recomendados para o controle de fungos, na forma de seus respectivos produtos comerciais: Boni protect[®], Yield plus[®], Shemer[®] e Nexy[®], tem sido recomendados para o controle de infestações das espécies de fungos com *Botrytis cinerea* Pers., *B. cinerea* e *Penicillium expansum* Link, *P. digitatum* (Pers.) Sacc., *P. italicum* Wehmer, *P. expansum*, *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Aspergillus niger* Tiegh., *Fusarium* sp. e *Sclerotinia sclerotium* respectivamente, em pós colheita (HAISSAM, 2011).

É previsto que a quota do mercado representando microrganismos promotores do crescimento de plantas, agentes de biocontrole e estimulantes da resistência das plantas, chegue a 437,1 milhões de dólares até 2020 e o crescimento do mercado será impulsionado predominantemente pelo aumento da produção agrícola dependente de práticas de agricultura biológica (MAZZOLA; FREILICH, 2017).

1.6.2. Controle genético com cultivares resistentes

Resistência refere-se à habilidade da planta hospedeira em suprimir ou retardar a atividade de um patógeno. É uma característica herdada geneticamente e pode ser influenciada pela predisposição ou pela idade da planta (ZAMBOLIM, 2006). O nível de resistência da planta a patógeno variam na natureza, de imune a suscetível (FRY, 1982). No controle de doenças vegetais representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. E sua utilização deveria ser preferida simplesmente por ser barata e de fácil utilização (GURURANI, 2012).

O plantio de cultivares resistente é um dos mais eficientes meios de controle de doenças de plantas, além de não demandar gasto extra com produtos, principalmente para os patógenos denominados de parasitas obrigatórios e para os sapróbios facultativos (ZAMBOLIM, 2006). O passo inicial para elaboração de um programa de melhoramento é a identificação do germoplasma vegetal que fornecerá os genes de resistência (NUEZ et al., 2004). Dando-se prioridade elevada ao teste das coleções de germoplasma (FELKER et al., 2002).

Os genótipos de *O. ficus indica* são muitos estudados fora do Brasil, como diversas fontes de vários componentes como: ácido ascórbico e betalaínas, muito interessantes para o consumo humano (NADIA et al., 2013), resistência a frio (FELKER et al., 2008), está mais adaptado para enfrentar seca devido ao seu mecanismo bioquímico e fisiológico que é aparente pela presença de espinhos e a alta quantidade de polifenóis, sendo boa fonte de antioxidante natural (BOUTAKIOU et al., 2017), seus cladódios têm uma maior atividade antioxidante e maior teor de polifenóis que outros gêneros (BOUTAKIOU et al., 2015). Transformações genéticas também estão sendo testadas, transportando novos genes úteis, que são difíceis nos programas clássicos de melhoramento genético (SILOS-ESPINO et al., 2006).

No Brasil, o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) são pioneiros nas pesquisas dessa planta forrageira, atuando

na região Nordeste desde 1958 (SANTOS et al., 2006; SIMÕES; SANTOS, DIAS, 2005), e no melhoramento genético desde o final da década de 1980 (SANTOS et al., 2005). A primeira cultivar, Gigante, foi lançada em 1998. O IPA possui um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) com mais de 1000 acessos e um programa de melhoramento focado na ampliação da base genética da palma forrageira, através de cruzamentos dirigidos (SANTOS et al., 1999) e introdução de materiais de diversos países, como México, EUA, África do Sul, Argélia, Chile entre outros (SANTOS et al., 2006). Esse programa de pesquisa é essencial para o desenvolvimento da agricultura sustentável no Nordeste. (MERGULHÃO et al., 2012).

Embora haja poucos materiais no mercado, os clones mais difundidos foram selecionados por vigor, sendo, portanto, heterozigotos. O melhoramento pode aproveitar a variabilidade escondida através da segregação desses materiais via sexual (SANTOS et al., 2005) e também por cruzamentos dirigidos. De acordo com Menezes et al. (2005) o potencial da palma forrageira ainda não tem o seu devido reconhecimento.

2. Referências bibliográficas

BARBERA, G. **História e importância econômica e agroecológica.** In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira.** Roma/Brasília: FAO/Sebrae, 2001.p. 1-11.

BARBOSA, R. S.; CALVALCANTI, V. A. L.; LOPES, E. B.; ARAÚJO, E. **Doenças da palma forrageira.** In: LOPES, E. B. **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino.** João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 81-98.

BARRIOS, E. P.; MUÑOZ-URÍAS, A. **Domesticação das opuntias e variedades cultivadas.** In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira.** Roma/Brasília: FAO/Sebrae, 2001. p. 58-64.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry.** Oxford, v. 43, n.1, p.1-8, 2011.

BOUTAKIOUT, A.; ELOTHMANI, D.; HANINE, H.; MAHROUZ, M.; LE MEURLAY, D.; HMID, I.; ENNAHLI, S. Effects of different harvesting seasons on antioxidant activity and phenolic content of prickly pear cladode juice. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, xxx–xxx, 2017. (article in press)

- BOUTAKIOUT, A.; ELOTHMANI, D.; MAHROUZ, M.; HANINE, H. Effect of season on proximate composition of cladode juice of two species of cactaceae. **International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Reserch**, New Delhi, v. 3, n. 1, p. 3:1-8, 2015.
- CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semiárido baiano. **Bahia Agrícola**, Bahia, v.7, n.3, p. 39-49, 2006.
- COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, Teresina, v. 24, n. 2, p. 337-358, 2003.
- COUTINHO, M. J. F.; CARNEIRO, M. S. S.; EDVAN. R. L.; PINTO, A. P. A pecuária como atividade estabilizadora no Semiárido Brasileiro. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.20, n.3, p. 9-17, 2013.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology Technology**, Leuven, v. 52, n. 2, p. 137-145, 2009.
- EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 25-35, 2006.
- FELKER, P.; SOULIERW, C.; LEGUIZAMONW, G.; OCHOA, J. A comparison of the fruit parameters of 12 *Opuntia* clones grown in Argentina and the United States. **Journal of Arid Environments**, London, v. 52, n. 3, p. 361–370, 2002.
- FELKER, P.; STINTZING, F. C.; MUSSIG, E.; LEITENBERGER, M.; CARLE, R.; VOGT, T.; BUNCH, R. Colour inheritance in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits. **Annals of Applied Biology**, Stratford, v. 152, n. 3, p. 307–318, 2008.
- FIGUEREDO, V. S.; SILVA, E. C. da.; GOMES FILHO, M. F. Sustentabilidade ambiental para o semiárido Paraibano: á busca de estratégias para o Município de Juazeirinho-PB. In: XVI Encontro Nacional dos geógrafos. Crise, práxis e autonomia: espaços de resistência e de

esperanças Espaço de Diálogos e Práticas, 2010, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: Associação dos geógrafos brasileiros, 2010. v.1, p. 1-11.

FLORES-FLORES, R.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; LÉON-RODRIGUEZ, L.; FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; HERNÁNDEZ-LAUZUARDO, A. N. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 161, n. 7-8, p. 544–552, 2013.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Yearbook**. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook>>. Acesso em 22 de maio de 2017.

FRY, W. E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, n. 1, p. 1650-1655, 1978.

GAVA, C. A. T.; LOPES, E. B. Produção de mudas de palma forrageira utilizando fragmentos de cladódios. **Instruções Técnicas Embrapa Semiárido**. Petrolina, folhetos 101, 2012, pág. 1-2.

GEISER, D. M.; JIMENEZ-GASCO, M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht. v. 110, n. 5-6, p. 473–479, 2004.

GODOY, P.; COLOMBO, A. L. Biologia e relevância clínica das espécies do gênero *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, São Paulo, v. 11, n. 34, p. 136-140, 2004.

GOLUBEV, W. I. **Antagonistic interactions among yeasts**. In: ROSA, C.A.; PÉTER, G. **The yeastes handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Spring-Verlag, p.198-219, 2006.

GRANATA, G. Doenças bióticas e abióticas. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma/Brasília: FAO/Sebrae, 2001. p. 112-122.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. Plant disease resistance genes: current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 78, n. 1, p. 51-65, 2012.

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

HOFFMANN, W. **Etnobotânica**. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E. Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira. Roma/Brasília: FAO/Sebrae, 2001. p. 12-19.

HYDE, K. D.; NILSSON, R. H.; ALIAS, S. A.; ARIYAWANSA, H. A.; BLAIR, J. E.; CAI, L.; DE COCK, A.; DISSANAYAKE, A. J.; GLOCKLING, S. L.; GOONASEKARA, I. D.; GORCZAK, M.; HAHN, M.; JAYAWARDENA, R. S.; AL VAN KAN, J.; LAURENCE, M. H.; LÉVESQUE, C. A.; LI, X.; LIU, J-K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; MANAMGODA, D. S.; MARTIN, F. N.; MCKENZIE, E. H. C.; MCTAGGART, A. R.; MORTIMER, P. E.; NAIR, P. V. R.; PAWŁOWSKA, J.; RINTOUL, T. L.; SHIVAS, R. G.; SPIES, C. F. J.; SUMMERELL, B. A.; TAYLOR, P. W. J.; TERHEM, R. B.; UDAYANGA, D.; VAGHEFI, N.; WALTHER, G.; WILK, M.; WRZOSEK, M.; XU, J.C.; YAN, J.; ZHOU, N. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic general: **Fungal Diversity**, Kunming, v. 67, n. 1, p. 21–125, 2014.

IBGE - **SIDRA**: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 06 jul. 2017.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a taxonomic study**. 4^a. Ed. Amsterdam: Elsevier, 1998, 1055 p.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Editora Blackwell Publishing, Iowa, 2006, 388p.

LIMA, I. M. M.; GAMA, N. S. Registro de plantas hospedeiras (*cactaceae*) e de nova forma de disseminação de *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemíptera: *Diaspididae*), cochonilha-da-

palma-forrageira, nos estudos de Pernambuco e Alagoas. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.3, p. 479-481, 2001.

LIMA, N. C. Avaliação de unidades demonstrativas de palma forrageira (*Nopalea* e *Opuntia*) no estado de Pernambuco. 2013. 75f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 153-160, 2013.

LOPES, E. B.; SANTOS, D. C. E.; VASCONCELOS, M. F. **Cultivo da palma forrageira**. In: LOPES, E. B. **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 21-60.

MAJURE, L. C.; PUENTE, R.; GRIFFITH, M. P.; JUDD, W. S.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Phylogeny of *Opuntia* s. s. (*Cactaceae*): clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 99, n. 5, p. 847-864, 2012.

MAPA. **AGROFIT** - Sistema de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 jun. 2017.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOME, A. M. A. **Controle Biológico de Doenças Radiculares**. In MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M. **Ecologia de Patógenos radiculares**. Recife: UFRPE, Imprensa Unversitária, 2002, p.3-7.

MAZZOLA, M.; FREILICH, S. Prospects for Biological Soilborne Disease Control: Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, n.3, p. 256-263, 2017.

MÉNDEZ-GALLEGOS, S. J.; TALAVERA-MAGANÃ, D.; GARCÍA-HERRERA, E. J. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. **Revista Salud Publica y Nutricion**, Monterrey, v. 2, n. 14, p. 2–13, 2009.

MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEO, I. H.; SOUZA, F. J. **Produtividade de palma em propriedades rurais**. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 129-142, 2005.

MERGULHÃO, A. C. E. S.; RITO, K. F.; CORDEIRO, D. S.; SILVA, M. L. R. B.; LYRA, M. C. C. P.; SILVA, M. V. Marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 17, n. 1, p. 78-82, 2012.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M.; MORAES, R. O. **Multiplicação de agentes de controle biológico**. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 7-23.

MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BETTIOL, W. TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, 2009.

MURILO, S. S. A. A região semiárida do Nordeste do Brasil: Questões Ambientais e Possibilidades de uso Sustentável dos Recursos. **Rios Eletrônica- Revista Científica da FASETE**, Paulo Afonso, v. 5, n. 5, p. 89-98 , 2011.

NADIA, C.; HAYETTE, L.; SAFIA, M.; YASMINA, M.; YASMINA, H.; ABDEREZAK, T. Physico-chemical characterisation and antioxidant activity of some *Opuntia ficus-indica* varieties grown in North Algeria. **African Journal of Biotechnology**, Ebène, v. 12, n., p. 299-307, 2013.

NUEZ, F.; PÉREZ DE LA VEJA, M.; CARRILLO, J. M. **Resistencia genética a patógenos vegetales**. Valencia: Editorial de la Universidade Politècnica de Valencia, 2004. 568p.

NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde**, Mossoró, v.6, n.1, p. 58 – 66, 2011.

O'DONNELL, K.; ROONEY, A. P.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; MCCORMICK, S. P.; WARD, T. J.; FRANDSEN, R. J. N.; LYSØE, E.; REHNER, S. A.; AOKI, T.; ROBERT, V. A. R. G.; CROUS, P. W.; KANG, S.; GEISER, D. M. RPB1 and RPB2 phylogeny supports an early Cretaceous origin and a strongly supported clade comprising all

agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 52, n. 1, p. 20–31, 2013.

OLIVEIRA, E. A.; JUNQUEIRA, S. F.; MASCARENHAS, R. J. Caracterização físico-química e nutricional do fruto da palma (*Opuntia ficus indica* L. Mill) cultivada no sertão do sub-médio São Francisco. **Holos**, Natal, v.3, n.27, p. 113-119, 2011.

OLIVEIRA, F. T.; SOUTO, J. S.; SILVA, R. P.; FILHO, F. C. A.; JÚNIOR, E. B. F. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n.4, p. 27-37, 2010.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trend in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, n., p. 400-407, 2003.

REBMAN, J. P.; PINKAVA, D. J. *Opuntia* cacti of North America – an overview. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, n. 4, p. 474-483, 2001.

REYES-AGUERO, J. A.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; HERNÁNDEZ, H. M. Notas sistemáticas y descripción detallada de *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. (*Cactaceae*). **Agrociencia**, Texcoco, v. 39, n. 3, p. 395-408, 2005.

RUSSEL, C. E.; FELKER, P. The prickly-pears (*Opuntia* spp., *Cactaceae*): a source of human and animal food in semiarid regions. **Economic Botany**, Bronx, n.41, v. 3, p. 433-445, 1987.

SAMPAIO, E. V. S. B. **Fisiologia da palma**. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. p. 43-56.

SANTOS, D. C. dos; LIRA, M. de A.; DIAS, F. M. **Melhoramento genético da palma forrageira**. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. p. 27-42.

SANTOS, D. C. dos; LIRA, M. de A.; FARIAS, I.; SANTOS, M. V. F dos. **Programa de melhoramento e coleção de palma forrageira**. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste**

brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

SANTOS, D. C. E.; ARAÚJO, L. F.; LOPES, E. B.; VASCONCELOS, M. F. **Usos e aplicações da palma forrageira**. In: LOPES, E. B. **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 99-150.

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARRUDA, G. P.; COELHO, R. S. B.; DIAS, F. M.; MELO, J. N. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006, 48p.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essencial oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Frest. **Phytochemistry**, New York, v. 58, n. 4, p. 547-551, 2001.

SARAVANAKUMAR, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.123, n. 2, p.183-193, 2009.

SEBRAE-PE. Projeto palma cadeia produtiva de alimentação tecnologia de adensamento. Recife – FAEPE, 2003, 31p.

SILOS-ESPINO, H.; VALDEZ-ORTIZ, A.; RSACÓN-CRUZ, Q.; ROCRÍGUEZ-SALAZAR, E.; PAREDES-LÓPEZ, O. Genetic transformation of prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, n. 3, p. 397–403, 2006.

SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus- Indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, Itapetinga, v. 7, n. 10, p. 1-13, 2006.

SIMÕES, D. A.; SANTOS, D. C.; DIAS, F. M. **Introdução da palma forrageira no Brasil**. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Recife: Editora da Universitária da UFPE, 2005. 258 p.

SNYMAN, H. A. A greenhouse study on root dynamics of cactus pears, *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia robusta*. **Journal of Arid Environments**, London, v. 65, n. 4, p. 529-542, 2006.

SOUZA, A. E. F.; NASCIMENTO, L. C.; ARAÚJO, E.; LOPES, E. B.; SOUTO, F. M. Ocorrência e identificação de agentes etiológicos de doenças de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Biotemas**, Florianópolis, n. 23, v. 3, p. 11-20, 2010.

SWART, W. J. Strategies for the management of cactus pear diseases: a global perspective. **Acta Horticulturae**, Holanda, v. 811, n. 1, p. 207–216, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II - Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 303-338, 2000.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I – História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Porto Alegre, v. 7, p. 271-297, 1999.

VIEIRA, M.L.A.; HUGHES, A.F.S.; GIL, V.B.; VAZ, A.B.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, n. 1, p. 54-66, 2012.

ZAMBOLIM, L. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior - ABEAS **Princípios de Fitopatologia**. Viçosa, UFV; 2006. 100p.: il (ABEAS. Curso Proteção de Plantas. Módulo 5).

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. **Biological Control**, Orlando, v. 54, p. 172-180, 2010.

CAPÍTULO 2

**LEVEDURAS NATIVAS, UMA NOVA OPÇÃO NO BIOCONTROLE DE
FUSARIOSE EM PALMA FORRAGEIRA**

1 **Leveduras nativas, uma nova opção no biocontrole da fusariose em palma forrageira**

2 Michele Freitas Santiago⁽¹⁾, Alice Maria Gonçalves Santos⁽²⁾, Iwanne Lima Coelho⁽¹⁾, Tarcio
3 Tomé da Silva⁽³⁾, Cicero Pinheiro Inácio⁽⁴⁾, Amaro de Castro Lira Neto⁽⁵⁾, Domingos Eduardo
4 Guimarães Tavares de Andrade⁽⁵⁾, Djalma Cordeiro dos Santos⁽⁵⁾, Rejane Pereira Neves⁽⁴⁾,
5 Tereza Cristina de Assis⁽⁵⁾ e Delson Laranjeira⁽¹⁾

6 Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Laboratório de Fungos do solo -
7 LAFSOL, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email: miccafs@hotmail.com,
8 iwannecoelho@gmail.com, delson.laranjeira@ufrpe.br⁽¹⁾

9 Universidade Federal do Piauí - UFPI, CEP 64900-000, Bom Jesus, PI. Email:
10 alicemgsantos@yahoo.com.br⁽²⁾

11 Universidade de Pernambuco - UPE, CEP 50100-010, Recife, PE. Email:
12 tarciotome@live.com⁽³⁾

13 Universidade Federal de Pernambuco– UFPE, CEP: 50670-420, Recife, PE. Email:
14 ciceropinheiro2000@hotmail.com, rejadel@yahoo.com.br⁽⁴⁾

15 Instituto agrônômico de Pernambuco - IPA, CEP 50761-000, Recife, PE. Email:
16 amarocastro@gmail.com, domingos.andrade@ipa.br, djalma.cordeiro@ipa.br,
17 cristiana.assis@ipa.br⁽⁵⁾

18 **Resumo** - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de biocontrole com leveduras na
19 proteção de cladódios de palma forrageira contra fusariose. Foram realizados testes de
20 biocontrole em cladódios destacados (*in vivo*), detecção da atividade antifúngica por
21 compostos difusíveis, determinação do potencial produtor de compostos voláteis com ação
22 antifúngica, toxinas *Killer* e formação de biofilme (*in vitro*). A porcentagem inibição da
23 severidade da doença variou em *Fusarium oxysporum* de 57 à 23,73 % e *F. equiseti* 72,32 à
24 31,29 %. Na detecção da atividade antifúngica por compostos difusíveis variou de *F.*
25 *oxysporum* 100 à 26,93 %, *F. equiseti* 100 à 26,31 %. A determinação do potencial produtor

26 de compostos voláteis com ação antifúngica variou de *F. oxysporum* 21,42 à 4,12 %, *F.*
27 *equiseti* de 19,16 à 4,30 %. A atividade *killer* foi constatada em 100% dos isolados de
28 leveduras. O melhor período para avaliação da formação do biofilme foi às 72h e se
29 sobressaíram os isolados L9, L37 e L38. Este estudo é o primeiro levantamento de leveduras
30 endofíticas associadas à *Nopalea cochenilifera*, e nossos resultados mostram que essas
31 leveduras representam uma fonte promissora de compostos bioativos com ação antifúngica.

32 **Termos para indexação:** Controle biológico; Doenças de plantas; *Fusarium oxysporum*;
33 *Fusarium equiseti*; Leveduras; *Nopalea cochenilifera*.

34 **Native yeasts, a new option in the biocontrol of fusariosis in prickly pear cactus**

35 **Abstrat** - The objective of this work was to evaluate the effect of biocontrol with yeasts in the
36 protection of prickly pear cactus cladodes against fusariosis. Biocontrol tests were performed
37 in cladodes (*in vivo*), detection of the antifungal activity by diffusible compounds,
38 determination of the potential producer of volatile compounds with antifungal action, toxins
39 *Killer* and biofilm formation (*in vitro*). The percentage inhibition of disease severity varied in
40 *Fusarium oxysporum* from 57 to 23.73% and *F. equiseti* 72.32 to 31.29%. In the detection of
41 antifungal activity by diffusible compounds ranged from *F. oxysporum* 100 to 26.93%, *F.*
42 *equiseti* 100 to 26.31%. The determination of the potential producer of volatile compounds
43 with antifungal action ranged from *F. oxysporum* 21.42 to 4.12%, *F. equiseti* from 19.16 to
44 4.30%. The *killer* activity was observed in 100% of yeast isolates. The best period to evaluate
45 biofilm formation was at 72 hours and the L9, L37 and L38 isolates were prominent. This
46 study is the first survey of endophytic yeasts associated with *Nopalea cochenilifera*, and our
47 results show that these yeasts may represent a promising source of bioactive compounds with
48 antifungal action.

49 **Index terms:** biological control; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium equiseti*; plant diseases;
50 *Nopalea cochenilifera*; yeasts.

51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75

Introdução

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck) é originada do México (Nunes, 2011), aparece como uma alternativa de cultivo, adaptada ao clima do semiárido, dotada de um mecanismo fisiológico especial, metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) no que se refere à absorção, aproveitamento da perda de água (Santos et al., 2012). Nos últimos anos, a palma forrageira voltou a ser cultivada em larga escala pelos criadores das bacias leiteiras, sobretudo nos estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Rio Grande do Norte e Bahia, (Oliveira et al., 2011).

A palma forrageira, além de ser uma alternativa para a alimentação dos animais durante o período de estiagem, também é uma alternativa eficaz para combater a fome e a desnutrição no semiárido nordestino, (Nunes, 2011). As medidas de controle mais efetivas para as doenças da palma forrageira envolvem o uso de cladódios sementes sadios e plantio em solos não infestados pelo fungo (Barbosa et al., 2012).

No Brasil, não existem fungicidas registrados para o controle da fusariose da palma forrageira (MAPA, 2017). Também desconhecemos estudos sobre controle biológico para esse patógeno. Em face ao exposto, o controle biológico com microrganismos antagonistas surgiu como uma alternativa promissora aos fungicidas no controle de doenças (Zhang et al., 2010). Alguns exemplos de biocontroladores ideias são algumas espécies de leveduras, que são eficazes contra uma vasta gama de agentes patogênicos, não produzem metabolitos danosos para a saúde humana e quase não são afetadas pelos agrotóxicos (Liu et al., 2013).

Prevê-se que a quota do mercado representando microrganismos promotores do crescimento de plantas, agentes de biocontrole e estimulantes da resistência das plantas, chegue a 437,1 milhões de dólares até 2020 e o crescimento do mercado será impulsionado predominantemente pelo aumento da produção agrícola dependente de práticas de agricultura biológica (Mazzola & Freilich, 2017).

76 Apesar da importância da cultura da palma forrageira para o Nordeste e a falta de fungicidas
77 registrados no Brasil para o controle da doença na cultura, há necessidade de mais estudos que
78 leve a descoberta de novas estratégias de manejo da fusariose na palma forrageira. Diante
79 disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia do biocontrole com leveduras
80 em palma forrageira.

81 **Material e Métodos**

82 Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Instituto Agrônomo
83 de Pernambuco (IPA), situado em Recife, Pernambuco. Foram utilizados cladódios terciários
84 sadios, com aproximadamente seis meses, colhidos de plantas com dois anos de idade de *N.*
85 *cochenillifera*. A escolha dessa espécie deve-se ao fato de ser a mais cultivada, ser resistente à
86 cochonilha do carmim e uma das cultivares recomendada pelo IPA para o estado Pernambuco.
87 Os sete isolados de leveduras nativas da palma forrageira foram coletados nas cidades de
88 Lagoa do Carro (L9 *Cystobasidium slooffiae* (E.K. Novák&Vörös-Felkai and L37 *Cyrenella*
89 *elegans* Goch.) Região Zona da Mata Norte e Arcoverde (L12 *Candida carpophila* (Phaff&
90 M.W. Mill.), L17 *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison, L26 e L27
91 *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud and L38 *Debaryomyces hansenii* (Zopf)
92 Lodder & Kreger) Região do Sertão de Pernambuco. A identificação dos isolados de
93 leveduras foram à nível de espécie através de caracterização molecular, pelo sequenciamento
94 da região genômica LSU (28S) do domínio D1/D2 do rDNA. Foram realizadas reações de
95 PCR com primers NL1 e NL4 como descrito Gallardo et al. (2014).
96 Os quatro isolados fúngicos (F1 e F5 *Fusarium oxysporum* Schltdl., F20 e F32 *Fusarium*
97 *equiseti* (Corda) Sacc. foram coletados em palmas forrageiras procedentes dos municípios de
98 Arcoverde (F1 e F32), Surubim (F5) e Ibimirim (F20), Arcoverde e Ibimirim pertencentes à
99 Região do Sertão e Surubim a Região do Agreste, PE. Todos patogênicos e com diferentes
100 combinações de agressividade, e representando dois complexos distintos: Complexo

101 *Fusarium oxysporum* e Complexo *Fusarium incarnatum-equiseti*. O gênero *Fusarium* foi
102 identificado quanto a morfologia, de acordo as descrições feitas por Leslie & Summerell
103 (2006) e molecularmente (Liu et al., 1999; O'Donnell et al., 2008). Todos os isolados
104 utilizados neste estudo estão estocados na Universidade Federal de Pernambuco na Micoteca
105 Coleção de Culturas URM / UFPE (www.ufpe.br/micoteca).

106 Para o teste de biocontrole *in vivo* foram utilizados cladódios sadios de palma forrageira,
107 foram lavados com água corrente, desinfestados superficialmente pela imersão em solução de
108 álcool etílico 70% (v/v), durante 1 a 3 min., NaOCl 2% por 10 min., lavados por mais duas
109 vezes em água destilada e secos naturalmente. Cada levedura foi pulverizada sobre os
110 cladódios de palma forrageira na concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹. Após 48h de incubação, cada
111 cladódio foi dividido em quatro quadrantes, e realizou-se um fermento (5 x 2 mm), com o
112 auxílio de um perfurador flambando e nesse orifício foi depositado um disco de batata -
113 dextrose - ágar (BDA) contendo estruturas do patógeno, de mesmo tamanho. Nos cladódios
114 utilizados como controle negativo foram depositados nos fermentos um disco contendo meio
115 BDA. Após a inoculação os cladódios foram mantidos à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$
116 em sala de incubação, durante 72 horas em câmara úmida utilizando bandejas plásticas
117 umedecidas com água destilada esterilizada (ADE) e cobertas com sacos plásticos pretos
118 pulverizados internamente com ADE. A severidade da doença foi avaliada aos sete dias
119 (tempo suficiente para desenvolvimento da doença). As imagens da lesão foram tiradas com
120 câmera digital e a área da lesão (cm²), medida utilizando-se o programa ASSESS 2.0® (APS).
121 Após sete dias experimentais as porcentagens de inibição (PI%) foram calculadas de acordo a
122 fórmula: $PI\% = [(A - B) / A] \times 100$ onde, PI% = porcentagem de inibição da lesão, A =
123 diâmetro médio do crescimento da lesão no controle positivo, B = crescimento médio de
124 diâmetro de lesão num dado tratamento.

125 Para o teste de detecção da atividade antifúngica por compostos difusíveis foram avaliadas
126 através do cultivo pareado entre os quatro isolados (F1 e F5 *F. oxysporum*, F20 e F32 *F.*
127 *equiseti*) e os sete isolados de levedura (L9 *C. slooffiae*, L12 *C. carpophila*, L17 *R.*
128 *mucilaginosa*, L26 e L27 *A. pullulans*, L37 *C. elegans* e L38 *D. hansenii*). Os isolados de
129 levedura foram diluídos e quantificados por espectrofotometria 540 nm com 0,2 de
130 absorvância representando 10^7 UFC.mL⁻¹, ajustado por curva de calibração com equação:
131 $y=80000000Xx-3000000$, sendo: y o resultado do número de esporos e x o valor de
132 absorvância. Com o auxílio de uma alça de Drigalsk, as leveduras foram semeadas na
133 superfície de placas de Petri contendo meio BDA. No centro da placa foram colocados os
134 discos (5 x 2 mm) de meio de cultura contendo estruturas fúngicas dos patógenos, retirados da
135 região periférica do isolado em crescimento. As placas foram incubadas por cinco dias à
136 temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em câmara de crescimento e avaliadas quanto à inibição do
137 crescimento micelial, através da mensuração do diâmetro da colônia. O diâmetro da colônia
138 foi avaliado com paquímetro em duas medidas ortogonais. O controle positivo consistiu de
139 placas contendo meio de cultura BDA contendo estruturas do patógeno. Aos cinco dias
140 quando o crescimento do patógeno no controle positivo alcançou os bordos das placas, as
141 porcentagens de inibição (PI%) foram calculadas.

142 Para a determinação de compostos voláteis com ação antifúngica foi utilizada a técnica de
143 cultivo em placas de Petri descartáveis e bipartidas. Para evitar que exsudados produzidos
144 pela levedura se difundissem através do meio de cultura (Nutaratat et al., 2014). O confronto
145 foi realizado entre os sete isolados de leveduras (L9 *C. slooffiae*, L12 *C. carpophila*, L17 *R.*
146 *mucilaginosa*, L26 e L27 *A. pullulans*, L37 *C. elegans* e L38 *D. hansenii*) e os quatro isolados
147 do patógeno (F1 e F5 *F. oxysporum*, F20 e F32 *F. equiseti*). Em um dos setores da placa de
148 Petri foram realizadas estrias contínuas com os isolados de levedura em meio de cultura
149 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e no outro setor, foram depositados ao centro, um disco

150 (5mm ϕ) contendo estruturas fúngicas do patógeno em meio BDA. As placas foram incubadas
151 por cinco dias à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em câmara de crescimento. Quando o crescimento
152 do patógeno no controle positivo alcançou os bordos das placas, as porcentagens de inibição
153 do crescimento micelial (PI%), foram avaliadas.

154 Para a determinação da atividade *killer* as sete leveduras (L9 *C. slooffiae*, L12 *C. carpophila*,
155 L17 *R. mucilaginosa*, L26 e L27 *A. pullulans*, L37 *C. elegans* e L38 *D. hansenii*) foram
156 cultivadas em meio SDA por 72 horas, com posterior avaliação em meio yeast extract peptone
157 dextrose (YEPD) tamponado e acrescido de azul de metileno 0,005%. Para a realização do
158 teste, foram utilizados dois isolados padrões de leveduras, sendo um sensível a toxina *killer*
159 (isolado 14 206 *Candida glabrata* (H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow (1×10^7 células ml^{-1}))
160 e um isolado produtor da toxina (isolado 343 *C. glabrata*). Todos os isolados foram diluídos
161 em solução salina a 0,85%. Com o auxílio de uma alça de Drigalsk, em placa de Petri com
162 meio YEPD + 0,005% azul de metileno. No centro da placa colocou-se o isolado 343. As sete
163 leveduras testadas foram colocadas em posições equidistantes da placa de Petri. As avaliações
164 foram realizadas visualmente, 24 e 48 horas após inoculação, sendo considerada a presença do
165 fenótipo *killer* (K +) pela formação de uma zona clara de inibição em volta da colônia, onde
166 não houve crescimento da levedura sensível, delimitada por um halo adjacente de células
167 coradas em azul que evidencia morte celular e é indicativo de atividade *killer*.

168 Para a determinação do biofilme os isolados de leveduras (L9 *C. slooffiae*, L12 *C. carpophila*,
169 L17 *R. mucilaginosa*, L26 e L27 *A. pullulans*, L37 *C. elegans* e L38 *D. hansenii*) foram
170 mantidas overnight a 28°C em meio de cultura yeast nitrogen base (YNB) suplementado com
171 glicose a 100 mM. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes com solução salina
172 tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) e ressuspensas em YNB + 100 mM de glicose para
173 concentração final 10^7 UFC. mL^{-1} . Alíquotas (100 μL) foram colocadas em quadruplicada em
174 poços de uma placa de poliestireno de 96 poços e incubadas durante 3 h a 28°C e mantidas

175 sob agitação a 75 rpm. No controle negativo não se utilizaram leveduras. Após a fase de
176 adesão, cada poço foi lavado duas vezes com 150 µL de PBS e adicionado a esses poços 100
177 µL de YNB. As placas foram incubadas a 28 °C a 75 rpm durante 24, 48 e 72 h. O meio foi
178 reabastecido diariamente e todos os ensaios foram realizados duas vezes.

179 Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS e corados com 100µL de
180 solução aquosa de cristal violeta a 0,4% durante 45 min. Posteriormente, os poços foram
181 lavados quatro vezes com ADE e acrescentados 200 µL de etanol a 95%. Após 45 minutos,
182 transferiram-se 100 µl do etanol para uma nova placa e sendo medida quantidade de cristal
183 violeta na solução a 550 nm, ajustado por curva de calibração com equação: $y = 56,423 x -$
184 $0,0025$; em que y = valores de absorbância a 550 nm e x = concentração de cristal violeta.

185 O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em arranjo fatorial com dois fatores,
186 sendo cada fator composto pelas combinações das sete isolados de leveduras x quatro isolados
187 de *Fusarium* spp. (tratamentos), com três repetições (cladódio) *in vivo* sendo cada repetição
188 representada por quatro unidades amostrais (lesão) e cinco repetições (placas de Petri) *in*
189 *vitro*. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo
190 teste Scott Knott ($P > 0,05$), utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 (Silva & Azevedo,
191 2016).

192 **Resultados e Discussão**

193 Dos sete isolados de leveduras endofíticas, nativas da palma forrageira, testados (L9; L12;
194 L17; L26; L27; L37 e L38) todos reduziram significativamente o desenvolvimento da lesão
195 em cladódio de palma forrageira destacados após sete dias de incubação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

196 A porcentagem de inibição de lesão de fusariose no teste de biocontrole *in vivo* foi reduzida
197 nos sete isolados de leveduras testados, sendo as PI% mais eficientes para: *F. oxysporum*
198 isolado (F1) foi de (L26) 57, (L12) 50,73, (L9) 48,8 e (L17) 46,35%, *F. oxysporum* isolado
199 (F5) foi de (L17) 46,69, (L26) 44,28, (L38) 41,73, (L37) 41,05, (L27) 40,46%, *F. equiseti*

200 (F20) foi de (L9) 62,98 e (L12) 50,82%, *F. equiseti* (F32) foi de (L12) 72,32, (L38) 72,09,
201 (L37) 70,72, (L9) 66,29, (L27) 62,27 e (L17) 60,55%, respectivamente (Tabela 1).

202 Para o teste de detecção da atividade antifúngica por compostos difusíveis *in vitro* sendo as
203 PI% mais eficientes para: *F. oxysporum* isolado (F1) foi de (L12) 100, *F. oxysporum* isolado
204 (F5) foi de (L27) 81,85 e (L26) 77,34, *F. equiseti* (F20) foi de (L12) 80,91, *F. equiseti* (F32)
205 foi de (L26 e 27) 100%, respectivamente (Tabela 2).

206 A porcentagem de inibição de *Fusarium* spp. por compostos voláteis foi reduzida pelos sete
207 isolados de leveduras testados, sendo as PI% mais eficientes para: *F. oxysporum* isolado (F1)
208 foi de (todos os isolados) variando de 21,42 a 10,27%, *F. oxysporum* isolado (F5) foi de (L17)
209 16,46, (L26) 16,11, (L37) 13,04 e (L12) 11,23%, *F. equiseti* (F20) foi de (L38) 19,16, (L17)
210 14,94 e (L37) 14,07%, *F. equiseti* (F32) foi de (L12) 32,04%, respectivamente (Tabela 3).

211 No que se refere à atividade *killer*, foi constatado que todos os isolados de leveduras, possuem
212 esse fenótipo.

213 Para a determinação do biofilme observamos que, apesar da formação de biofilme em todos
214 os isolados, não houve diferença significativa entre as leveduras nos períodos de 24 e 48 h.
215 Diferentemente as 72h, foi o melhor tempo para formação das leveduras, sobretudo para os
216 isolados L9, L37 e L38 com os maiores valores de agregação (Tabela 4).

217 O aproveitamento do potencial de microrganismos nativos para a supressão de doenças
218 através da aplicação de estratégias, no manejo específico, tem sido uma meta dos
219 fitopatologistas (Mazzola & Freilich, 2017).

220 Ruiz-Moyano et al., (2016), testaram 58 leveduras de figo (*Ficus carica* L.) e identificaram
221 com frequência de isolamento de *A. pullulans* (50,0%) *Candida carpophila* (5,2%), as quais
222 inibiram o crescimento micelial de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries.
223 Sendo essas leveduras também, frequentemente identificadas como populações epifíticas
224 típicas de outros frutos (Serradilla et al., 2013). A competição por nutrientes e espaço tem

225 sido postulada como a interação mais importante entre os candidatos antagonistas e patógenos
226 *in vivo* (Sharma et al.,2009).

227 Leveduras isoladas de diferentes ambientes são conhecidas por produzir vários metabolitos,
228 tais como produtos químicos finos, substâncias bioativas e enzimas como amilase, lactase,
229 xilanase, celulase, fitase, lipase, inulinase e superóxido dismutase (Chi et al., 2016). Relatos
230 de produção de peroxidase por *A. pullulans*, em fermentos no tecido de maçãs, sugerem que,
231 indiretamente, podem reduzir a incidência de doenças atuando como agentes indutores de
232 resistência (Haissam, 2011). A levedura *D. hansenii* produz poliaminas (putrescina,
233 espermidina e espermina) demonstrada em diferentes isolados dessa espécie (Reyes- Becerril
234 et al., 2011). O que reforça os resultados encontrados *in vitro* para as leveduras L26 e L27 *A.*
235 *pullulans*, L38 *D. hansenii*.

236 Os resultados do teste de biocontrole mostraram que apesar de todas as leveduras terem
237 reduzido o crescimento da lesão, destaca-se o isolado (L12), o qual reduziu significativamente
238 o crescimento da doença para todos os isolados patogênicos, sendo considerada a levedura
239 mais promissora *in vivo*. Vieira et al., (2012) também encontraram bons resultados para
240 leveduras biocontroladoras, e verificaram que, cinco espécies produzem compostos
241 antimicrobianos, entre estas *C. carpophila*, com frequência de 0,7% na haste e 0,8% nas
242 folhas de panacéia (*Solanum cernuum* vell), representando resultados interessantes, uma vez
243 que poucos estudos de atividade antimicrobiana de leveduras endofíticas tropicais têm sido
244 relatados. No presente trabalho as leveduras foram extraídas do terço médio lateral inferior
245 dos cladódios e os epifíticos do terço médio inferior dos cladódios de palma forrageira.

246 A indução *in vitro* de halos de inibição por leveduras antagonistas, tais como *A. pullulans* tem
247 sido associada à produção de enzimas líticas extracelulares (Lutz et al., 2013). Contudo,
248 existem poucos relatos sobre a atividade antagonista dos outros isolados de levedura testados
249 nesse trabalho. Por isso, os ensaios em meios de cultura demonstraram a interação necessária

250 entre células vivas antagonistas e agentes patogénicos para controlo biológico (Ruiz-Moyano
251 et al, 2016). Os resultados do teste detecção da atividade antifúngica por compostos difusíveis
252 mostram que (L12) reduziu significativamente o crescimento micelial para quase todos os
253 isolados, sendo considerada a levedura mais promissora, também *in vitro*.

254 Contudo os compostos voláteis das leveduras testadas apresentam baixa atividade nos
255 isolados testados. Diferente do encontrado por Huang et al. (2011), onde observaram *C.*
256 *intermedia* (Cif. & Ashford) Langeron & Guerra são promissores para o controle de *Botrytis*
257 *cinerea* Pers. em morango. Como a competição por nutrientes e espaço é proposta como o
258 principal modo de ação pelas quais leveduras antagonistas suprimem os patógenos (Sharma et
259 al., 2009). Talvez por esse motivo não tenhamos obtido uma grande inibição com esses
260 compostos voláteis dos isolados de leveduras testados.

261 A levedura biocontroladora de *Colletotrichum sublineolum* Henn. Ex Sacc. & Trotter do
262 sorgo, *Torulaspora globosa* (Klöcker) Van der Walt & Johannsen, também apresenta
263 atividade *Killer* (Rosa et al., 2010). Vitale et al. (2015) também encontraram resultados
264 semelhantes com *A. pullulans* que mostrou com uma elevada capacidade de colonização dos
265 ferimentos *in vivo*, mas não a formação de biofilme em ensaios *in vitro*.

266

Conclusões

267 1. Os resultados mostram que as leveduras estudadas nesse trabalho apresentam-se como
268 promissoras fontes de compostos bioativos com ação antifúngica.

269 2. As leveduras nativas podem reduzir e controlar a fusariose da palma forrageira,
270 podendo ser usadas no manejo da cultura, como um método de controle biológico.

271 3. Esse é o primeiro relato de leveduras nativas de palma forrageira no Brasil.

272

273 **Agradecimentos**

274 Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, ao Departamento de Fitopatologia da
275 Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Instituto Agrônômico de Pernambuco pela
276 infraestrutura operacional.

277 **Referências**

278 BARBOSA, R.S.; CALVALCANTI, V.A.L.; LOPES, E.B.; ARAÚJO, E. Doenças da palma
279 forrageira. In: LOPES, E.B. (Ed.). **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de**
280 **utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 81-98.

281 CHI, Z.; LIU, G.L.; LU, Y.; JIANG, H.; CHI, Z.M. Bio-products produced by marine yeasts
282 and their potential applications. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 244-252, 2016.

283 GALLARDO, G.; RUIZ-MOYANO, S.; HERNÁNDEZ, A.; BENITO, M.J.; CÓRDOBA,
284 M.G.; PÉREZ-NEVADO, F.; MARTÍN, A. Application of ISSR-PCR for rapid strain typing
285 of *Debaryomyces hansenii* isolated from dry-cured Iberian ham. **Food Microbiology**, v. 42,
286 p. 205-211, 2014.

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

289 HUANG, R.; LI, G.Q.; ZHANG, J.; YANG, L.; CHE, H.J.; JIANG, D.H.; HUANG, H.C.
290 Control of Postharvest Botrytis Fruit Rot of Strawberry by Volatile Organic Compounds of
291 *Candida intermedia*. **Phytopathology**, v.101, p. 859-869, 2011.

292 LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Editora Blackwell
293 Publishing, Iowa, 2006, 388p.

294 LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. Review: utilization of antagonistic
295 yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food**
296 **Microbiology**, v. 167, p. 153-160, 2013.

- 297 LIU, Y.J.; WHELEN, S.; HALL, B.D. Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes:
298 Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. **Molecular Biology Evolution**, v. 16, p.1799-
299 1808, 1999.
- 300 LUTZ, M.C.; LOPES, C.A.; RODRIGUEZ, M.E.; SOSA, M.C.; SANGORRÍN, M.P.
301 Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against
302 postharvest pathogens of pear. **International Journal of Food Microbiology**, v.164, p. 166-
303 172 2013.
- 304 **MAPA**. AGROFIT - Sistema de agrotóxicos fitossanitários [online]. Brasília: Ministério da
305 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em:
306 <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 mai.
307 2017.
- 308 MAZZOLA, M.; FREILICH, S. Prospects for Biological Soilborne Disease Control:
309 Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. **Phytopathology**, v. 107, p. 256-
310 263, 2017.
- 311 NUNES, C.S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia
312 para o semiárido nordestino. **Revista Verde**, v. 6, p. 58-66, 2011.
- 313 NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-
314 promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves
315 in Thailand. **Fungal biology**, v.118, p.683-194, 2014.
- 316 O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M.G.;
317 BRANDT, M.E.; ZHANG, N.; GEISER, D.M. Molecular phylogenetic diversity, multilocus
318 haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species
319 complex. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2477-90, 2008.
- 320 OLIVEIRA, A.S.C.; FILHO F.N.C.; RANGEL A.H.N.; LOPES K.B.P. A palma forrageira:
321 alternativa para o semiárido. **Revista Verde**, v.6, p. 49-58, 2011.

- 322 REYES-BECERRILA, M.; ESTEBAN, M. A., TOVAR-RAMIREZ, D.; Felipe ASCENCIO-
323 VALLE. Polyamine determination in different strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* by
324 high pressure liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.127, p. 1862-1865, 2011.
- 325 ROSA, M.M.; TAU-K-TORNISIELO, S.M.; RAMPAZZO, P.E.; CECCATO-ANTONINI,
326 S.R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against
327 *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and**
328 **Biotechnology**, v. 26, p.1491–1502, 2010.
- 329 RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; VILLALOBOS, M.C.; CALLE, A.; SERRADILHA,
330 M.J.; CÓRDOBA, M.G.; HERNÁNDEZ, A. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as
331 biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, v. 57, p. 45-53, 2016.
- 332 SANTOS, D.C.; ARAÚJO, L.F.; LOPES, E.B.; VASCONCELOS, M.F. Usos e aplicações da
333 palma forrageira. In: Lopes, E.B. (ed.) **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas**
334 **de utilização no semiárido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2012. p. 99-150.
- 335 SERRADILLA, M.J.; VILLALOBOS, M.D.C.; HERNÁNDEZ, A.; MARTÍN, A.; LOZANO,
336 M.; CÓRDOBA, M.G. Study of microbiological quality of controlled atmosphere packaged
337 ‘Ambrunés’ sweet cherries and subsequent shelf-life. **International Journal of Food**
338 **Microbiology**, v. 166, p. 85-92, 2013.
- 339 SHARMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits
340 and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, v. 50, p. 205-221,
341 2009.
- 342 SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the
343 analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 3733-
344 3740, 2016.
- 345 VIEIRA, M.L.A.; HUGHES, A.F.S.; GIL, V.B.; VAZ, A.B.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI,
346 C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte

- 347 community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell.
348 (*Solanaceae*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p. 54-66, 2012.
- 349 VITALE, L.P.A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and action
350 mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch
351 rot of table grape. **Food Microbiology**, v. 47, p. 85-92, 2015.
- 352 ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Efficacy of the antagonist
353 *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its
354 modes of action. **Biological Control**, v. 54, p. 172-180, 2010.

355 **Tabela 1** Porcentagem de inibição de lesão de fusariose por levedura (10^7 CFU mL⁻¹) em cladódios de palma forrageira destacados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$
 356 durante sete dias

| PI (%) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|------------|----|---|-------|------------|-----|---|-------|------------|---|---|-------|------------|---|---|
| Levedura/Patógeno | F1 | | F5 | | F20 | | F32 | | | | | | | | | |
| <i>Cystobasidium slooffiae</i> L9 | 48,8 | $\pm 1,12$ | a | B | 23,76 | $\pm 1,70$ | b | C | 62,98 | $\pm 1,32$ | a | A | 66,29 | $\pm 7,44$ | a | A |
| <i>Candida carpophila</i> L12 | 50,73 | $\pm 4,42$ | a | B | 34 | $\pm 1,46$ | b | C | 50,82 | $\pm 1,93$ | a | B | 72,32 | $\pm 5,81$ | a | A |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L17 | 46,35 | $\pm 8,83$ | a | B | 46,69 | $\pm 2,11$ | a | B | 31,29 | $\pm 3,35$ | b | A | 60,55 | $\pm 1,84$ | a | A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L26 | 57 | $\pm 6,33$ | a | A | 44,28 | $\pm 1,17$ | a | A | 38,89 | $\pm 3,41$ | b | B | 46,67 | $\pm 1,97$ | b | A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L27 | 36,13 | $\pm 1,33$ | b | B | 40,46 | $\pm 6,04$ | a | B | 38,28 | $\pm 7,45$ | b | B | 62,27 | $\pm 2,64$ | a | A |
| <i>Cyrenella elegans</i> L37 | 37,04 | $\pm 8,74$ | b | B | 41,05 | $\pm 1,04$ | a | B | 38,61 | $\pm 1,15$ | b | B | 70,72 | $\pm 1,09$ | a | A |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> L38 | 40,99 | $\pm 3,00$ | b | B | 41,73 | $\pm 8,43$ | a | B | 45,12 | $\pm 1,59$ | b | B | 72,09 | $\pm 3,01$ | a | A |
| CV. | 16,80% | | | | | | | | | | | | | | | |

357 "±" Erro padrão dos meios. Valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott knott (P <0,05).

358

359 **Tabela 2** Porcentagem de inibição da atividade antifúngica por compostos difusíveis de levedura (10^7 CFU mL⁻¹) cultivo pareado com *Fusarium*
 360 spp. *in vitro* a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cinco dias

| Levedura/Patógeno | PI (%) | | | |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | F1 | F5 | F20 | F32 |
| <i>Cystobasidium slooffiae</i> L9 | 60,67 \pm 9,44 c A | 65,1 \pm 4,08 b A | 45,45 \pm 3,74 e B | 50,06 \pm 4,10 d B |
| <i>Candida carpophila</i> L12 | 100 \pm 0 a A | 72,14 \pm 5,45 b C | 80,91 \pm 5,80 a A | 72,26 \pm 1,20 c C |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L17 | 85,79 \pm 3,27 b A | 68,29 \pm 2,60 b B | 72,01 \pm 9,09 b B | 85,71 \pm 2,29 b A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L26 | 64,6 \pm 1,02 c C | 77,34 \pm 4,89 a B | 51,95 \pm 5,56 d D | 100 \pm 0 a A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L27 | 81,26 \pm 3,04 b B | 81,85 \pm 3,50 a B | 63,99 \pm 8,86 c C | 100 \pm 0 a A |
| <i>Cyrenella elegans</i> L37 | 52,7 \pm 1,21 d A | 26,93 \pm 1,84 d C | 26,31 \pm 2,02 f C | 45,96 \pm 1,33 d B |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> L38 | 37,87 \pm 1,68 e B | 37,76 \pm 1,18 c B | 43,24 \pm 1,19 e B | 75,19 \pm 1,34 c A |
| CV. | 7,70% | | | |

361 "±" Erro padrão dos meios. Valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott knott (P <0,05).

362

363 **Tabela 3** Porcentagem de inibição de compostos voláteis com ação antifúngica de levedura (10^7 CFU mL⁻¹) cultivo pareado *Fusarium* spp. *in*
 364 *vitro* a 25 ±2°C durante quatro dias

| Levedura/Patógeno | PI (%) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|-------|----|---|-------|-------|-----|---|-------|-------|---|---|-------|-------|---|---|
| | F1 | | F5 | | F20 | | F32 | | | | | | | | | |
| <i>Cystobasidium slooffiae</i> L9 | 10,64 | ±3,35 | a | A | 8,1 | ±3,63 | b | A | 6,42 | ±1,15 | b | A | 9,52 | ±2,31 | c | A |
| <i>Candida carpophila</i> L12 | 21,42 | ±2,29 | a | B | 11,23 | ±6,48 | a | C | 7,56 | ±7,60 | b | C | 32,04 | ±4,75 | a | A |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L17 | 12,52 | ±5,65 | a | A | 16,46 | ±1,17 | a | A | 14,94 | ±2,48 | a | A | 20,36 | ±0,99 | b | A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L26 | 14,17 | ±0,84 | a | A | 16,11 | ±4,35 | a | B | 5,63 | ±0,68 | b | B | 22,96 | ±2,20 | b | A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L27 | 10,27 | ±0,88 | a | A | 4,12 | ±3,8 | b | A | 4,3 | ±0,57 | b | A | 13,37 | ±0,93 | c | A |
| <i>Cyrenella elegans</i> L37 | 13,39 | ±0,69 | a | A | 13,04 | ±2,32 | a | A | 14,07 | ±2,54 | a | A | 19,74 | ±1,55 | b | A |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> L38 | 13,24 | ±2,16 | a | A | 7,17 | ±2,87 | b | A | 19,16 | ±3,09 | a | A | 7,31 | ±1,34 | c | A |
| CV. | 25,37% | | | | | | | | | | | | | | | |

365 "±" Erro padrão dos meios. Valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott knott (P <0,05).

366 **Tabela 4:** Concentração de cristal violeta (mg ml^{-1})* em células de leveduras aderidas nas paredes de placas de poliestireno em diferentes períodos
 367 de incubação

| Leveduras | Intervalo de avaliação | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|
| | 24h | | 48h | | 72h | |
| Testemunha | 0,0011 | $\pm 0,0000$ a B | 0,0011 | $\pm 0,0000$ a B | 0,0593 | $\pm 0,0008$ d A |
| <i>Cystobasidium slooffiae</i> L9 | 0,0017 | $\pm 0,0003$ a B | 0,0058 | $\pm 0,0003$ a B | 0,6798 | $\pm 0,1172$ a A |
| <i>Candida carpophila</i> L12 | 0,0052 | $\pm 0,0009$ a B | 0,0082 | $\pm 0,0013$ a B | 0,3653 | $\pm 0,0201$ b A |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L17 | 0,0037 | $\pm 0,0005$ a B | 0,0031 | $\pm 0,0004$ a B | 0,191 | $\pm 0,0095$ c A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L26 | 0,0024 | $\pm 0,0003$ a B | 0,0086 | $\pm 0,0039$ a B | 0,2333 | $\pm 0,0286$ c A |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> L27 | 0,0019 | $\pm 0,0002$ a B | 0,0052 | $\pm 0,0007$ a B | 0,2058 | $\pm 0,0328$ c A |
| <i>Cyrenella elegans</i> L37 | 0,0012 | $\pm 0,0010$ a B | 0,0026 | $\pm 0,0003$ a B | 0,6753 | $\pm 0,0219$ a A |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> L38 | 0,001 | $\pm 0,0001$ a B | 0,0034 | $\pm 0,0008$ a B | 0,6645 | $\pm 0,0310$ a A |
| CV. | 25,35% | | | | | |

368 "±" Erro padrão dos meios. Valores seguidos pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott knott ($P < 0,05$).

CAPÍTULO 3

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Candida carpophila* NO
BIOCONTROLE DA FUSARIOSE DA PALMA FORRAGEIRA**

1 **Perfil químico e potencial antimicrobiano de *Candida carpophila* no biocontrole da**
2 **fusariose da palma forrageira**

3 Michele Freitas Santiago⁽¹⁾, Alice Maria Gonçalves Santos⁽²⁾, Tarcio Tomé da Silva⁽³⁾, Cicero
4 Pinheiro Inácio⁽⁴⁾, Amaro de Castro Lira Neto⁽⁵⁾, Domingos Eduardo Guimarães Tavares de
5 Andrade⁽⁵⁾, Djalma Cordeiro dos Santos⁽⁵⁾, Clécio Souza Ramos⁽⁶⁾, Rejane Pereira Neves⁽⁴⁾,
6 Tereza Cristina de Assis⁽⁵⁾, Delson Laranjeira⁽¹⁾

7 Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Laboratório de Fungos do solo -
8 LAFSOL, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email: miccafs@hotmail.com⁽¹⁾

9 Universidade Federal do Piauí - UFPI, CEP 64900-000, Bom Jesus, PI. ⁽²⁾

10 Universidade de Pernambuco - UPE, CEP 50100-010, Recife, PE. ⁽³⁾

11 Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Laboratório de química, CEP: 50670-420,
12 Recife, PE. ⁽⁴⁾

13 Instituto agrônômico de Pernambuco - IPA, CEP 50761-000, Recife, PE. ⁽⁵⁾

14 Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Laboratório de Química, CEP 52171-
15 900, Recife, PE. ⁽⁶⁾

16 **Resumo** - O presente trabalho avaliou o potencial antimicrobiano do extrato clorofórmico de
17 *Candida carpophila* com associação ao seu perfil químico. Adicionalmente, foi avaliada a
18 eficácia de *C. carpophila* como agente de biocontrole de fitopatógenos em palma forrageira.
19 A análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que a levedura *C. carpophila*
20 inibiu os patógenos, reduzindo os seus crescimentos e germinação, provocando deformações
21 de esporos e hifas, extravasamento do conteúdo celular das hifas. Enquanto, os dados obtidos
22 por espectrofotometria por energia dispersiva observamos diminuição na atividade patogênica
23 do *Fusarium* spp. na presença de *C. carpophila*. O extrato clorofórmico de *C. carpophila*
24 apresentou forte atividade antimicrobiana contra todos os isolados patogênicos testados e
25 atividade similar ao princípio ativo tiabendazol. O extrato apresentou concentração mínima
26 inibitória de 31,25 µg/mL para F5 e F20, de 62,5 µg/mL para F32 e F1 foi inibido em todas as
27 concentrações. Através da análise de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de
28 massas (CG-EM) foram identificado seis compostos no extrato: hexahidropirrolol [1,2-a]
29 pirazina-1,4-diona, 3,6-bis (2-metilpropil)-2,5-piperazinediona e o ácido *cis*-6-octadecenóico,
30 Ácido adípico, Ftalato dietila e Lupeol, sendo os dois relacionados à atividade antifúngica.
31 Em todos os experimentos realizados *C. carpophila* demonstrou ser eficiente no controle da
32 fusariose da palma forrageira.

33 **Termos para indexação:** *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, Compostos bioativos,
34 Doenças de plantas, Levedura.

35 **Introdução**

36 No Brasil, a palma forrageira é cultivada principalmente por pequenos produtores
37 visando à subsistência da pecuária em regiões semiáridas. No Nordeste é onde se
38 encontra a maior área cultivada do mundo de palma forrageira, estimada em 600 mil
39 hectares, distribuídos nos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba,
40 Ceará e Rio Grande do Norte (Lopes et al. 2012). Há poucos estudos relatados sobre as
41 doenças da palma forrageira, sendo que as doenças de origem fúngicas causam os
42 maiores danos à planta, podendo afetar cladódios, sistema radicular e frutos (Barbosa et
43 al. 2012).

44 No Brasil, não existem fungicidas registrados para o controle da fusariose da palma
45 forrageira (MAPA 2017). No que se refere ao controle biológico não existem relatos
46 para esse patógeno nessa cultura. O controle químico, por seu elevado custo e possíveis
47 impactos ambientais, na maioria das vezes, são inviáveis para aplicação em culturas de
48 pequenos produtores rurais devido à escassez de recursos, equipamentos de segurança e
49 mão-de-obra especializada (Vasconcelos et al. 2009). No entanto, o controle biológico é
50 uma das alternativas promissoras aos fungicidas sintéticos, sendo que esta alternativa
51 tem recebido uma atenção crescente em estudos direcionados para controle e manejo de
52 pragas (Droby et al. 2009). Fungos endofíticos biossintetizam substâncias conhecidas
53 como metabólitos secundários de grande interesse para a indústria agroquímica e
54 farmoquímica, que são usadas como moléculas modelos para a descoberta e
55 desenvolvimento de novos pesticidas e fármacos (Vieira et al. 2012).

56 No mercado há vários produtos comerciais derivados de levedura para o controle
57 biológico dos fungos patogênicos (Droby et al. 2009). As espécies de levedura como
58 *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud; *Cryptococcus albidus*
59 (Saito) C. E. Skinner, *Metschnikowia fructicola* Kurtzman e Droby, *Candida oleophila*

60 Montrocher isolado O, tem sido recomendados para o controle de fungos com *Botrytis*
61 *cinerea* Pers., *B. cinerea* e *Penicillium expansum* Link, *P. digitatum* (Pers.) Sacc., *P.*
62 *italicum* Wehmer, *P. expansum*, *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill.,
63 *Aspergillus niger* Tiegh., *Fusarium* sp. e *Sclerotinia sclerotium* respectivamente, em
64 pós colheita (Haissam 2011).

65 O aproveitamento do potencial de microorganismos nativos para a supressão de doenças
66 é uma estratégia que tem sido adotada por fitopatologistas (Mazzola e Freilich, 2017).

67 Os mecanismos de ação das leveduras envolvidas na interação com o fitopatógeno,
68 asseguram uma agricultura ecologicamente sustentável (Botha 2011).

69 Devido à sua importância para subsistência do Nordeste e a falta de fungicidas com
70 registro no Brasil para o controle de fitopatógenos, há uma necessidade emergencial de
71 mais estudos que levem à descoberta de novas estratégias de manejo da fusariose na
72 palma forrageira. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos identificar os
73 constituintes químicos do extrato clorofórmico de *C. carpophila* e avaliar seu potencial
74 antimicrobiano frente à *Fusarium oxysporium* Schltdl. e *F. equiseti* (Corda) Sacc.
75 causadores da fusariose da palma forrageira.

76 **Material e Métodos**

77 Os ensaios de metabólitos bioativos foram realizados nos Laboratórios: Fungos de solo
78 LAFSOL – UFRPE; Fitopatologia – IPA; Imunopatologia Keizo Asami LIKA – UFPE;
79 Química – UFRPE; Centro de Pesquisa Ageu Magalhães – FIOCRUZ e Centro de
80 Apoio à pesquisa UFRPE – Cenapesq, situados em Recife, Pernambuco.

81 **Coleta e identificação dos isolados**

82 O isolado URM7632 *Candida carpophila* (Phaff & M.W. Mill.) endofítico selecionado
83 de palma forrageira, foi procedente do município de Arcoverde, pertencente à Região do
84 Sertão, PE. A espécie isolada foi identificada através de caracterização molecular por

85 sequenciamento do domínio D1 / D2 da 28S LSU de rRNA, como descrito previamente
86 por Gallardo et al. (2014).

87 Foram selecionados dois isolados de *F. oxysporum* (F1 e F5) coletados em Arcoverde e
88 Surubim respectivamente, e dois isolados de *F. equiseti* (F20 e F32) coletados em
89 Ibimirim e Arcoverde respectivamente, todos patogênicos e representando dois
90 complexos distintos: Complexo *F. oxysporum* e Complexo *F. incarnatum-equiseti*. Para
91 identificação dos isolados quanto à morfologia, tomaram-se por base as descrições feitas
92 por Leslie e Summerell (2006) e através de biologia molecular (Liu et al. 1999;
93 O'Donnell et al. 2008). Todos os isolados utilizados neste estudo foram estocados na
94 Coleção de Cultura Micoteca, Universidade Federal de Pernambuco, URM / UFPE
95 (www.ufpe.br/micoteca).

96 **Microscopia eletrônica de varredura**

97 Para visualização através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras do
98 ensaio *in vivo* envolvendo *Fusarium* spp. x *C. carphophila* nas combinações (URM7632
99 x F1), (URM7632 x URM7638), (URM7632 x URM7639), (URM7632 x F32), e
100 também isoladas (URM7632), (F1), (URM7638), (URM7639), (F32), e palma
101 forrageira (P), foram fixadas em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5% durante 12
102 h a 4 °C. As amostras foram imersas em tetróxido de ósmio 1% por 1 h e lavados com
103 tampão de cacodilato de sódio 0,2 M. Em seguida foram realizadas três lavagens em
104 tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de
105 etanol de 30% a 100%. Após a desidratação, a amostra foi submetida ao ponto crítico
106 em atmosfera de CO₂, montadas em stubs e metalizadas com uma camada de ouro por
107 meio de pulverização catódica no Q150T (Quorum Technologies). Em seguida, as
108 amostras foram analisadas por meio do MEV, JEOL JSM-5600 LV do NPT do
109 CPqAM/FIOCRUZ.

110 **Espectrômetro de dispersão de energia**

111 O MEV estava equipado com um espectrômetro de dispersão de energia (EDS) e
112 operado com uma tensão de 200 V a 30 kV, uma corrente de feixe de 100 nA e um
113 aumento na ordem de 12x (distância de trabalho mais longa) para 1.000.000 para alto
114 vácuo.

115 **Obtenção do extrato clorofórmico**

116 Para a obtenção do extrato clorofórmico de *C. carpophila*, o isolado URM7632 foi
117 cultivado em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SD), após 72h de crescimento
118 foi realizada a raspagem com alça de platina, sobre a cultura e imerso em clorofórmio
119 por 24h, com agitação constante. O material foi sonificado por 30min e em seguida
120 filtrado em papel filtro (poro 10^{-6} m). Os componentes químicos que passaram por esse
121 filtro foram secos por rotaevaporação, pesados e resuspendidos em clorofórmico na
122 concentração de 1µg/mL.

123 **Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas**

124 Para a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), foi
125 utilizado o extrato de *C. carpophila* em clorofórmio, para a obtenção de compostos
126 apolares. A identificação dos constituintes químicos desse extrato foi obtida através da
127 análise de CG-EM realizada em um equipamento PerkinElme, na concentração de 2
128 mg/mL em metanol, utilizando-se uma coluna de capilaridade com sílica (30m x
129 0,25mm x 0,25µm). A temperatura da coluna foi programada para 100 °C até 240 à
130 5°C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 280°C,
131 respectivamente. O gás de arraste foi o hélio, fluxo de 1 mL/min, (1:30). Os espectros
132 de massa foram obtidos a 70 eV por IE. A velocidade de leitura de 0.5 scans-1 de m/z
133 50 a 650. A identificação foi feita com base na comparação computadorizada do
134 espectro de massa obtido com aqueles contidos na biblioteca da CG-EM.

135 Concentração mínima inibitória

136 Atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico de *C. carpophila* foi determinada
137 pelos valores da concentração mínima inibitória (CMI), realizada em microplacas de
138 polietileno com 96 poços. Do primeiro ao quarto poço foram realizadas as testemunhas.
139 Do quinto poço de amostra em diante realizou-se a diluição em série adicionando-se
140 190µL de meio SD e 10 µL de extrato de *C. carpophila* com concentração inicial de
141 250 µg/mL (em oito diluições seriadas: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95
142 µg/mL) e 4 µg/mL princípio ativo tiabendazol (grupo químico benzimidazol) (em oito
143 diluições seriadas: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12, 0,06 e 0,03 µg/mL). Foram adicionados 10µL
144 de suspensão de *Fusarium* spp. (10^7 conídios.mL⁻¹) diluído em solução salina a 0,9%,
145 em todos os poços amostras da placa. As placas foram incubadas durante 48h, em
146 seguida adicionou-se 10µL de corante resazurin[®] em cada poço das placas, sendo essas
147 mantidas no escuro por 3h antes da leitura visual.

148 Teste de bioautografia com cromatografia de camada delgada

149 A atividade antifúngica das substâncias analisadas foram determinadas através de
150 bioautografia, conforme metodologia de Choma e Grzelak (2011), onde foram
151 preparados 100 mL dos inóculos (F1, URM7638, URM7639, F32) em meio líquido, os
152 quais foram calibrados para $3,0 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ para meio de cultura batata dextrose
153 ágar semi sólido (100 g, 12 g, 0,1% de agar bacteriano e 500 mL respectivamente,
154 acrescido de 0,1% de Tween80. Para cromatografia de camada delgada (CCD), placas
155 de sílica gel foram corridas em sistemas (hexano 7% e acetato de etila 3%), com o
156 extrato da levedura e extrato do princípio ativo tiabendazol. A inibição do crescimento
157 de fungos em cromatografia as placas de sílica gel foram inoculadas com uma
158 suspensão de esporos de 10 mL de cada isolado fúngico. A inibição do crescimento
159 fúngico para cada fungo teste foi medida quatro dias após o tratamento. Sensibilidade de

160 cada isolado de fungos para os compostos de teste e um padrão de princípio ativo
161 tiabendazol foi determinado pela comparação dos halos de inibição (Wedge e Nagle,
162 2000).

163 **Resultados e Discussão**

164 **Microscopia eletrônica de varredura**

165 Na análise por MEV foi possível observar que a levedura *C. carpophila* apresentou alto
166 grau de colonização dos tecidos lesionados da palma forrageira, inibindo o crescimento
167 do *Fusarium* spp., dificultando a germinação do esporo, provocando deformações nos
168 esporos e hifas, além de causar extravasamento do conteúdo celular (Figura 1).

169 **Espectrômetro de dispersão de energia**

170 A análise de espectrofotometria por energia dispersiva (EDS) indicou que os principais
171 elementos químicos detectados nas amostras foram: carbono (C), oxigênio (O), sódio
172 (Na) e cálcio (Ca) (Tabela 1). Podemos observar que nos tratamentos apenas com palma
173 forrageira os valores de C e O foram mais elevados quando comparados com a palma
174 forrageira inoculada com *C. carpophila* x *Fusarium* spp. Nos tratamentos envolvendo
175 *C. carpophila* x *Fusarium* spp. verificou-se uma redução dos elementos C e O,
176 sugerindo-se que esse fato ocorre devido a redução nas atividades do *Fusarium* spp.

177 **Concentração mínima inibitória**

178 O princípio ativo tiabendazol foi escolhido para comparação, por ser indicado para *F.*
179 *oxysporum* na cultura do tomateiro e apresentar bons resultados de controle. Os
180 resultados das CMI's para o extrato de *C. carpophila* e tiabendazol no controle de
181 *Fusarium* spp. foram similares quanto a dose/resposta, tanto o extrato de *C. carpophila*
182 como o tiabendazol. Todas as concentrações do extrato de *C. carpophila* e tiabendazol
183 foram eficientes no controle do isolado F1 de *F. oxysporum*. Os isolados URM7638 de
184 *F. oxysporum* e URM7639 de *F. equiseti* foram inibidos quando utilizado 0,25 µg/mL

185 de tiabendazol e 15,62 µg/mL do extrato de *C. carpophila*. O isolado F32 *F. equiseti* foi
186 inibido na presença de 0,5 µg/mL de tiabendazol e 31,25 µg/mL do extrato de *C.*
187 *carpophila*. Estes resultados indicam que extrato de *C. carpophila* apresentam forte
188 atividade antimicrobiana.

189 **Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas**

190 Com base na interpretação dos dados da análise de CG-EM do extrato clorofórmico da
191 levedura *C. carpophila* foi possível identificar seis compostos: Hexahidropirrolo [1,2-a]
192 pirazina-1,4-diona (1) com tempo de retenção em 10,85 min, 3,6-bis (2-metilpropil) -
193 2,5-Piperazinediona (2) com tempo de retenção em 14,95 min, o ácido cis-6-
194 octadecenóico (3) com tempo de retenção em 16,03 min, Ácido adípico (4) com tempo
195 de retenção em 16,84 min, Ftalato dietila (5) com tempo de retenção em 18,02 min,
196 Lupeol (6) com tempo de retenção em 20,38 min (Figura 2).

197 **Teste de bioautografia com cromatografia de camada delgada**

198 O perfil químico do extrato de *C. carpophila* obtido por (CCD) e usado no teste
199 bioutografia apresentou quatro manchas na concentração utilizada, sendo que a segunda
200 mancha mais apolar, apresentou halo de inibição frente aos isolados de *Fusarium* spp.
201 (F1, URM7638, URM7639 e F32), o fator de retenção dessa mancha foi de 0,34.

202 A *C. carpophila* reduziu significativamente o desenvolvimento da lesão *F. oxysporum* e
203 *F. equiseti in vivo* em cladódio de palma forrageira destacados após sete dias de
204 incubação a 25 ±2°C. Vieira et al. (2012) verificaram que *C. carpophila*, isolada da
205 planta medicinal panacéia (*Solanum cernuum* vell) era capaz de produzir compostos
206 antimicrobianos.

207 Em ensaio com a levedura *Torulaspora globosa* (Klöcker) Van der Walt & Johannsen
208 contra *Colletotrichum sublineolum* Henn. Ex Sacc. & Trotter do sorgo, os resultados

209 também mostraram deformidades de hifas, mas não a morte celular do patógeno (Rosa
210 et al. 2010).

211 Garcia Jr et al. (2008) também testando o princípio ativo tiabendazol e conseguiram a
212 redução da incidência de *F. graminearum* em sementes de trigo.

213 Liu et al. (2011) também identificaram o composto Hexahidropirrolo [1,2-a] pirazina-
214 1,4-diona em bactérias termófilas *Anoxybacillus flavithermus* SX-4, capaz de aumentar
215 as respostas imunes inatas, a expressão de genes imunes relacionados e a resistência à
216 doença da carpa (*Cyprinus carpio* L.) *in vivo*. Pesquisa desenvolvida por Ser et al.
217 (2015) demonstrou que *Streptomyces mangrovisoli* MUSC 149^T, produz
218 Hexahidropirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona, podendo ser utilizada na prevenção e
219 tratamento de doenças crônicas associadas a radicais livres em humanos.

220 Pesquisa realizada por Yang e Chang, (2010) verificaram que o composto 3,6-bis (2-
221 metilpropil)-2,5-Piperazinediona isolado de *Lactobacillus plantarum* AF1, apresentou
222 atividade antifúngica, capaz de inibir a deterioração de alimentos e a formação de
223 micotoxinas. Pesquisas realizadas por Zheng et al. (2005) verificaram que o isolado de
224 *Pseudomona* ssp. NJ6-3-1 produziu o composto 3,6-bis (2-metilpropil)-2,5-
225 Piperazinediona, que mostrou atividades citotóxicas e antimicrobianas.

226 O composto ácido *cis*-6-octadecenóico é um ácido oleico de ocorrência natural,
227 encontrado também em fungos filamentosos e vem sendo estudados na biotecnologia
228 pelo seu potencial como mediador em processos de biotransformação, dando ênfase
229 particular para uso como biocatalisador para a produção de biodiesel (Cortez et al.
230 2017).

231 O composto Ácido adípico conjugado com outros fármacos é utilizado como
232 anticancerígeno contra o câncer de colorretal, sem alterações morfológicas no fígado e
233 nos rins (Jian et al. 2017).

234 O composto Ftalato dietila é componente de medicamentos, devido à sua frequente
235 exposição à pele, deve-se tomar cuidado sobre sua toxicidade, estudos mostram que
236 pode causar danos ao sistema nervoso e órgãos reprodutores, mas são rapidamente
237 metabolizados pelo organismo e sua quantidade é medida através da urina (Guo et al.
238 2011).

239 O composto Lupeol é descrito para quimioprevenção avançada pelo tratamento
240 combinado de

241 Pterostilbeno e Lupeol, ambos os fitoquímicos, em reduzir o volume médio de tumor,
242 número acumulado de tumores e a multiplicidade tumoral impedindo o câncer de pele
243 em ratos (Singh et al. 2017). Bhattacharyya et al. (2017), também estudaram o efeito
244 antitumoral de Lupeol em câncer de cabeça e pescoço, constatou que ele pode
245 reduzir a progressão dos carcinomas primários. Ali et al. (2016), estudando os
246 compostos da planta *Crataeva nurvala* L., constataram como um importante
247 componente ativo, que inibi a formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa*,
248 bactéria patogênica humana oportunista.

249 Wedge e Nagle (2000) avaliando a CCD *Colletotrichum fragariae* A.N. Brooks de
250 morangos, quanto à sua sensibilidade para fungicidas agrícolas comerciais conseguiram
251 detectar visualmente a zona de inibição, mas para o produto comercial de tiabendazol,
252 na concentração utilizada, não foi visualizada zona de inibição.

253 **Conclusões**

- 254 1. A *Candida carpophila* e seu extrato clorofórmico demonstraram eficiência no controle
255 de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium equiseti*.
- 256 2. Foram identificados seis compostos no extrato de *C. carpophila* dos quais dois possuem
257 atividade antimicrobiana comprovada Hexahidropirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona e 3,6-
258 bis(2-metilpropil)-2,5-Piperazinediona e dois Ácido adípico e Lupeol possuem ação
259 anticancerígena e podem também ter atividade antimicrobiana.

260 **Referências**

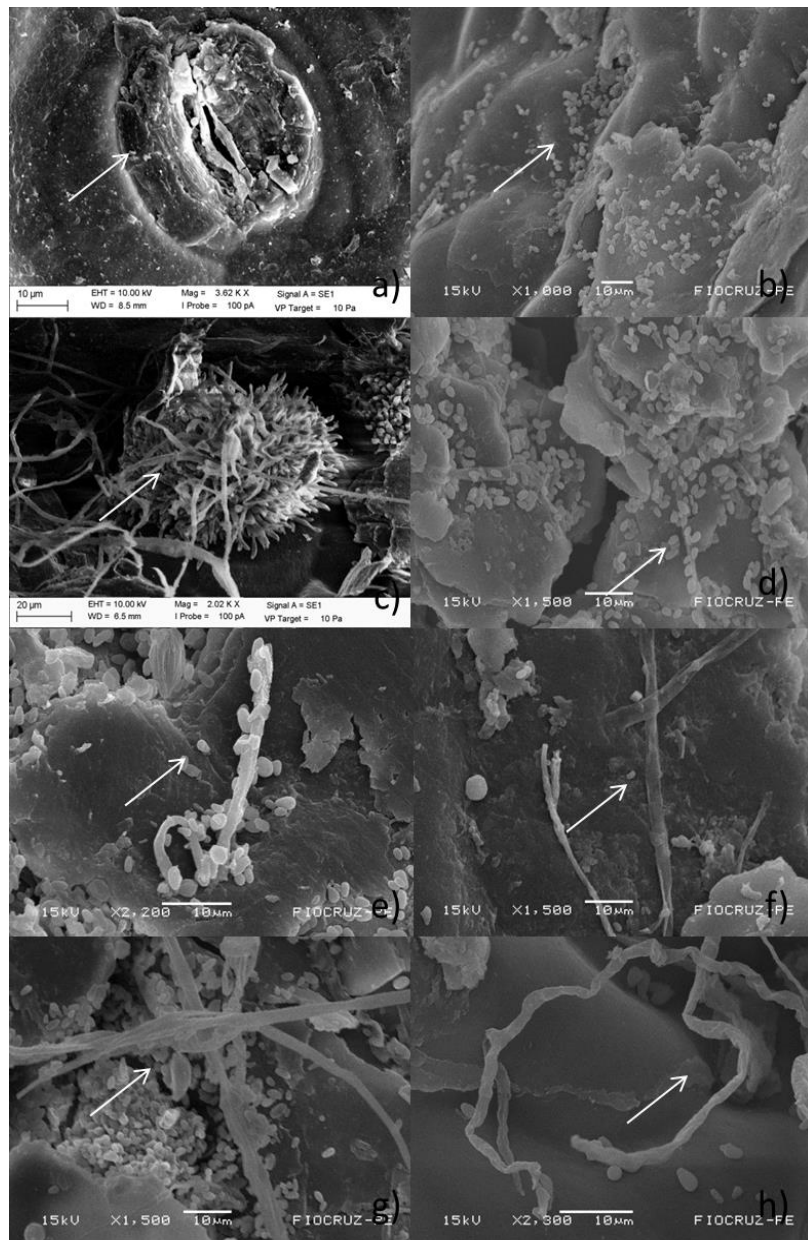
- 261 Ali SG, Ansari MA, Khan HM, Jalal M, Mahdi AA, Cameotra SS (2016) *Crataeva nurvala*
262 nanoparticles inhibit virulence factors and biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas*
263 *aeruginosa*. Journal Basic Microbiology 57:193-203.
- 264 Barbosa RS; Cavalcanti VALB; Lopes EB; ARAÚJO E. Doenças da palma forrageira.
265 In: Lopes EB (2012) Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no
266 semiárido nordestino. João Pessoa. pp. 81-98.
- 267 Bhattacharyya S; Sekar V; Majumder B; Mehrotra DG; Banerjee S; Bhowmick AK; Alam N;
268 Mandal GK; Biswas J; Majumder PK; Murmu N (2017) CDKN2A-p53 mediated antitumor
269 effect of Lupeol in head and neck cancer. Cellular Oncology, 40: 145-155.
- 270 BOTHA A (2011) The importance and ecology of yeasts in soil. Soil Biology &
271 Biochemistry, 43:1-8.
- 272 Choma IM; Grzelak EM (2011) Bioautography detection in thin-layer chromatography.
273 Journal of Chromatography A, 1218:2684–2691.
- 274 Corteza DV; Castroa HF; Anadraded GSS (2017) Potencial catalítico de lipases ligadas
275 ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. Química Nova,
276 40:85-96.
- 277 Droby S; Wisniewski M; Macarisin D; Wilson C (2009) Twenty years of postharvest
278 biocontrol research: is it time for a new paradigm? Postharvest Biology Technology,
279 52:137-145.
- 280 Gallardo G; Ruiz-Moyano S; Hernández A; Benito MJ; Córdoba MG; Pérez-Nevado F; Martín
281 A (2014) Application of ISSR-PCR for rapid strain typing of *Debaryomyces hansenii* isolated
282 from dry-cured Iberian ham. Food Microbiology, 42:205-211.
- 283 Garcia Jr D; Vechiato MH; Menten JOM (2008) Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium*
284 *graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo. Summa
285 Phytopathologica, 34:280-183.

- 286 Guo Y; Alomirah H; Cho HS; Minh TB; Mohd AT; Nakata H; Kannan K (2011) Occurrence of
287 Phthalate Metabolites in Human Urine from Several Asian Countries. *Environmental Science &*
288 *Technology*, 45:3138-44.
- 289 Haissam JM (2011) *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research
290 and practical applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99:93-105.
- 291 Jian YS; Chen CW; Lin CA; Yu HP; Lin HY; Liao MY; Wu SH; Lin YF; Lai PS (2017)
292 Hyaluronic acid-nimesulide conjugates as anticancer drugs against CD44-overexpressing HT-29
293 colorectal cancer in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 27:2315-2333.
- 294 Leslei JF; Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Iowa, Editora Blackwell
295 Publishing.
- 296 Liu J; Lei Y; Wang F; Yi Y; Liu Y; Wang G (2011) Immunostimulatory activities of
297 specific bacterial secondary metabolite of *Anoxybacillus flavithermus* strain SX-4 on
298 carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Applied Microbiology*, 110:1056-64.
- 299 Liu YJ; Whelen S; Hall BD (1999) Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes:
300 Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Molecular Biology Evolution*, 16:1799-
301 1808.
- 302 Lopes EB; Santos DCE; Vasconcelos MF (2012) Cultivo da palma forrageira. In: Lopes
303 EB. *Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido*
304 *nordestino*. João Pessoa, EMEPA/FAEPA.
- 305 MAPA. AGROFIT - Sistema de agrotóxicos fitossanitários [online]. Brasília: Ministério da
306 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em:
307 <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 mai.
308 2017.
- 309 Mazzola M; Freilich S (2017) Prospects for Biological Soilborne Disease Control:
310 Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. *Phytopathology*, 107:256-
311 263.

- 312 O'Donnell K; Sutton DA; Fothergill A; McCarthy D; Rinaldi MG; Brandt ME; Zhang
313 N; Geiser DM (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype
314 nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species
315 complex. *Journal Clinical Microbiology*, 46:2477-90.
- 316 Singh P; Arora D; Shukla Y (2017) Enhanced chemoprevention by the combined treatment of
317 pterostilbene and lupeol in B[a]P-induced mouse skin tumorigenesis. *Food and Chemical*
318 *Toxicology*, 99:182-189.
- 319 Rosa MM; Tauk-Tornisielo SM; Rampazzo PE; Ceccato-Antonini SR (2010)
320 Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against
321 *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and*
322 *Biotechnology*, 26:1491–1502.
- 323 Ser HL; Palanisamy UD; Yin WF; Abd Malek SN, Chan KG, Goh BH, Lee LH (2015)
324 Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-innewly
325 isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, 6:1-11.
- 326 Vasconcelos AGV; Lira MA; Cavalcanti VLB; Santos MVF; Willadino L (2009) Seleção de
327 clones de palma forrageira resistentes à cochonilha do carmim (*Dactylopius* sp). *Revista*
328 *Brasileira de Zootecnia*, 38:827-831.
- 329 Vieira MLA; Hughes AFS; Gil VB; Vaz ABM; Alves TMA; Zani CL; Rosa CA; Rosa
330 LH (2012) Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community
331 associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell.
332 (*Solanaceae*). *Canadian Journal of Microbiology*, 58:54-66.
- 333 Wedge DE; Nagle DG (2000) A New 2D-TLC Bioautography method for the discovery
334 of novel antifungal agents to control plant pathogens. *Journal of Natural Products*,
335 63:1050-1054.

- 336 Yang EJ; Chang HC (2010) Purification of a new antifungal compound produced by
337 *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. International Journal Food
338 Microbiology, 30:56-63.
- 339 Zheng L; Yan X; Xu J; Chen H; Lin W (2005) Hymeniacidon perleve associated
340 bioactive bacterium pseudomonas sp. NJ6-3-1. Prikl Biokhim Mikrobiol, 41:35-9.
- 341

342



343

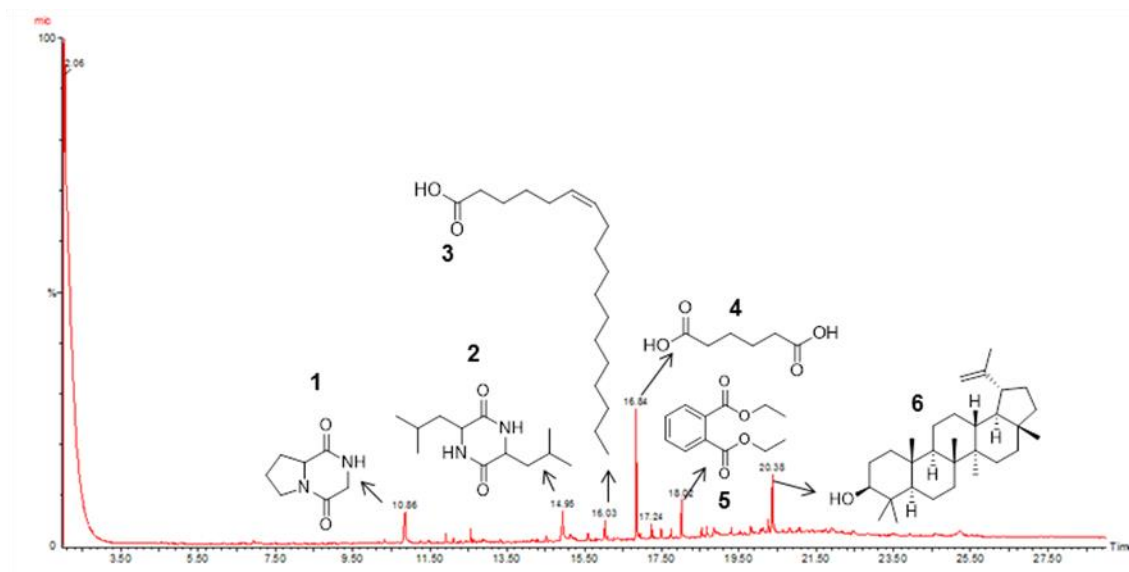
344 **Figura 1:** Microscopia eletrônica de varredura. a) Cladódio de palma forrageira; b)
 345 Cladódio de palma forrageira colonizado com *Candida carpophila*; c) Cladódio de
 346 palma forrageira colonizado com *Fusarium equiseti* URM7639; d,e) Hifas de *Fusarium*
 347 *oxysporum* URM7638 sendo colonizadas por *C. carpophila*; f) *C. carpophila* atuando
 348 no extravasamento do conteúdo celular da hifa de *F. oxysporum* F1; g) *C. carpophila*
 349 atuando na deformação do esporo de *F. oxysporum* URM7638; h) *C. carpophila*
 350 atuando na deformação da hifa de *F. equiseti* F 32.

351 **Tabela 1:** Determinação da porcentagem média de elementos químicos presentes nos
 352 tratamentos através de espectrofotometria por energia dispersiva (EDS)

| Tratamento | C | O | Na | Ca |
|--|-------|-------|------|------|
| Esporos <i>C. carpophila</i> | 44,09 | 13,49 | | |
| Esporos <i>C. carpophila</i> x <i>Fusarium</i> spp. | 0,32 | 0,11 | 0,01 | |
| Esporos <i>Fusarium</i> spp. | 53,70 | 43,61 | 1,20 | 1,64 |
| Esporos <i>Fusarium</i> spp. X <i>C. carpophila</i> | 0,24 | 0,07 | 0,01 | |
| Hifa <i>Fusarium</i> spp. | 48,68 | 36,73 | 0,80 | 1,50 |
| Hifa <i>Fusarium</i> spp. X <i>C. carpophila</i> | 0,24 | 0,07 | 0,01 | |
| Palma forrageira | 44,09 | 16,12 | | |
| Palma forrageira x <i>C. carpophila</i> x <i>Fusarium</i> spp. | 0,19 | 0,04 | | |

353

354



355

356 **Figura 2:** Perfil químico obtido por CG-EM do extrato clorofórmico do da levedura *C.*

357 *carpophila*, e estruturas dos compostos Hexahidropirroló [1,2-a] pirazina-1,4-diona (1);

358 3,6-bis(2-metilpropil)-2,5-Piperazinediona (2); o ácido *cis*-6-octadecenóico (3) Ácido

359 adípico (4); Ftalato dietila (5) e Lupeol (6).

360

361

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA RESISTENTES À

FUSARIOSE

Avaliação de genótipos de palma forrageira resistentes à fusariose

Michele Freitas Santiago¹, Alice Maria Gonçalves Santos², Tarcio Tomé da Silva³, Cicero Pinheiro Inácio⁴, Amaro de Castro Lira Neto⁵, Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade⁵, Djalma Cordeiro dos Santos⁵, Rejane Pereira Neves⁴, Tereza Cristina de Assis⁵, Delson Laranjeira¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Laboratório de Fungos do solo - LAFSOL, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email: miccafs@hotmail.com

²Universidade Federal do Piauí, Laboratório de Fitopatologia - UFPI, CEP 64900-000, Bom Jesus, PI.

³Universidade de Pernambuco - UPE, CEP 50100-010, Recife, PE.

⁴Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Micologia Médica – UFPE, CEP: 50670-420, Recife, PE.

⁵Instituto agrônomo de Pernambuco - IPA, CEP 50761-000, Recife, PE.

Resumo: O objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência de 20 genótipos de palma forrageira à fusariose, sob condições artificiais de inoculação em cladódios destacados e mantidos em sala de incubação com temperatura e umidade controladas. Sete genótipos foram considerados resistentes, sete moderadamente resistentes e seis susceptíveis, para os dois isolados de cada de *Fusarium oxysporum* e *F. equiseti*. Com base neste estudo, os genótipos G4. IPA-100417, G8. IPA – 100430 e G17. IPA - 100425 foram considerados promissores quanto à resistência à fusariose, e também possuem baixa concentração de esporos e poderão ser utilizados por melhoristas em futuros cruzamentos, para obtenção de palma forrageira resistente à fusariose.

Palavras chaves: resistência a doenças, melhoramento vegetal, *Fusarium oxysporum*; *Fusarium equiseti*

Introdução

A palma forrageira tem seus centros de origem descritos os Estados Unidos, México e América do Sul (Chougui et al., 2013). Pertence à divisão Embryophyta, subdivisão Angiospermea, classe Dicotyledoneae, subclasse Archiclamideae, ordem Opuntiales e família das Cactáceas (Silva and

Santos 2006). As cactáceas são plantas arbustivas, suculentas e ramificadas. Constituem um grupo extremamente diversificado, com um impressionante conjunto de estratégias adaptativas, evolutivas e ecológicas, que lhes conferem uma grande capacidade de desenvolvimento nos diferentes habitats. Destacam-se os gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, de ampla distribuição em regiões áridas e semiáridas por apresentar potencial alimentar e forrageiro (Rebman and Pinkava 2001).

A palma forrageira tem sua história Brasil no século XIX, sua introdução se deu pela necessidade na época de produção da cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Simões et al., 2005). No Nordeste do Brasil, são encontrados quatro tipos distintos de palma forrageira: “gigante” (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill), “redonda” (*Opuntia* sp.), “miúda” e “mão de moça” (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck) (Lopes et al., 2012) e “orelha de elefante” (*O. tuna* L. Mill) (Santos et al., 2001).

A palma “gigante” (*O. ficus indica*) é caracterizada pelo crescimento vertical, resistência á seca, alta produtividade, susceptível á falsa cochonilha do carmim e menos palatável, quando comparada com a palma miúda. A “redonda” (*Opuntia* sp.) apresenta característica que se assemelham às da variedade gigante, diferindo apenas, no formato da raquete e no hábito de crescimento da planta. É mais produtiva do que a palma miúda em termos de massa verde. A palma “orelha de elefante” (*Opuntia stricta* Haworth) apresenta crescimento horizontal, rica em matéria seca em relação á variedade gigante, possui pelos e é resistente à falsa cochonilha do carmim. A palma “miúda” (*N. cochenillifera*) tem como características principais o crescimento vertical, a baixa resistência à seca, resistência à falsa cochonilha do carmim, além de ser mais rica em carboidratos e maior porcentagem de matéria seca, em relação à palma gigante (Santos et al., 2001), com exceção a “mão de moça” que é suscetível a cochonilha de escama *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Gava and Lopes, 2012). São espécies que não toleram umidade excessiva e apresentam extraordinária capacidade de extração de água do solo, o que torna importantíssima para a região do ‘polígono das secas’ (Silva et al., 2006).

Em virtude de sua fisiologia, a palma é bem adaptada aos solos do semiárido brasileiro, podendo atingir elevados níveis de rendimento, sendo considerada de grande potencial produtivo e como alternativa sustentável ao desenvolvimento (Nunes, 2011).

Mundialmente, a palma forrageira é utilizada para produção de forragem e nutrição animal, na alimentação humana, na medicina, indústria de cosméticos, fabricação de adesivos, fibras para artesanato, fabricação de papel, corantes, mucilagens, antitranspirantes, ornamentação, entre outras (Chiacchio et al., 2006; Santos et al., 2012).

No Brasil, é cultivada principalmente por pequenos produtores visando à subsistência da pecuária nas regiões semiáridas. No Nordeste, encontra-se a maior área cultivada do mundo, estimada em 600 mil hectares, distribuídos nos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte (Lopes et al., 2012). De grande importância socioeconômica para o Nordeste brasileiro, e cultivada em áreas com acentuado nível de pobreza, longos períodos de estiagem, sendo utilizada principalmente, na alimentação animal, em pequenas propriedades (Menezes et al., 2005).

A produtividade da palma forrageira pode ser reduzida por vários fatores como lesões mecânicas, monocultura e manejo fitossanitário (Méndez-Gallegos et al. 2009; Swart 2009). No entanto, no Brasil, as doenças da palma forrageira têm sido pouco estudadas e, quase todos os trabalhos descrevem apenas a sintomatologia e a patogenicidade dos agentes causais, sendo limitadas as informações quanto a prejuízos, intensidade das doenças e medidas efetivas de controle. Doenças de origem fúngicas são as mais importantes na cultura da palma forrageira, podendo afetar cladódios, sistema radicular e frutos nas fases de pré e pós-colheita (Barbosa et al., 2012).

O controle mais efetivo da fusariose é evitar que o patógeno chegue à plantação, utilizando solo e plantas não infestados (Granata, 2001). Contudo, não existem indicações de medidas efetivas de controle, exceto o plantio na época seca para evitar a podridão da raquete-semente (Barbosa et al., 2012) e remoção e destruição dos cladódios afetados (Barbosa et al., 2012; Souza et al., 2010). No Brasil, não existem produtos químicos registrados para o controle de fusariose da palma forrageira

(MAPA, 2017), sendo necessário o uso do manejo integrado, com a utilização principalmente de controle genético, dando-se prioridade elevada ao teste das coleções de germoplasma (Felker et al., 2002).

A resistência genética no controle de doenças vegetais representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura e sua utilização deveria ser preferida simplesmente, por ser um controle de baixo custo e de mais fácil utilização (Gururani, 2012).

No Brasil, o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) são pioneiros nas pesquisas com palma forrageira, atuando desde 1958 na região Nordeste (Santos et al., 2006), e no melhoramento genético desde o final da década de 1980 (Santos et al., 2005), onde a primeira cultivar Gigante foi lançada em 1998. O IPA possui um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) com mais de 1000 acessos e um programa de melhoramento focado na ampliação da base genética da palma forrageira, através de cruzamentos dirigidos (Santos et al., 1999) e introdução de materiais de diversos países, como México, EUA, África do Sul, Argélia, Chile dentre outros países (Santos et al., 2006). Esse programa de pesquisa é essencial para o desenvolvimento da agricultura sustentável no Nordeste (Mergulhão et al., 2012).

Embora haja poucos materiais no mercado, os clones mais difundidos foram selecionados por vigor, sendo, portanto, heterozigotos. O melhoramento pode aproveitar a variabilidade escondida através da segregação desses materiais via sexual (Santos et al., 2005) e também por cruzamentos dirigidos. De acordo com Menezes et al. (2005) o potencial da palma forrageira não tem o seu devido reconhecimento.

A identificação do germoplasma vegetal que fornecerá os genes de resistência é o primeiro passo para a condução de um programa de melhoramento de palma forrageira (Nuez et al., 2004). Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar genótipos, do banco de germoplasma do IPA, quanto à reação à fusariose, com a finalidade de direcionar as ações futuras do programa de melhoramento da palma forrageira.

Material e método

O ensaio de seleção dos genótipos foi realizado no Laboratório de Fitopatologia - Sede, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), situado em Recife, Pernambuco. Foram avaliados cladódios terciários com aproximadamente seis meses, de plantas com dois anos de idade, de 20 genótipos de palma forrageira dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, provenientes do banco de germoplasma do IPA - Arcoverde, PE. Entre os clones (Tabela 1), encontram-se os genótipos de palma forrageira mais cultivados no estado “gigante”, “redonda”, “miúda” e “mão de moça”, entre outras do programa de melhoramento do IPA.

Foram selecionados quatro isolados de *Fusarium* spp. (F1, F5, F20, F32), *F. oxysporum* (F1 e F5) coletados em Arcoverde e Surubim respectivamente, e *F. equiseti* (F20 e F32) coletados em Ibimirim e Arcoverde respectivamente, com diferentes combinações de agressividade, todos patogênicos e representando dois complexos distintos: Complexo *F. oxysporum* e Complexo *F. incarnatum-equiseti*, todos os isolados demonstraram interações compatíveis com todos os genótipos. As cidades de Arcoverde e Ibimirim pertencentes à Região do Sertão e Surubim a Região do Agreste, PE. O gênero *Fusarium* foi identificado quanto a morfologia, de acordo as descrições feitas por Leslie and Summerell (2006) e através de biologia molecular (Liu et al., 1999; O'Donnell et al., 2008).

Foram utilizados cladódios sadios de palma forrageira, desinfestados superficialmente pela imersão em solução de álcool etílico 70% (v/v), durante 1 a 3 min., NaOCl 2% por 10 min, enxaguados duas vezes em água destilada e secos naturalmente (Mergulhão et al., 2012). Cada cladódios foi dividido em quatro quadrantes (Lopes et al., 2010), realizou-se um ferimento de 5 mm de diâmetro x 2mm de profundidade, em cada quadrante, com o auxílio de um perfurador flambando e nesse orifício foi depositado um disco BDA (Batata-dextrose-ágar) com estruturas do patógeno, de mesmo tamanho. Nos controles negativo foram depositados nos ferimentos um disco contendo somente meio de cultura BDA.

Os cladódios inoculados foram mantidos à temperatura controlada de 25 ± 2 °C em sala de encubação, e 72 horas de câmara úmida no interior de bandejas plásticas umedecidas com água esterilizada autoclavada (ADE) e envolvidas em sacos plásticos pretos também umedecidos com ADE. A severidade da doença foi avaliada aos sete dias após a inoculação (tempo suficiente para desenvolvimento da doença nos genótipos suscetíveis). Após o período de incubação as medidas de área da lesão foram tomadas utilizando-se o programa ASSESS 2.0® (APS) (Lamari, 2008). A contagem de esporos foi realizada na zona da lesão, a partir da área retirada da área lesionada, fixados em FAA 70 (formol - ácido acético - etanol). Posteriormente foram medidos por espectrofotometria (530 nm), ajustado por curva de calibração com equação: $y = 80000000 \times x - 3000000$, sendo: y o resultado do número de esporos e x o valor de absorbância.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em arranjo fatorial com dois fatores, sendo composto pelas combinações dos 20 genótipos x quatro isolados patogênicos (tratamentos), com três repetições (cladódio), sendo cada repetição representada por quatro unidades amostrais (lesão). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de médias Scott knott ($P > 0,05$), utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 (Silva and Azevedo, 2016).

Resultados e Discussão

Os 20 genótipos testados diferiram significativamente entre si pelo teste de Scott knott ($P > 0,05$) tanto em relação ao tamanho da lesão (Tabela 2) quanto em relação à concentração do número de esporos (Tabela 3), indicando assim uma variação de resistência entre os genótipos estudados. Entre os isolados testados também houveram diferenças significativamente entre eles pelo teste de Scott knott ($P > 0,05$) em relação ao crescimento médio da lesão (Tabela 2), mas não diferiram quanto à quantidade de esporos (Tabela 3), indicando assim pouca variação na quantidade de esporos entre os isolados estudados. Nenhum sintoma foi constatado nos cladódios testemunhas no experimento realizado.

Por não haver escala de classificação de resistência à fusariose em palma forrageira, esse trabalho também propõe que se classifique em três classes pelo tamanho da lesão: alta resistência quando a média das notas for inferior a 3,5 cm², moderadamente resistente quando entre 3,6-5,5 cm² e suscetível quando superior a 5,6 cm². Dentre os 20 genótipos estudados, seis foram classificados como altamente resistentes (G4. IPA – 100417; G5. IPA – 200016; G7. IPA - 100429; G8. IPA - 100430; G11. IPA – 200205; G16. IPA – 100424; G17. IPA - 100425) todos clones, exceto G5. IPA – 200016 variedade orelha de elefante mexicana e G11. IPA - 200205 variedade mão de moça, essa última sendo a mais encontrada nas regiões visitadas do sertão, agreste e zona da mata de Pernambuco, não sendo observados dentre eles classificação de reação semelhante a imune, ou seja, sem lesões nos cladódios inoculados, sete foram considerados moderadamente resistentes (G3. IPA - 100419, G6. IPA - 200174; G9. IPA - 100431; G10. IPA – 100004; G15. IPA - 100423; G18. IPA - 100426; G19. IPA - 100427) clones, exceto G6. IPA – 200174 variedade orelha de elefante africana e G10. IPA – 100004 variedade miúda. Enquanto os demais genótipos foram considerados suscetíveis (G1. IPA - 100415; G2. IPA - 100422; G12. IPA - 200021; G13. IPA - 200008; G14. IPA - 200149; G20. IPA - 100428), os quais não deverão seguir para as próximas etapas do melhoramento, por serem suscetíveis a um ou mais dos isolados testados. A partir dos resultados observa-se a existência de variabilidade e possíveis fontes de resistência à fusariose entre os genótipos desenvolvidos pelo IPA e deverão ser utilizados no programa de melhoramento visando resistência à fusariose.

Observamos as menores concentrações de esporos para todos os isolados testados nesses sete genótipos G4. IPA - 100417, G8. IPA - 100430, G9. IPA - 100431, G14. IPA - 200149, G17. IPA - 100425, G18. IPA - 100426, G19. IPA - 100427.

Os dois critérios avaliados tamanho da lesão e concentração de esporos, o genótipo G4. IPA – 100417; G8. IPA – 100430 e G17. IPA - 100425 foram considerado resistente e com baixa concentração de esporos. Os três genótipos G9. IPA - 100431, G18. IPA - 100426, G19. IPA - 100427 foram considerados moderadamente resistentes e com baixa concentração de esporos.

Esses genótipos, fonte de resistência para programas de melhoramento são geralmente avaliadas em condições de campo, porém fontes de resistência podem ser caracterizadas em condições controladas para investigar sua diversidade com relação aos parâmetros avaliados (Azzimonti et al., 2013). De acordo com Lopes et al. (2010), os resultados obtidos em condições de laboratório devem, também, ser realizado em condições de campo, os quais estarão sujeitos as variações climáticas e a repetibilidade dessa resistência. Portanto estudos deverão ser realizados posteriormente nessas condições para a confirmação dos resultados obtidos em sala de incubação na presente pesquisa.

Nesse estudo dos sete genótipos mais promissores, quatro (G4. IPA – 100417; G11. IPA – 200205; G16. IPA – 100424; G17. IPA - 100425) pertencem à espécie *N. cochenillifera*, os quais diferem dos resultados obtidos por Barbosa et al. (2012) onde essa espécie se mostrou suscetível à fusariose. Um genótipo pertencente a *O. stricta* (G5. IPA - 200016) e os outros dois a *O. undulata* (G7. IPA - 100429; G8. IPA - 100430). Esses genótipos de palma forrageira miúda, mão de moça e orelha de elefante mexicana que apresentam resistência à fusariose, também são descritos como resistentes à cochonilha do carmim (Lopes et al. 2009; Vasconcelos et al.; 2009; Gava and Lopes, 2012) gerando uma dupla vantagem em termos de resistência. Não foram encontrados genótipos de palma gigante com boa resistência à fusariose nos genótipos testados nesse trabalho.

Os dados advindos desse trabalho demonstram a importância de conhecer melhor as fontes de resistência de genótipos de palma forrageira à fusariose. A avaliação dos genótipos é útil em programas de melhoramento genético, para escolher fontes contínuas de resistência à fusariose, associadas a importantes características agronômicas, como ciclo precoce, alto rendimento, alta palatabilidade aos rebanhos e menor mortalidade de plantas, visando desenvolver genótipos superiores.

A originalidade do presente estudo reside na avaliação de dois componentes de resistência em conjunto, área média do crescimento da lesão e número de esporos em cladódios destacados de palma forrageira, com uma boa precisão nos resultados. Testes preliminares estabeleceram que o

método de inoculação utilizado neste estudo permitiu uma rápida e precisa avaliação desses parâmetros. Esses genótipos resistentes serão levados a campo, para seleção de linhagens superiores.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos; ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Instituto Agronômico de Pernambuco pela infraestrutura operacional.

Referências

- Azzimonti G, Lannou C, Satche I and Goyeau H (2013) Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. **Plant Pathology** **62**: 970–981.
- Barbosa RS, Cavalcanti VALB, Lopes EB and Araújo E (2012) Doenças da palma forrageira. In: Lopes EB (ed.) **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. Editora EMEPA/FAEPA João Pessoa, p. 81-98.
- Chiacchio FB, Mesquita AS, Santos JR (2006) Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semiárido baiano. **Bahia Agrícola** **7**:39-49.
- Chougui N, Louaileche H, Mohedeb S, Mouloudj Y, Hammaoui Y and Tamendjari A (2013) Physico-chemical characterization and antioxidant activity of some *Opuntia ficus-indica* varieties grown in North Algeria. **African Journal of Biotechnology** **12**: 299–307.
- Felker P, Soulierw C, Leguizamonw G and Ochoa J (2002). A comparison of the fruit parameters of 12 *Opuntia* clones grown in Argentina and the United States. **Journal of Arid Environments** **52**: 361–370.
- Granata, G. Doenças bióticas e abióticas. In: Barbera G, Inglese P and Pimienta-Barrios E (ed.) **FAO - Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Editora EMEPA/FAEPA. João Pessoa, p. 112-122.
- Gava CAT and Lopes EB (2012) Produção de mudas de palma forrageira utilizando fragmentos de cladódios. **Instruções Técnicas Embrapa Semiárido**. Petrolina, folhetos 101, pág. 1-2.

- Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK and Park SW (2012) Plant disease resistance genes: current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **78**: 51-65.
- Lamari, L (2008) **ASSESS 2.0: Image analysis software for disease quantification**. Editora APS, Saint Paul 125p.
- Lara FM (1979) **Princípios de resistência de plantas a insetos**. Editora Livroceres, Piracicaba, 207p.
- Leslie JF and Summerell BA (2006) **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Editora Blackwell Publishing, Iowa, 388p.
- Liu YJ, Whelen S and Hall BD (1999) Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. **Molecular Biology Evolution** **16**:1799-1808.
- Lopes EB, Brito CH, Albuquerque EC and Batista JL (2010) Seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes a cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell, 1929) na Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental** **1**:204-215.
- Lopes EB, Santos DCE and Vasconcelos MF (2012) Cultivo da palma forrageira. In: Lopes EB (ed.) **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. Editora EMEPA/FAEPA João Pessoa, p. 21-60.
- MAPA**. AGROFIT - Sistema de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 abr. 2017.
- Méndez-Gallegos SJ, Talavera-Magaña D, García-Herrera EJ (2009) Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. **Revista Salud Publica y Nutrition** **2**:2-13.
- Menezes RSC, Sampaio EVSB, Salceo IH and Souza FJ (2005) Produtividade de palma em propriedades rurais. In: Menezes RSC, Simões DA and Sampaio EVSB (ed.) **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. Editora da Universitária da UFPE, Recife, 129-142.

Mergulhão ACES, Rito KF, Cordeiro DS, Silva MLRB, Lyra M CCP and Silva M V (2012) Marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira.

Pesquisa Agropecuária Pernambucana 17: 78-82.

Nuez F, Pérez de La Vega M and Carrillo JM (2004) **Resistencia genética a patógenos vegetales.** Editora de la Universidade Politécnica de Valencia, Valencia, 568p.

Nunes CS (2011) Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde 6:** 58 – 66.

O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N and Geiser DM (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal Clinical Microbiology 46:** 2477-90.

Rebman JP and Pinkava DJ (2001) *Opuntia* cacti of North America - an overview. **Florida Entomologist 84:** 474-483.

Santos DC, Araújo LF, Lopes EB and Vasconcelos MF (2012) Usos e aplicações da palma forrageira. In: Lopes EB (ed.) **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino.** Editora EMEPA/FAEPA João Pessoa, p. 99-150.

Santos DC, Lira MA and Dias FM (2005) Melhoramento genético da palma forrageira. In: Menezes RSC, Simões DA and Sampaio EVSB (ed.) **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso.** Editora Universitária da UFPE, Recife, p. 27-42.

Santos DC, Lira MA, Farias I and Santos MVF (1999) Programa de melhoramento e coleção de palma forrageira. In: Queiróz MA, Goedert CO and Ramos SRR (ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro.** Editora Embrapa, Petrolina, p. 987-989.

Santos DC, Santos MVF, Farias I, Dias FM and Lira MA (2001) Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*).

Revista Brasileira de Zootecnia 1:12-17.

Silva CCF and Santos LC (2006) Palma Forrageira (*Opuntia ficus - indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET 7**: 1-13.

Silva FAS and Azevedo CAV (2016) The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research 11**: 3733-3740.

Simões DA, Santos DC and Dias FM (2005) Introdução da palma forrageira no Brasil. In: Menezes RSC, Simões DA and Sampaio EVSB. (eds). **A Palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. 2ªed. Recife: ed universitária da UFPE. p.13-26.

Souza AEF, Nascimento LC, Araújo E, Lopes EB and Souto FM (2010). Ocorrência e identificação de agentes etiológicos de doenças de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. **Biotemas 23**: 11-20.

Swart WJ (2009) Strategies for the management of cactus pear diseases: a global perspective. **Acta Horticulturae 811**: 207–216.

Vasconcelos AGV, Lira MA, Cavalcanti VLB, Santos MVF, Willadino I (2009) Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp). **Revista Brasileira de Zootecnia 38**: 827-831.

TABELA 1: Genótipos de diferentes espécies de palma forrageira provenientes do banco de germoplasma do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) – Arcoverde, PE, Brasil

| Genótipo | Espécie | Especificação |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| G1. IPA-100415 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone 21 – 1 |
| G2. IPA-100422 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone 21 – 4 |
| G3. IPA-100419 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone 21 – 12 |
| G4. IPA-100417 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone 21 – 25 |
| G5. IPA- 00016 | <i>Opuntia stricta</i> | Orelha de elefante mexicana |
| G6. IPA-200174 | <i>Opuntia undulata</i> | Orelha de elefante africana |
| G7. IPA-100429 | <i>Opuntia undulata</i> | Clone o. e. a. – 1 |
| G8. IPA-100430 | <i>Opuntia undulata</i> | Clone o. e. a. – 6 |
| G9. IPA-100431 | <i>Opuntia undulata</i> | Clone o. e. a. – 9 |
| G10. IPA-100004 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Miúda ou Doce |
| G11. IPA-200205 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Mão de moça |
| G12. IPA-200021 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Forageira 21 |
| G13. IPA-200008 | <i>Opuntia atropes</i> | Forageira 8 |
| G14. IPA-200149 | <i>Opuntia lorreyi</i> F.A.C. | Palma azul |
| G15. IPA-100423 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone telado 23 |
| G16. IPA-100424 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone telado 24 |
| G17. IPA-100425 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone telado 25 |
| G18. IPA-100426 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone telado 26 |
| G19. IPA-100427 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone telado 27 |
| G20. IPA-100428 | <i>Nopalea cochenillifera</i> | Clone telado 28 |

TABELA 2: Tamanho médio de lesão (cm²) em cladódios de palma forrageira

| Genótipos/Patógeno | Área média da lesão (cm ²) | | | |
|------------------------|--|--------------|---------------|---------------|
| | Isolado F1 | Isolado F5 | Isolado F20 | Isolado F32 |
| G1. IPA-100415 | 2,5* ±0,8 b** A | 3,6 ±0,4 d B | 6,4 ±1,9 b C | 9,0 ±1,2 c C |
| G2. IPA-100422 | 3,6 ±0,1 c | 3,7 ±0,9 d A | 7,3 ±1,4 b B | 10,3 ±3,2 d B |
| G3. IPA-100419 | 3,2 ±0,6 c | 2,6 ±0,5 c A | 5,4 ±1,9 b B | 3,8 ±1,1 b B |
| G4. IPA-100417 | 1,6 ±0,3 a | 2,2 ±0,3 c B | 3,9 ±1,0 a C | 2,5 ±1,0 a B |
| G5. IPA-200016 | 3,3 ±0,2 c | 2,3 ±0,5 c A | 2,8 ±1,2 a A | 3,6 ±1,0 b A |
| G6. IPA-200174 | 6,8 ±0,2 c | 2,2 ±0,4 c A | 5,0 ±0,6 a B | 4,9 ±2,5 c B |
| G7. IPA-100429 | 3,2 ±0,6 c | 1,9 ±0,4 b A | 5,7 ±0,6 b C | 3,5 ±0,4 b B |
| G8. IPA-100430 | 3,7 ±0,8 c | 1,2 ±0,2 a A | 3,1 ±0,3 a C | 2,0 ±0,9 a B |
| G9. IPA-100431 | 3,0 ±0,9 b | 2,7 ±0,2 c A | 6,7 ±0,2 b B | 5,5 ±2,3 c B |
| G10. IPA-100004 | 2,8 ±0,7 b | 2,3 ±0,4 c A | 5,3 ±1,9 b B | 3,8 ±1,9 b B |
| G11. IPA-200205 | 3,6 ±1,0 c | 1,7 ±0,6 b C | 3,2 ±1,6 a B | 2,0 ±1,4 a A |
| G12. IPA-200021 | 3,6 ±0,3 c | 2,7 ±0,5 c A | 7,0 ±0,6 b B | 6,7 ±0,8 c B |
| G13. IPA-200008 | 4,9 ±1,7 c | 1,7 ±0,3 b A | 4,1 ±2,5 a B | 3,6 ±0,6 b B |
| G14. IPA-200149 | 5,2 ±2,0 c | 3,8 ±0,5 d A | 16,6 ±0,0 c B | 16,6 ±0,0 d B |
| G15. IPA-100423 | 4,4 ±1,4 c | 1,5 ±0,7 a A | 3,1 ±1,2 a B | 4,4 ±2,0 c B |
| G16. IPA-100424 | 3,7 ±1,7 c | 1,7 ±0,1 b A | 3,8 ±1,1 a B | 7,1 ±0,6 c C |
| G17. IPA-100425 | 4,3 ±1,8 c | 1,9 ±0,7 b A | 3,4 ±0,2 a B | 3,1 ±1,2 b B |
| G18. IPA-100426 | 2,6 ±0,5 b | 2,4 ±0,7 c A | 7,4 ±0,8 b B | 5,0 ±3,1 c B |
| G19. IPA-100427 | 2,8 ±0,8 b | 2,5 ±0,8 c A | 5,9 ±0,5 b B | 6,0 ±2,2 c B |
| G20. IPA-100428 | 4,5 ±0,7 c | 3,2 ±0,9 d A | 4,4 ±1,1 a A | 4,5 ±1,4 c A |
| C.V. | 12,53% | | | |

*Desvio padrão de média.

**Médias seguidas tanto na linha quanto na coluna não diferem entre si pelo teste Scott knott a 5% de probabilidade.

TABELA 3: Número de esporos (0,5 cm²) de lesão nos cladódios causado pela fusariose (*Fusarium oxysporum*; *F. equiseti*) nos diferentes genótipos de palma forrageira.

| Genótipos/ Patógeno | Número de esporos (0,5 cm ²) | | | |
|------------------------|--|----------------|--------------|--------------|
| | Isolado F1 | Isolado F5 | Isolado F20 | Isolado F32 |
| G1. IPA-100415 | 1,8* ±0,3** a*** | B 2,3 ±1,3 a B | 2,3 ±0,4 a B | 3 ±0,5 a A |
| G2. IPA-100422 | 2 ±0,6 a | A 1,7 ±0,6 b A | 2,1 ±0,2 a A | 2 ±0,8 b A |
| G3. IPA-100419 | 1,7 ±0,2 a | A 1,7 ±0,1 b A | 1,8 ±0,1 a A | 1,9 ±0,6 b A |
| G4. IPA-100417 | 0 ±0 c | A 0 ±0 c A | 0 ±0 b A | 0 ±0 d A |
| G5. IPA-200016 | 1 ±0,7 b | B 1,8 ±0,6 b A | 1,7 ±0,3 a A | 1,9 ±1,4 b A |
| G6. IPA-200174 | 0,6 ±0,6 b | B 1,7 ±2,9 b A | 0,4 ±0,6 b B | 0,4 ±0 c B |
| G7. IPA-100429 | 1,4 ±0,3 a | B 2 ±0,6 a A | 1,4 ±1,1 a B | 2,4 ±1,6 a A |
| G8. IPA-100430 | 0,2 ±0,1 c | A 0,4 ±0,2 c A | 0,6 ±0,2 b A | 0,5 ±0 c A |
| G9. IPA-100431 | 0,3 ±0,6 c | A 0,4 ±1,0 c A | 0,8 ±0,1 b A | 0 ±0 d A |
| G10. IPA-100004 | 1,8 ±0,4 a | A 1,3 ±0,6 b A | 1,2 ±1,1 a A | 1,8 ±0,4 b A |
| G11. IPA-200205 | 2,3 ±0,4 a | A 2,4 ±1,7 a A | 1,8 ±0,5 a B | 1,7 ±0,5 b B |
| G12. IPA-200021 | 1,7 ±0,2 a | A 1,6 ±0,8 b A | 1,6 ±0,5 a A | 1,5 ±0,1 b A |
| G13. IPA-200008 | 1,9 ±0,8 a | B 2,5 ±1,2 a A | 1,5 ±1,0 a B | 2,3 ±0,1 a A |
| G14. IPA-200149 | 0,7 ±0,4 b | A 0,4 ±0,6 c A | 0,6 ±0,7 b A | 0,6 ±0 c A |
| G15. IPA-100423 | 1 ±0,7 b | B 1,8 ±0,6 b A | 1,7 ±0,3 a A | 1,9 ±1,4 b A |
| G16. IPA-100424 | 1,9 ±0,3 a | A 1,6 ±0,4 b A | 1,7 ±0,7 a A | 1,4 ±1,3 b A |
| G17. IPA-100425 | 0,6 ±0,3 b | A 0,3 ±0,1 c A | 0,3 ±0,2 b A | 1,1 ±1,0 c A |
| G18. IPA-100426 | 0 ±0 c | A 0 ±0 c A | 0 ±0 b A | 0 ±0 d A |
| G19. IPA-100427 | 0 ±0 c | B 0 ±0 c B | 0,6 ±0,1 b A | 0,7 ±0,1 c A |
| G20. IPA-100428 | 2 ±0,4 a | A 1,4 ±0,6 b A | 1,2 ±0,5 a A | 1,5 ±0 b A |
| C.V. | 32,30% | | | |

*Valores multiplicados por 10⁷.

**Desvio padrão de média.

***Médias seguidas de mesma letra na tanto na linha como na coluna não difere pelo teste Scott knott a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os resultados mostraram que os sete isolados de leveduras (URM7631 *Cystobasidium slooffiae*, URM7632 *Candida carpophila*, URM7633 *Rhodotorula mucilaginosa*, URM7634 e URM7635 *Aureobasidium pullulans*, URM7636 *Cyrenella elegans* e URM7637 *Debaryomyces hansenii*) estudados nesse trabalho apresentam-se como promissoras fontes de compostos bioativos, entre eles: Hexahidropirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona, 3,6-bis (2-metilpropil) -2,5-Piperazinediona, o ácido cis-6-octadecenóico, Ácido adípico, Ftalato dietila e Lupeol, com ação antifúngica.
2. Todos os isolados de leveduras foram produtores de biofilme o que os torna mais resistentes a antifúngicos e também apresentaram toxinas *Killer* que tem capacidade de inibir outros patógenos.
3. Esse é o primeiro relato de leveduras nativas de palma forrageira no Mundo.
4. O isolado URM7632 de *C. carpophila* e seu extrato clorofórmico demonstraram eficiência no controle de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium equiseti* de palma forrageira.
5. Nos ensaios com seleção de genótipos foram destacados sete genótipos como sendo os mais promissores quanto à resistência à fusariose (G4. IPA – 100417; G5. IPA – 200016; G7. IPA - 100429; G8. IPA - 100430; G11. IPA – 200205; G16. IPA – 100424; G17. IPA - 100425) e todos poderão ser utilizados por melhoristas em futuros cruzamentos, para obtenção de palma forrageira resistente à fusariose.
6. É importante informar, este é o primeiro relato do *Fusarium oxysporum* como fungo fitopatogênico no Brasil e *F. equiseti* no Mundo de palma forrageira.