



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Eficácia de leveduras no biocontrole da mancha aquosa em meloeiro

Edilaine Alves de Melo

**Recife-PE
2012**

EDILAINÉ ALVES DE MELO

**EFICÁCIA DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA MANCHA AQUOSA EM
MELOEIRO**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Elineide Barbosa de Souza

Co-orientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano

**RECIFE-PE
2012**

Ficha catalográfica

M528e Melo, Edilaine Alves de
Eficácia de leveduras no biocontrole da mancha aquosa
em meloeiro / Edilaine Alves de Melo. -- Recife, 2012.
57 f. : il.

Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2012.
Referências.

1. *Acidovorax citrulli* 2. *Pichia anomala* 3. *Rhodotorula
aurantiaca* 4. *Rhodotorula glutinis* 5. Promoção de
crescimento 6. Toxinas killer I. Souza, Elineide Barbosa de,
orientadora II. Título

CDD 634.9

**EFICÁCIA DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA MANCHA AQUOSA EM
MELOEIRO**

EDILAINE ALVES DE MELO

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 27/07/2012

ORIENTADORA:

Prof^ª Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Delson Laranjeira

Dr. Adriano Márcio Freire Silva

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Figueira de Mello

**RECIFE-PE
2012**

A Deus, por ter me dado amor, paciência e fé durante toda essa caminhada.

Aos meus pais, Edimucio e Aparecida pelo amor, apoio e incentivo, permitindo que eu seguisse em frente sem desistir jamais.

DEDICO

Ao meu noivo, Marciel, pelo amor e paciência durante todo o tempo, me apoiando em todas as decisões.

Aos meus irmãos Elizangila e Erivaldo por todo apoio e amizade na minha vida.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor, força e principalmente pela paciência concedida, permitindo que eu chegasse até aqui.

As minhas queridas orientadoras Dra. Elineide Barbosa de Souza e Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano, pela orientação, amizade, apoio e ensinamentos tão valiosos ao longo dessa caminhada.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, e a FACEPE pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, Edimucio e Aparecida, pelo amor, incentivo e confiança em todas as fases da minha vida.

Ao meu noivo, Marciel, que mesmo distante me deu amor, carinho e incentivo em todos os momentos compartilhados.

Aos meus irmãos, Erivaldo e Elizangila pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos de dificuldades.

Aos meus tios Zenilda e Giovane por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando, durante todo o tempo.

A minha amiga Luciana, pela sincera amizade e por estar sempre ao meu lado, compartilhando cada momento, ao longo de tantos anos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelas contribuições necessárias à minha formação.

Aos meus companheiros do Laboratório de Fitobacteriologia: Luciana, Liliana, Mirtis, Tássia, Conrado, Mirzânia, Kátia, Chris, Iva, Marco Aurélio, Marcos, Adriano, Aldenir, Luydson, Willams, Greecy, Alexandre, Meridiana, Claudeana e Jéssica pela amizade e por transformar o trabalho diário em momentos tão agradáveis.

Ao Sr. Luiz Coelho, por suas contribuições valiosas em todos os momentos difíceis e trabalhosos da casa de vegetação.

E aos meus amigos Emmanuele, Adelmo e Gisely por todo apoio e amizade durante a realização dos experimentos.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I.....	09
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
Importância econômica da cultura do meloeiro.....	10
<i>Acidovorax citrulli</i> e a mancha aquosa do meloeiro.....	11
Controle biológico da mancha aquosa.....	15
Leveduras como agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO II.....	32
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Material e métodos.....	35
Obtenção e cultivo de <i>Acidovorax citrulli</i> e leveduras.....	35
Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Acidovorax citrulli</i> a leveduras.....	36
Proteção de plântulas de meloeiro com leveduras.....	37
Proteção de plantas de meloeiro com leveduras.....	38
Supressão da transmissão de <i>Acidovorax citrulli</i> por sementes pelo tratamento com leveduras.....	38
Efeito de leveduras no crescimento do meloeiro.....	39
Identificação das leveduras.....	39
Análises estatísticas.....	40
Resultados	40
Isolamento e sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Acidovorax citrulli</i> a leveduras.....	40
Proteção de plântulas e plantas de meloeiro com leveduras.....	40
Supressão da transmissão de <i>Acidovorax citrulli</i> por sementes pelo tratamento com leveduras.....	41
Efeito de leveduras no crescimento do meloeiro.....	41
Discussão.....	42
Agradecimentos.....	46
Referências.....	46
CONCLUSÕES GERAIS.....	57

RESUMO GERAL

A mancha aquosa causada por *Acidovorax citrulli*, é uma das doenças mais severas do meloeiro (*Cucumis melo*) e um dos principais problemas para o Nordeste, a principal região produtora de melão do Brasil. Estratégias para o controle da mancha aquosa incluem tratamentos químicos e físicos das sementes e químico da parte aérea da planta. Uma vez que esses tratamentos não são eficientes e cultivares resistentes de meloeiro inexistem, outras estratégias têm sido investigadas, dentre elas o controle biológico. Os objetivos deste trabalho foram analisar a eficiência de leveduras no biocontrole dessa doença pela proteção de plântulas e plantas e pelo tratamento de sementes de meloeiro, além de verificar a atividade *in vitro* contra o patógeno e a promoção do crescimento de plantas de meloeiro. Nenhuma das 60 leveduras testadas inibiu o crescimento do patógeno, porém os isolados LMA1 (*Rhodotorula aurantiaca*), LMS (*R. glutinis*) e CC-2 (*Pichia anomala*) destacaram-se como os mais eficientes na proteção de plântulas. Quando testadas em plantas e sementes, LMA1 e CC-2 mantiveram a eficácia. Em plantas, as reduções de índice de doença (ID) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em relação à testemunha foram de até 58,6 e 47,2%, respectivamente, enquanto que o tratamento de sementes reduziu o ID e AACPD em até 34,3 e 45,5%. Esses isolados não promoveram o crescimento do meloeiro e não produziram toxinas killer *in vitro*. *R. aurantiaca* (LMA1) e *P. anomala* (CC-2) foram eficazes na proteção de plântulas e plantas e no tratamento de sementes de meloeiro. Portanto, a utilização dessas leveduras junto a outros métodos de controle, tais como cultivares resistentes e utilização de compostos cúpricos, será importante no manejo integrado da mancha aquosa.

Palavras-Chave: *Acidovorax citrulli* • *Pichia anomala* • *Rhodotorula aurantiaca* • *Rhodotorula glutinis* • promoção de crescimento • toxinas killer

GENERAL ABSTRACT

The bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax citrulli* is one of the most severe diseases of melon (*Cucumis melo*), and a major problem in the Northeast, the main melon producing region of Brazil. Strategies for control of bacterial blotch include chemical and physical treatments of seeds and chemical sprays of the plant canopy. Since these treatments are not efficient and resistant melon cultivars do not exist, other strategies have been studied, including biological control. Our objectives were to analyze the efficiency of yeasts in the biocontrol of this disease by protecting seedlings and plants, and by treating melon seeds; and to verify the *in vitro* activity against the pathogen and the growth promotion of melon plants. None of the 60 yeasts inhibited the growth of the pathogen, but the isolates LMA1 (*Rhodotorula aurantiaca*), LMS (*R. glutinis*) and CC-2 (*Pichia anomala*) stood out as the most effective in protecting seedlings. When tested in plants and seeds, LMA1 and CC-2 maintained effectiveness. In plants, the reductions in disease index (ID) and area under the disease progress curve (AUDPC) compared to the control reach 58.6 and 47.2%, respectively, while seed treatments reduced ID and AUDPC up to 34.3 and 45.5%. These isolates did not promote the growth of melon plants and did not produce killer toxins *in vitro*. *R. aurantiaca* (LMA1) and *P. anomala* (CC-2) were effective in protecting plants and seedlings and for seed treatment of melon. Therefore, the use of these yeasts jointly with other control methods, such as resistant varieties and copper compounds, is important in integrated management of bacterial fruit blotch.

Keywords: *Acidovorax citrulli* • *Pichia anomala* • *Rhodotorula aurantiaca* • *Rhodotorula glutinis* • growth promotion • toxins killer

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância econômica da cultura do meloeiro

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma espécie da família Cucurbitaceae, cuja produção é uma atividade de grande importância econômica para o Nordeste brasileiro (MARIANO; SILVEIRA, 2004). Os frutos de meloeiro apresentam alto valor comercial, se destacando em relação a outras espécies vegetais. O sabor e aroma peculiares dos frutos fazem com que essa hortaliça seja muito apreciada no Brasil e no mundo, sendo consumida em larga escala em países da Europa, nos Estados Unidos e no Japão (SILVA; COSTA, 2003).

A produção brasileira de melão cresceu 18,7% entre 2009 e 2010, passando de 402.959 mil para 478.431 mil toneladas. Nesse período, houve um aumento de 7,5% da área cultivada com melão, passando de 17.559 ha para aproximadamente 18.870 ha. O Nordeste é a principal região produtora, sendo responsável por 16.308 ha dessa área com um rendimento médio de 28 toneladas/ha. O estado Rio Grande do Norte destaca-se como o maior produtor dessa região, seguido do Ceará, Bahia e Pernambuco (IBGE, 2009; IBGE, 2010). O Brasil em 2010 exportou 759 mil toneladas de frutas frescas, sendo o melão responsável por 23,41 % desse montante, liderando o ranking com 178 mil toneladas (IBRAF, 2010).

O aumento da área cultivada, a elevação da produtividade de frutos e o desenvolvimento de novos materiais genéticos, têm proporcionado melhorias no manejo da cultura do meloeiro (CRISÓSTOMO et al., 2002). Na região Nordeste, as grandes empresas adotam um alto nível tecnológico no desenvolvimento da cultura, como uso de irrigação localizada por gotejamento, da cobertura plástica de polietileno (mulch) e da manta térmica tecido-não-tecido (TNT) (SANTOS et al., 2001).

Nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco, as regiões produtoras caracterizam-se pela presença de empresas de médio e grande porte que lideram este agronegócio, mas também de muitos pequenos produtores que escoam a produção via grandes empresas (BUAINAIN; BATALHA, 2007) e são gerados cerca de 60 mil empregos diretos e indiretos em cultivos de meloeiro (TAVARES, 2002).

As doenças e pragas do meloeiro, como de outras culturas, podem causar prejuízos econômicos pela redução da quantidade e/ou qualidade de frutos comercializados (MENEZES et al., 2000). Essa cultura apresenta algumas características que dificultam o manejo fitossanitário, dentre as quais se destacam o ciclo curto, com média de 60 dias e o plantio de forma escalonada, favorecendo a disseminação de pragas e patógenos de um cultivo mais antigo para um recém-plantado (BLEICHER; MELO, 1998; FERNANDES et al., 2000).

Dentre os patógenos que afetam o meloeiro, as bactérias vêm assumindo uma grande importância, destacando-se no Brasil *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.) Schaad et al. (Sin: *A. avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Willems et al. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad et al.; *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Hu et al.), como a mais importante, além de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones); *Pseudomonas syringae* (Van Hall); *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith); *Pseudomonas cichorri* (Swingle) Stapp; *Pseudomonas* sp. (Migula) e *Xanthomonas campestris* pv. *curcubitae* (Bryan) Dye. Em outros países produtores, *Erwinia ananas* (Serrano) e *Erwinia tracheiphila* (Smith) também têm sido assinaladas como bacterioses do meloeiro (SALES JUNIOR; MENEZES, 2001; TAVARES, 2002).

A. citrulli é o agente etiológico da mancha aquosa, importante doença bacteriana para as culturas do meloeiro e melancia (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. e Nakai), no Brasil e no mundo.

2. *Acidovorax citrulli* e a mancha aquosa do meloeiro

Acidovorax citrulli é uma bactéria Gram negativa, na forma de bastonete, aeróbia e móvel por um flagelo polar. Apresenta bom crescimento em meio de cultura de rotina como ágar nutritivo - extrato de levedura - dextrose (NYDA), onde forma colônias pequenas com 0,7 a 1,0 mm, brancas ou cremes, e não fluoresce em meio King B (SCHAAD et al., 1978). Possui reações positivas para os testes de catalase, oxidase, urease e lipase e não hidrolisa a arginina (SCHAAD et al., 1978). Utiliza os carboidratos fermentáveis glucose, galactose, ramnose, sacarose, lactose, maltose, amido, inulina, manitol, dulcitol, sorbitol e salicina (CAVALCANTI et al., 2005; SCHAAD et al., 1978). Cresce a temperatura de 41°C, mas não a 4°C, com máximo desenvolvimento a 35°C; na faixa de pH de 5,0 a 9,0, com máximo em pH 7,0; e nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% de NaCl, com crescimento máximo a 2% e mínimo a 4% (CAVALCANTI et al., 2005). Isolados da espécie apresentam reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) variada (RANE; LATIN, 1992; SILVEIRA et al., 2003; SOMODI et al., 1991).

O primeiro relato da mancha aquosa ocorreu na cultura da melancia nos Estados Unidos em 1965, onde foram observadas manchas encharcadas em plântulas (WEBB; GOTH, 1965). Em melão, a sua primeira ocorrência também foi nesse país, só que 31 anos mais tarde, em 1996, com incidência em mais de 50% dos frutos em campos agrícolas no Texas (ISAKEIT et al., 1997).

No Brasil, a mancha aquosa foi detectada em meloeiro pela primeira vez no Rio Grande do Norte no ano de 1997 (ASSIS et al., 1999), em seguida no Ceará (SANTOS; VIANA, 2000), Pernambuco (MARIANO; SILVEIRA, 2004), Rio Grande do Sul (UENO et al., 2003) e Bahia (MARIANO et al., 2004), com altos índices de infecção, depreciando comercialmente o fruto de melão (MARIANO; SILVEIRA, 2004). Essa doença tem atingido proporções epidêmicas nos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará, que despontam como principais pólos de produção, causando perdas em torno de 40 a 50%, podendo atingir até 100 %, sobretudo em períodos chuvosos (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001).

Tantos nos Estados Unidos como no Brasil os surtos dessa bacteriose se deveram à alta transmissibilidade e rápida disseminação do patógeno pela semente e desenvolvimento da doença sob condições ambientais favoráveis (ZAMBOLIM et al., 2011). A transmissão de *A. citrulli* por sementes merece atenção especial, já que o uso pelos agricultores de sementes produzidas na própria lavoura para novos plantios é constante (MARIANO; SILVEIRA, 2007). Essa transmissão varia de 33 a 91% e de 10 a 69%, respectivamente, segundo O'Brien e Martin (1999) e Oliveira et al. (2001). Em lotes de sementes de melancia contendo uma semente contaminada com a bactéria em concentrações diversas (1×10^1 a 1×10^7 UFC/ml), foram obtidos níveis de transmissão de *A. citrulli* variando de 16,7 a 100% (DUTTA et al. 2011).

Em sementes de melancia oriundas de frutos infectados *A. citrulli* sobreviveu durante 12 meses, demonstrando a importância desse ambiente para a sobrevivência de *A. citrulli*. (HOPKINS et al., 1996). Além de sementes, a bactéria sobrevive em plântulas voluntárias e nas hospedeiras alternativas: abóbora (*Cucumis maxima* L), pepino (*Cucumis sativus* L.), chuchu (*Sechium edule* L.) (ROBBS et al., 1991), melão-pepino (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud) (OLIVEIRA et al., 2003), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), cabaça (*Lagenaria vulgaris* Ser.), maxixe (*Cucumis anguria* L.), abóbora moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne), berinjela (*Solanum melongena* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L), mamoeiro (*Carica papaya* L.), bucha (*Luffa cylindrica* M. Roem.) e melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) (NASCIMENTO et al., 2004). Cucurbitáceas selvagens como *Citrullus lanatus* var. *citroides* (Bailey) pode hospedar *A. citrulli* e possivelmente atua como um reservatório da bactéria (O'BRIEN; MARTIN, 1999). *A. citrulli* sobrevive também em tecidos de folhas e frutos de meloeiro incorporados ao solo nas profundidades de 0,5 e 10 cm por 28 dias, e a 15 cm por 14 dias. No solo na ausência de uma planta hospedeira, a bactéria sobrevive menos de uma semana (OLIVEIRA, 2008).

Os sintomas da mancha aquosa podem ser observados em vários estádios de desenvolvimento da planta, desde plântulas oriundas de sementes contaminadas até a polpa do fruto. Geralmente a doença é introduzida no cultivo por meio de sementes contaminadas, daí a importância de sementes certificadas no plantio (BARBOSA et al., 2010). Em flores a infecção é assintomática. No entanto, em melancia, observou-se que as flores são potenciais portas de entrada para posterior infecção de frutos e sementes (WALCOTT et al, 2003).

Plântulas provenientes de sementes contaminadas podem entrar em colapso total (SANTOS; VIANA, 2000), ou, apresentar extensas manchas encharcadas que progridem para verde-escuras e marrons nos cotilédones, necrose no hipocótilo, tombamento e morte (MARIANO; SILVEIRA 2007).

Nas folhas, as manchas são inicialmente pequenas, com aspecto oleoso e coloração verde-clara, tornando-se posteriormente marrom-escuro (SANTOS; VIANA, 2000), com ou sem halo (HOPKINS et. al., 1996). As lesões são frequentemente observadas ao longo das nervuras da folha e, dependendo das condições climáticas e da cultivar, podem crescer e coalescer, e a necrose estender-se por quase toda a área foliar (MARIANO; SILVEIRA 2007).

As lesões nos frutos apresentam-se inicialmente como pontos de aspecto oleoso de 1 a 5 mm de diâmetro (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001), tornando-se posteriormente manchas marrons, necróticas com ou sem rachaduras no centro (SANTOS; VIANA, 2000). As lesões necróticas localizam-se na superfície do fruto que não entra em contato com o solo, progredindo em torno de sete a dez dias, atingindo uma área maior, antes da colheita. A bactéria, em geral, coloniza a polpa do fruto, contaminando as sementes externa e internamente (MARIANO; SILVEIRA 2007).

Para o controle da mancha aquosa, a principal medida a ser tomada é a utilização de sementes livres da bactéria (SANTOS; VIANA, 2000; VIANA et al., 2000). *A. citrulli* tem sido isolada da casca e do embrião de sementes, indicando contaminação interna e externa (RANE; LATIN, 1992) que dificulta a eficácia do tratamento de sementes. No entanto, tratamentos químicos e físicos da semente têm sido recomendados: estreptomicina por 16 horas (1,0 mg/ml) (SOWELL; SCHAAD, 1979); ácido clorídrico 1,8% por 5 minutos; hipoclorito de sódio 0,5% por 20 minutos (RANE; LATIN, 1992); ácido láctico 2% por 20 minutos; imersão em água quente a 52° C por 10 minutos (SANTOS; VIANA, 2000); acibenzolar- S- metil 0,01% (ASM) por 20 minutos; sulfato de estreptomicina 0,1% por 30 minutos; sulfato de estreptomicina 0,1% + solução salina 1,5% por 30 minutos (MORAES et al., 2002); ácido peroxiacético 1.600 µg/ml por 30 minutos, seguindo-se secagem com baixa umidade a 40°C por 24 horas (HOPKINS et al., 2003); e sulfato de estreptomicina 0,1%,

kasugamicina 0,1%, oxicleto de cobre 0,5% e Bion 0,01%, isoladamente ou em mistura por 30 minutos (SILVA NETO et al., 2003).

Para evitar a doença em cultivos estabelecidos, devem ser efetuadas aplicações alternadas, a cada sete dias, de defensivos de efeito bactericida, como os fungicidas cúpricos (VIANA et al., 2000) iniciando-se na floração, ou antes, e prolongando-se até a maturação dos frutos (WALCOTT et al., 2001), quando as barreiras morfológicas à penetração do patógeno parecem aumentar (FRANKLE et al., 1993).

Como medidas culturais de controle, são indicadas: erradicar plântulas/plantas com sintomas de mancha aquosa; manter temperatura e umidade em níveis baixos em casa de vegetação e estufa (DIAS et al., 1998); destruir restos de culturas, principalmente em campos infectados; diminuir a movimentação de pessoas ou implementos no campo quando as plantas estiverem molhadas (orvalho, irrigação, chuva); evitar plantio direto (ISAKEIT, 1999; O'BRIEN; MARTIN, 1999); fazer rotação de culturas por pelo menos três anos, não utilizando hospedeiros alternativos de *A. citrulli*; evitar plantio em áreas úmidas ou em períodos de muitas chuvas; efetuar adubação equilibrada, sem excesso de nitrogênio; eliminar cucurbitáceas silvestres, como melão-pepino (OLIVEIRA et al., 2003), bucha, cabaça e melão-de-são-caetano (NASCIMENTO et al., 2004).

Várias seleções para resistência à mancha aquosa têm sido realizadas com acessos e variedades de meloeiro e outras curcubitáceas (BAHAR et al., 2009; BUSO et al. 2002; CARVALHO, 2012; HOPKINS et al. 1993; HOPKINS; THOMPSON 2002; SOWELL; SCHAAD, 1979). No entanto, variações nos resultados frequentemente têm sido encontradas, devido principalmente a diferenças nas condições experimentais (CARVALHO, 2012; HOPKINS; THOMPSON, 2002) e a alta variabilidade dos isolados utilizados (HOPKINS, 1993).

As medidas citadas acima não têm se mostrado eficientes no manejo da mancha aquosa, sendo necessária a busca de novas alternativas de controle para essa doença, a exemplo do controle biológico. Ressalta-se que o cultivo do melão orgânico tem obtido sucesso no Submédio do Vale do São Francisco, conforme a Associação Comercial, Industrial, Agropecuária e Serviços de Petrolina (ACISP), em Petrolina-PE (TAVARES, 2002). Logo, a adoção de práticas de controle biológico de doenças de plantas na região seria de grande importância para os produtores, contribuindo para a continuidade do sucesso da produção orgânica, além de ser um componente a mais no manejo da doença em cultivo convencional.

3. Controle biológico da mancha aquosa

O uso intensivo de agroquímicos na agricultura tem acarretado diversos problemas ambientais, tais como: a contaminação de alimentos, do solo, da água e dos animais; a resistência de patógenos, pragas e plantas invasoras; e problemas a saúde dos agricultores.

Dentre as alternativas para a redução do uso de agroquímicos o controle biológico é um das mais discutidas, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural quanto realizar a introdução massal de antagonistas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Controle biológico, segundo Baker e Cook (1974) Consiste na redução da quantidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocados por um patógeno ou parasita, nos seus estádios de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas.

Os mecanismos envolvidos são: parasitismo direto; predação; competição por nutrientes e nichos ecológicos; produção de antibióticos, bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos; competição trófica de elementos essenciais ao desenvolvimento do patógeno; e estímulo do hospedeiro, ativando mecanismos de resistência (ROMEIRO, 1995). A introdução de antagonistas adaptados ao microhabitat do patógeno é um aspecto relevante para muitos sistemas planta-patógeno, mas o sucesso do biocontrole dependerá da natureza das propriedades e mecanismos de ação do antagonista (MELO, 1998).

Alguns estudos comprovaram a eficiência de bactérias antagonistas para o biocontrole da mancha aquosa em meloeiro e outras cucurbitáceas. Fessehaie e Walcott (2005) relataram que o tratamento de sementes de melancia com *A. citrulli* AAA99-2 não patogênico ou *P. fluorescens* (Flugge) A506 foi eficaz na redução da incidência da doença em plântulas, e que em frutos oriundos de flores contaminadas e tratadas com esses antagonistas ocorreu uma menor porcentagem de sementes de melancia infectadas.

Através da microbiolização de sementes de meloeiro artificialmente infectadas com *A. citrulli*, os endofíticos ENM5 (*Bacillus* Cohn sp.), ENM9 (*Bacillus cereus* Frankland e Frankland), ENM13 (*Bacillus* sp.), ENM16 (*B. cereus*), ENM32 (*Bacillus subtilis* Cohn) e ENM43 (*Bacillus* sp.), revelaram potencial para o controle da mancha aquosa (OLIVEIRA et al., 2006). LU e LUO (2004) também descreveram uma bactéria endofítica não identificada e isolada de meloeiro Hami (*Cucumis melo* var. *saccharinus* Naud) com potencial para o controle dessa doença.

Santos et al. (2006) obtiveram controle da mancha aquosa através do tratamento de sementes de meloeiro com líquidos fermentados com ou sem presença das células de *B.*

subtilis (R14), *B. megaterium* de Bary pv. *cerealis* (Hosford) (RAB7), *B. pumilis* (Meyer e Gottheil) (C116), *Bacillus* sp. (MEN19), sendo os melhores resultados obtidos com RAB7 que proporcionou redução da incidência (89,1%) e do índice de doença (92,7%), elevou o período de incubação da mancha aquosa de 9,8 para 11,9 dias e reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença de 3,36 para 0,17.

De um total de 50 bactérias endofíticas e epifíticas testadas por Medeiros et. al. (2009) no controle da mancha aquosa, o isolado RAB9 (*Bacillus* sp.) foi o mais eficiente pela bacterização de sementes infectadas e o isolado MEN2 (*Paenibacillus lentimorbus* Dutky) pela pulverização em plântulas para proteção das folhas.

Leveduras também foram testadas no controle biológico da mancha aquosa. A pulverização foliar da levedura *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman em folhas de meloeiro Hami foi efetiva na redução da incidência e severidade da doença. O tratamento das sementes com extrato metabólico desta levedura diminuiu a incidência da doença em plantas, e a sua eficácia não diferiu significativamente dos tratamentos químicos com sulfato de estreptomicina (0,1% p/v) e ácido hidrocloreídrico (2% v/v) (WANG et al., 2009). No Brasil, não existem pesquisas dentro desta perspectiva de biocontrole no patossistema meloeiro x *A. citrulli*.

4. Leveduras como agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas

Leveduras são fungos unicelulares, os quais estão amplamente distribuídos em solos e na superfície de folhas, ramos, pétalas de flores, frutos e sementes de plantas. Nas folhas, leveduras se comportam como microrganismos residentes que fazem parte da microbiota epifítica e se multiplicam nas superfícies das mesmas sem prejudicar o hospedeiro, sendo muitas vezes atraídos pelos exsudatos foliares ou por materiais depositados sobre elas, como pólen e restos orgânicos, e podem agir como um tampão biológico, impedindo a ocorrência de infecções (WILSON; WISNIEWSKI, 1989).

A capacidade da levedura para se desenvolver rapidamente nas superfícies de frutos, folhas e flores, especialmente em habitats ricos em açúcar, dominando este ambiente e excluindo o crescimento de outros microrganismos por meio de competição por espaço e nutrientes, parece ser a forma mais comum de controle biológico (VALDEBENITO SANHUEZA, 2000). Porém, também podem produzir enzimas hidrolíticas (JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998), compostos antibióticos (McCORMACK et al., 1994) e toxinas *killer* (WALKER et al., 1995), agirem por indução de resistência (BETTIOL; MORANDI, 2009), além de promoverem o crescimento de plantas (SHALABY; EL-NADY, 2008).

Certos isolados de leveduras com fenótipo *killer* (Kp) produzem toxinas extracelulares, denominadas de proteína *killer* ou toxinas *killer*, as quais são letais a células microbianas sensíveis (HEMANDEZ et al., 2008; SCHMITT; BREINIG, 2002). Geralmente, essas toxinas são ativas em valores de pH de 3 a 5,5 (IZGU; ALTINBAY, 2004; MARQUINA et al., 2002). A produção de toxina *Killer* é uma característica de leveduras de diferentes gêneros, incluindo *Saccharomyces* Meyen, *Hansenula* Syd. e *P. Syd.*, *Kluyveromyces* Van der Walt e *Pichia* E. C. Hansen e vários outros (PLATANIA et al., 2012). No entanto, a capacidade de produzir toxina *Killer* não é uma característica fixa da espécie, ou seja, é variável entre os isolados (COELHO et al., 2011). *P. anomala* produz toxinas *Killer* com amplo espectro de propriedades antimicrobianas, sendo capaz de suprimir fungos, leveduras, bactéria e vírus (WALKER, 2011), tendo apresentado atividade antibacteriana contra *Erwinia Winslow et al. spp.*, *Enterobacteriaceae* Rahn e *Streptococcus* Rosenbach (CONTI et al., 2002; POLONELLI; MOORDE, 1986). O isolado 166 de *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) F. C. Harrison também é citado como uma levedura *Killer* (COELHO et al., 2011).

Numerosas pesquisas indicam que leveduras pertencentes a diferentes gêneros são eficientes agentes de controle de doenças pós-colheita causadas por patógenos fúngicos em frutas, vegetais (FRAVEL 2005; LASSOIS et al., 2008) e cereais (DRUVEFORS et al., 2002). Os produtos Aspire® (*Candida oleophila* Montrocher), YieldPlus® (*Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner), Shemer® (*Metschnikowia fructicola* Kurtzman e Droby) e Nexy® (*C. oleophila* isolado O), são recomendados para doenças causadas por *Botrytis cinerea* (De Bary) Whetzel, *Colletotrichum* Corda spp., *Penicillium* Link spp., *Rhizopus* Ehrenb. spp., *Aspergillus Níger* Tiegh., *Fusarium* Link spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em pós-colheita (FRAVEL, 2005; HAISSAM, 2011). Esses produtos ainda não possuem registro no Brasil.

Além da pós-colheita, leveduras também têm sido testadas para o controle de doenças da parte aérea e radiculares causadas por fungos e bactérias, embora pesquisas para o controle de fitobacterioses sejam poucas.

Em meloeiro, Cruz (2010) testou 50 isolados de leveduras para o controle da podridão-de-fusário (*Fusarium pallidoroseum* (Cooke) Sacc.) em frutos, e verificaram que nove isolados reduziram pelo menos 10% da severidade da doença, com destaque para o isolado CC-24 (*Candida guilliermondii* (Castel.) langeron e Guerra) que proporcionou redução de 70,9%.

Em pós-colheita Blum et al. (2004) testaram a eficiência da levedura *C. laurenti* (isolado 36) em frutos de maçã, cvs. Gala e Fuji, contra o mofo azul (*Penicillium expansum* Link), a podridão amarga (*Glomerella cingulata* (Stonemam)) Spauld e Schrenk) e a podridão olho-de-boi (*Pezizula malicorticis* (Jackson) Nannf.) e verificaram que a levedura reduziu a incidência e o diâmetro das lesões.

A aplicação de *Sporobolomyces roseus* Kluver e van Niel, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud ou *C. laurentii* var. *flavescens* (Saito) Lodder e Kreger-van Rij, reduziu 50% ou mais da infecção e o crescimento micelial superficial de *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. em folhas de trigo (FOKKEMA; MEULEN, 1976). Luz (1985) verificou que as leveduras *S. roseus*, *Rhodotorula* F.C. Harrison sp. e *Sporobolomyces* Kluver e C.B. Niel sp. isoladas do filoplano de trigo reduziram manchas fúngicas foliares causadas por *Cochliobolus sativos* (S. Ito e Kurib) e *Leptosphaeria nodorum* (E. Müll.) sob condições controladas, e que provavelmente o mecanismo utilizado pelas leveduras tenha sido a competição por nutrientes na superfície foliar.

A levedura *C. albidus*, isolada de morango, foi testada contra *B. cinerea*, agente causador do mofo cinzento, e reduziu a incidência e a densidade de conidióforos em 86 e 99%, em avaliações em discos de folhas de morango. *C. albidus* também reduziu a incidência do mofo cinzento em frutos maduros, quando aplicado durante a floração (HELBIG, 2002). Buck (2002) relatou uma redução no desenvolvimento de lesões, causadas por *B. cinerea* co-inoculada com *Rhodosporidium toruloides* Banno (Y-1091) em gerânio (*Pelargonium hortorum* L. H. Bailey).

Piccinin et al. (2005) quando aplicaram *Saccharomyces cerevisiae* Meyen para o controle de doenças foliares em sorgo observaram uma redução significativa da antracnose (*Colletotrichum sublineolum* Ces (Wils)) e da mancha foliar (*Exserohilum turcicum* (Pass.) K.J. Leonard e Suggs, além de aumentar a produtividade da cultura.

Em plantas de lírio (*Lilium* L.), Machado e Bettiol (2010) mostraram que *Sporidiobolus pararoseus* (Fell e Tallman) foi eficiente para reduzir a incidência e severidade de *B. cinerea*, e que é fundamental manter elevada a população da levedura para que ocorra o controle biológico natural da doença.

Gasperini et al. (2011), testando 34 isolados de leveduras, selecionaram três [AM2(-2), AM5(-1) e AM12(-6)] com potencial contra *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg 103F (cepa micotoxigênica) em milho, uma vez que apresentaram bons resultados no antibiograma e no teste de caráter *killer*.

Com relação ao controle de fitobacterioses, reduções na incidência de 100% da podridão mole em pimentão foram obtidas com o isolado LD-19 de *Rhodotorula* sp. (MELO et al., 1995). Esse isolado também reduziu em 21,2% a severidade da doença em tomate (GOMES et al., 2005). Outro isolado de *Rhodotorula* sp. (Rh1) foi eficiente no controle da podridão mole em couve-chinesa, reduzindo a área abaixo da curva de progresso da doença em até 33,5% em casa de vegetação e o índice de doença em 8,8%, em campo (MELLO et al., 2011). Pusey et al. (2009) verificaram que três isolados de *Cryptococcus*, sendo dois de *C. magnus* (Lodder e Kreger-van Rij) Baptist e Kurtzman e um não identificado, foram eficientes na supressão de *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. em estigmas destacados de flores de maçãs com controle de até 65%.

De acordo com Yedidia et al. (2001) microrganismos que apresentam a capacidade de produzir compostos que promovem o crescimento vegetal apresentam-se como promissores dentro do controle biológico. Esses microrganismos são capazes de solubilizar fosfatos e outros minerais e melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas sendo apontados como promotores de crescimento e resistência vegetal.

As principais ações diretas desses microrganismos nas plantas estão relacionados a produção de fitormônios de crescimento e ao auxílio à nutrição da planta (fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos e outros nutrientes). Os benefícios indiretos consistem no controle biológico de muitos fitopatógenos (VASSILEV et al., 2006).

Existem muitas pesquisas mostrando o efeito de bactérias na promoção de crescimento de plantas, no entanto, poucos trabalhos avaliaram as leveduras com essa função.

Shalaby e El-Nady (2008) visando à promoção de crescimento de plantas de beterraba açucareira, utilizaram a levedura *S. cerevisiae* em imersão de sementes, pulverização foliar e infestação do solo, e observaram que a aplicação do solo foi a técnica mais adequada, aumentando a área foliar, o comprimento da raiz, o diâmetro da raiz e o peso fresco e seco da raiz.

Apesar de serem escassas as pesquisas com leveduras para o controle de fitobacterioses, os resultados promissores obtidos por Wang et al. (2009) no controle da mancha aquosa em meloeiro Hami subsidiam a hipótese da possibilidade de sucesso de leveduras como agentes promissores para o biocontrole dessa doença em meloeiro. Diante disso, a presente pesquisa teve por objetivos analisar a eficiência de leveduras no biocontrole da mancha aquosa pela proteção de plântulas e plantas e pelo tratamento de sementes de meloeiro, além de verificar a atividade *in vitro* contra *A. citrulli* e a promoção do crescimento de plantas de meloeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p.

BARBOSA, M. A. G.; TERAPO, D.; BATISTA, D. C. **Sistema de produção de melão: doenças**, 2010. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melao/SistemaProducaoMelao/doencas.html> > Acesso em: 02 de jun de 2012.

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

BLEICHER, E; MELO, Q. M. S. **Manejo da mosca-branca *Bemisia argentifolii***. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1998. 15p. (Circular técnica, 3).

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; GUIMARÃES, L. S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 373-377, 2004.

BUAINAIM, A. M.; BATALHA, M. O. (Coords.). **Cadeia produtiva de frutas**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007. 102 p. (Agronegócios, 7).

BUCK, J.W. *In vitro* antagonism of *Botrytis cinerea* by phylloplane yeasts. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa , v.80, n. 8, p.885-891, 2002.

BUSO, G. S. C.; TAVARES, H. M. F.; BUSO, J. A. **Avaliação da variabilidade genética de acessos de melão tipo Cantaloupe utilizando marcadores moleculares RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 19 p. (Boletim de Pesquisa, 35).

CARVALHO, F. C. Q. **Avaliação de genótipos de melancia quanto à resistência à mancha aquosa**. 2012, 54f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

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

COELHO, A. R.; NÓBREGA, G. M. A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p.1879-1892, 2011.

CONTI, S, MAGLIANI, W.; ARSENI, S.; FRAZZI, R.; SALATI, A.; RAVANETTI, L.; POLONELLI, L. Inhibition by yeast killer toxin-like antibodies of oral *Streptococci* adhesion to tooth surfaces in an ex vivo model. **Journal Molecular Medicine**, Amsterdam ,v. 8, n. 6, p. 313–317, 2002.

CRISÓSTOMO, L. A.; SANTOS, A. A.; RAIJ, B. V.; FARIA, C. M. B.; SILVA, D. J.; FERNANDES, F. A. M.; SANTOS, F. J. S.; CRISÓSTOMO, J. R.; FREITAS, J. A. D.; HOLANDA, J. S.; CARDOSO, J. W.; COSTA, N. D. **Adubação, irrigação, híbridos e práticas culturais para o meloeiro no Nordeste**. Fortaleza: Embrapa, Agroindústria Tropical, 2002. 21 p. (Circular Técnica, 14).

CRUZ, T. M. **Potencial de leveduras no controle biológico da podridão-de-Fusário em frutos de meloeiro.** 2010, 64f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

DIAS, R. C. S.; COSTA, N. D.; SILVA, P. C. G.; QUEIRÓZ, M. A.; ZUZA, F.; LEITE, L. A. S.; PESSOA, P. F. A. P.; TARAO, D. A. Cadeia produtiva do melão no Nordeste. In: CASTRO, A. M. G.; LIMA, S. M. V.; GOEDERT, W. J.; FREITAS FILHO, A.; VASCONCELOS, J. R. P. (Ed.). **Cadeias produtivas e sistemas naturais: prospecção tecnológica.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. p. 440-493

DRUVEFORS, U.; JONSSON, N.; BOYSEN, M. E.; SCHNURER, J. Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during longterm storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. **Fems Yeast Research** , Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 289–394, 2002.

DUTTA, B.; SCHERM, H.; GITAITIS, R. D.; WALCOTT, R. R. **Acidovorax citrulli seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions.** 2011. Plant Disease. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0292>>. Acesso em: 07 fev. 2012.

FERNANDES, O. A.; FERREIRA, C. C.; MONTAGNA, M. A. **Manejo integrado de pragas de meloeiro: manual de reconhecimento das pragas e táticas de controle.** Jaboticabal: Funep-CNPq, 2000. 28p.

FESSEHAIE, A.; WALCOTT, R. R. Biological control protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, Raleigh, v. 95, n. 4, p. 413-419, 2005.

FOKKEMA, N. J.; MEULEN, F. van der. Antagonism of yeastlike phyllosphere fungi against *Seporia nodorum* on wheat leaves. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.82, n.1, p.13-16, 1976.

FRANKLE, G. W.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E. Ingress of watermelon fruit blotch bacterium into fruit. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 11, p. 1090-1092, 1993.

FRAVEL, D. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n.1, p. 337-359, 2005.

GASPERINI, A. M.; HASHIMOTO, E. H.; COELHO, A. R.; HIROOKA, E. Y. Leveduras killer visando o biocontrole de *Fusarium verticillioides* micotoxigênico para a qualidade de milho. In: III Encontro Paranaense de Engenharia de Alimento /UNICENTRO, 2011, Guarapuava. **Resumos...** Guarapuava: EPEA, 2011. p.1-12.

GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 108-111, 2005.

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

HELBIG, J. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. **Biocontrol**, Dordrecht, v.47, n. 1, p.85-99, 2002.

HENANDEZ, A., MARTIN, A., CORDOBA, M. G., BENITO, J. M., ARANDA, E., PEREZ-NEVADO, F. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p.178-188, 2008.

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

HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATERWON, J. C. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n.5, p. 529-532, 1996.

HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATTERSON, J. C. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1495-1499, 2003.

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, C. M. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 1, p. 61–64, 2002.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**: Culturas temporárias e permanentes, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2009/default.shtm>> Acesso em: 5 jul. 2012.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**: Culturas temporárias e permanentes, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/default.shtm>> Acesso em: 5 jul. 2012.

IBRAF-INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Comparativo das Importações Brasileiras de Frutas Frescas - 2010/2009**. Disponível em <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> Acesso em: 5 jul. 2012.

ISAKEIT, T. **Bacterial fruit blotch in watermelon. Texas: The Agricultural Extension Service - USA**, 1999. Disponível em: <<http://www.cygnus.tamu.edu/extlabn/vegetables/Watermelon/wmelon.htm>> Acesso em: 10 de jun. 2012.

ISAKEIT, T.; BLACK, M. C.; BARMES, L.W.; JONES, J. B. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n.6, p. 694, 1997.

IZGU, F.; ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3-glucanase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 685-693, 2004.

JIJAKLI, M. H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, n. 4, p.335-343, 1998.

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

LU, Y.; LUO, M. Isolation of endophytic bacteria from hami melon and screening of antagonistic bacteria. **Journal of Shihezi University**, China, v. 22, n. 1, p.104–109, 2004.

LUZ, W. C. Efeito de microrganismos do filoplano sobre as manchas fúngicas foliares do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n.1, p.79-84, 1985.

MACHADO, M. A. C. F.; BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.45, n.6, p.539-545, 2010.

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

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Melões indefesos. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 7, n. 46, p. 08-10, 2007.

MARIANO, R. L. R.; SILVA, V. A. V.; SILVA, A. M. F.; MEDEIROS, F. H. V.; VIANA, I. P. Ocorrência da mancha-aquosa do melão na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, Suplemento, p. 147-148. 2004.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 5, n. 2, p. 65-71, 2002.

MCCORMACK, P. J.; WILDMAN, H. G.; JEFFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 927-931, 1994.

MEDEIROS, F. H.V.; MORAES, I. S. F.; SILVA NETO, E. B.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 37, n. 5, p. 453-460, 2009.

- MELLO, M. R. F.; SILVEIRA, E. B.; VIANA, I. O.; GUERRA, M. L., MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 78-83, 2011.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogenicos. In: Melo, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna. Embrapa, 1998, p. 17-67.
- MELO, R. A. G.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M.; COELHO, R. S. B. Controle biológico da podridão-mole do pimentão (*Capsicum annum*) causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3, p. 206-212, 1995.
- MENEZES, J. B.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MAIA, C. E.; ANDRADE, G. G.; ALMEIDA, J. H. S.; VIANA, F. M. P. Melão pós-colheita. In: ALVES, R. E. **Características do melão para exportação**. Brasília, DF: Embrapa-Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 13-22. (Frutas do Brasil, 10).
- MORAES, I. S. F.; MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Proteção de plantas de melão contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* mediada por *Bacillus* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, suplemento, p. 65-66, 2002.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. I. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 345-349, 2004.
- O'BRIEN, R. G.; MARTIN, A. L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 39, n. 4, p. 479-485, 1999.
- OLIVEIRA, A. **Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro e sobrevivência em restos de cultura e no solo**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

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

OLIVEIRA, I. S.; JÚNIOR, R. S.; MARIANO, R. L. R. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: método de isolamento e transmissão por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, Suplemento, p. 302, 2001. (Resumo).

OLIVEIRA, I. S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R. L. R. Ocorrência da mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, em melão-pepino no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 686, 2003.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**, London, v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the Yeast Killer Phenomenon. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 24, n. 5, p. 866-869, 1986.

PUSEY, P. L.; STOCKWELL, V. O.; MAZZOLA, M. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 5, p. 571-581, 2009.

RANE, K. K.; LATIN, R. X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 5, p. 509-512, 1992.

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; RAMOS, R. S.; SINIGAGLIA, C. Mancha bacteriana da melancia no estado de São Paulo, causada por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 48, 1991.

- ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**, Editora UFV, Viçosa. 1995, 367 p.
- ROSA, M. M.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Netherlands, v. 26, n. 8, p. 1491–1502, 2010.
- SALES JÚNIOR, R.; MENEZES, J. B. **Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN**. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 2001. 25 p. (Relatório Técnico).
- SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza. EMBRAPA-SPI. 2000.
- SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.
- SANTOS, F. J. S.; LIMA, R. N.; CRISÓSTOMO, L. A.; SOUZA, F. **Irrigação do melão: manejo através do tanque classe “A”**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 7 p. (Circular Técnica, 11).
- SCHAAD, N. W.; SOWELL, G.; GOTH, R. W.; COLWELL, R. R.; WEBB, R.E. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 28, p. 117-125, 1978.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **Fems microbiology reviews**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 257-276, 2002.
- SHALABY, M. E. S.; EL-NADY, M. F. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n. 2, p. 271-275, 2008.

SILVA, H. R.; COSTA, N. D. (Ed.) **Melão: Produção Aspectos Técnicos**. Brasília: Embrapa Hortaliças/Embrapa Semi-Árido/ Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 144 p. (Frutas do Brasil, 33).

SILVA NETO, E. B.; MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Controle químico da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, suplemento, p. 340, 2003.

SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.171-175, 2003.

SOMODI, G. C.; JONES, J. B.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E.; KUCHAREK, T. A.; HODGE, N. C.; WATTERSON, J. C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. **Plant Disease**, St. Paul., v. 75, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

SOWELL, G.; SCHAAD, N. W. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: seed transmission and resistance of plant introductions. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 63, p. 437-441, 1979.

TAVARES, S. C. C. H. Introdução. In: TAVARES, S. C. C. H. (Ed.). **Melão: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, p. 9-10. (Frutas do Brasil, 25).

UENO, B.; COUTO, M. E. O.; UESUGI, C. H. Ocorrência de Mancha-aquosa em melão no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, suplemento, p. 246, 2003.

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

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 71, n. 2, p. 137-144, 2006.

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

WALCOTT, R. R.; LANGSTON, D.; GITAITIS, R. D.; GAY, D.; HOPKINS, D. L.; KUCHARAK, T. A.; LATIN, R.; EGGEL, D.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P.; LOVIC, B. **Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease**. Georgia, 2001. Disponível em: <<http://www.stalals.com/flyer.htm>>. Acesso em: 10 de jun. de 2012.

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D.; CASTRO, A. C. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 528–534, 2003.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, v. 99, n. 1, p. 25–34, 2011.

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v. 127, n. 3, p. 213-222, 1995.

WANG, X.; LI, G.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. **Biological Control**, Montreal, v. 50, n. 2, p. 164–171, 2009.

WEBB, R. E.; GOTH, R. W. A seedborne bacterium isolated from watermelon. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 48, p. 818-821, 1965.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 425-441, 1989.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A.K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, Hague, v. 235, n. 2, p. 235-242, 2001.

ZAMBOLIM, L.; LOPES, C. A.; REIS, A. Controle integrado de doenças em hortaliças visando a produção de sementes de qualidade. In: NASCIMENTO, W. M. (Ed.) **Hortaliças: Tecnologia de Produção de sementes**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011, 316 p.

CAPÍTULO II

EFICÁCIA DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA MANCHA AQUOSA EM MELOEIRO

Eficácia de leveduras no biocontrole da mancha aquosa em meloeiro

Edilaine A. Melo^a, Rosa L. R. Mariano^a, Delson Laranjeira^b, Liliana A. Santos^a,
Luciana O. Gusmão^a, Elineide B. Souza^{a,*}

^aLaboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

^bLaboratório de Fungos de Solo, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

A mancha aquosa, causada por *Acidovorax citrulli*, é a bacteriose mais importante para o meloeiro no Brasil. Os objetivos deste trabalho foram analisar a eficiência de leveduras no biocontrole dessa doença pela proteção de plântulas e plantas e pelo tratamento de sementes de meloeiro, além de verificar a atividade *in vitro* contra o patógeno e a promoção do crescimento de plantas de meloeiro. Nenhuma das 60 leveduras testadas inibiu o crescimento da bactéria, porém os isolados LMA1 (*Rhodotorula aurantiaca*), LMS (*R. glutinis*) e CC-2 (*Pichia anomala*) destacaram-se como os mais eficientes na proteção de plântulas. Quando testadas em plantas e sementes, LMA1 e CC-2 mantiveram a eficácia, com redução do índice de doença e área abaixo da curva de progresso da doença de até 58,6 e 47,2%, respectivamente. Esses isolados não promoveram o crescimento do meloeiro e não produziram toxinas killer *in vitro*. Este estudo sugere que LMA1 e CC-2 apresentam potencial para o biocontrole da mancha aquosa em meloeiro.

Palavras-chave: *Acidovorax citrulli* · *Pichia anomala* · *Rhodotorula aurantiaca* · *Rhodotorula glutinis* · promoção de crescimento · toxinas killer

*Autor da correspondência. TEL.: + 55 81 33206211; fax: + 55 81 33206205.
E-mail address: elineidebs@yahoo.com.br.

1. Introdução

A mancha aquosa causada por *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.) Schaad et al., é uma das doenças mais severas do meloeiro (*Cucumis melo* L.) no Brasil, constituindo um dos principais problemas no Nordeste (Mariano e Silveira, 2007), a principal região produtora desta fruta no país (IBGE, 2010). Desde o ano de 1997, quando foi assinalada pela primeira vez no Brasil (Assis et al., 1999), essa doença tem ocorrido com alta intensidade em campos de produção de melão, causando frequentemente perdas de 40 a 50%, atingindo níveis de até 100% em períodos chuvosos (Sales Júnior e Menezes, 2001). O fruto torna-se impróprio para comercialização, evidenciando os sintomas da doença, os quais se caracterizam pelo aparecimento de pequenos pontos oleosos que se expandem e se tornam manchas marrons, necróticas com ou sem rachadura no centro. Internamente, a bactéria coloniza a polpa do fruto, onde causa podridão seca (Sales Júnior e Menezes, 2001; Santos e Viana, 2000).

Diversos órgãos da planta de meloeiro, em diferentes estádios de desenvolvimento, podem ser afetados por *A. citrulli*, sendo importante que estratégias para o controle da mancha aquosa incluam tratamento de sementes e da parte aérea da planta. A principal medida a ser tomada é a utilização de sementes livres da bactéria (Santos e Viana, 2000). Há relatos que *A. citrulli* tem sido isolada da casca e do embrião de sementes, indicando contaminação interna e externa (Rane e Latin, 1992) que dificulta a eficácia do tratamento. No entanto, tratamentos químicos e físicos de sementes têm sido recomendados (Santos e Viana, 2000; Silva Neto et al., 2003), além da pulverização de químicos nas plantas no campo (Latin e Hopkins, 1995). Diversas seleções para resistência à mancha aquosa têm sido realizadas com acessos e variedades de meloeiro e outras curcubitáceas (Bahar et al., 2009; Carvalho et al., 2012; Hopkins et al., 1993; Hopkins e Thompson, 2002). Entretanto, variações nos resultados frequentemente têm sido encontradas, devido principalmente a diferenças nas condições experimentais (Carvalho et al., 2012; Hopkins e Thompson, 2002) e a alta variabilidade dos isolados utilizados (Hopkins et al., 1993). Enquanto tratamentos químicos e físicos que eliminem a presença da bactéria e cultivares resistentes de meloeiro não estão disponíveis, outras estratégias estão sendo investigadas.

Bactérias antagonistas têm sido frequentemente testadas para o controle da mancha aquosa em meloeiro e melancia. O tratamento de sementes de melancia com *A. avenae* subsp. *avenae* AAA99-2 suprimiu a doença e reduziu a transmissão por sementes e a aplicação de AAA99-2 e *Pseudomonas fluorescens* A506 em flores suprimiu o crescimento epifítico do patógeno e reduziu a infestação em lotes de sementes provenientes de frutos oriundos de flores tratadas (Fessehaie e Walcott, 2005). Isolados dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*,

obtidos endofítica ou epifiticamente de meloeiro ou de outras culturas, também têm revelado potencial no biocontrole da mancha aquosa quer seja pela microbiolização de sementes de meloeiro ou pulverização em plântulas (Medeiros et al., 2009; Oliveira et al., 2006). Além disso, líquidos fermentados com ou sem presença das células de *Bacillus* foram eficientes no controle da mancha aquosa pelo tratamento de sementes (Santos et al., 2006).

Além de bactérias, leveduras também foram estudadas para o controle da mancha aquosa em meloeiro. A pulverização de *Pichia anomala* em folhas de meloeiro Hami (*Cucumis melo* var. *saccharinus*) foi efetiva na redução da incidência e da severidade da doença. O tratamento das sementes com o extrato metabólico desta levedura diminuiu a incidência da doença em plantas, não diferindo significativamente dos tratamentos químicos sulfato de estreptomicina (0,1% p/v) e ácido hidrocloreídrico (2% v/v) (Wang et al., 2009). Leveduras controlam fitopatogênos utilizando os mecanismos de competição por espaço e nutrientes (Droby et al., 1989), compostos antibióticos (Wang et al., 2009), toxinas killer (Walker et al., 1995) ou indução de resistência (Chan e Tian, 2006), e também podem promover o crescimento de plantas (Shalaby e El-Nady, 2008).

Ainda são poucos os trabalhos dentro da perspectiva de biocontrole no patossistema meloeiro x *A. citrulli* no Brasil (Medeiros et al., 2009; Oliveira et al., 2006, Santos et al., 2006) e nenhum foi encontrado utilizando leveduras. No entanto, os resultados promissores obtidos por Wang et al. (2009) no controle da mancha aquosa em meloeiro Hami subsidiam a hipótese da possibilidade de sucesso de leveduras como agentes de biocontrole da doença em meloeiro no Brasil. Diante disso, a presente pesquisa teve por objetivos analisar a eficiência de leveduras no biocontrole da mancha aquosa pela proteção de plântulas e plantas e pelo tratamento de sementes de meloeiro, além de verificar a atividade *in vitro* contra o patógeno e a promoção do crescimento de plantas de meloeiro.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção e cultivo de Acidovorax citrulli e leveduras

O isolado Aac1.12 de *A. citrulli* foi obtido da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE. O patógeno foi cultivado em ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYDA) (10 g dextrose, 3 g extrato de carne, 5 g extrato de levedura, 3 g peptona e 18 g ágar l⁻¹) e incubado a 28 °C por 36 h. O inóculo foi preparado diluindo-se o crescimento bacteriano em água destilada esterilizada (ADE) e ajustando-se a concentração da suspensão

com auxílio de um fotocolorímetro (Analyser 500 M, Brasil) para $A_{570} = 0,25$, que corresponde a $3,4 \times 10^7$ ufc ml^{-1} de acordo com equação previamente determinada.

Leveduras foram isoladas de plantas de meloeiro oriundas de áreas de cultivo de Petrolina no estado de Pernambuco e Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. As folhas foram cortadas em pequenos fragmentos e 1 g das amostras foi colocado em tubo de ensaio contendo 9 ml de ADE adicionada de cloranfenicol (50 mg l^{-1}). Após banho de ultrassom (Densply Neytech, USA) por 15 min, a suspensão resultante foi diluída, e dessa diluição (10^{-2}) alíquotas de 100 μl foram pipetadas em placas de Petri (9 mm) contendo meio de cultura Sabouraud-dextrose-ágar (SDA) (40 g dextrose, 10 g neopeptona e 17 g ágar l^{-1}), suplementado com extrato de levedura ($1,5 \text{ g l}^{-1}$) e cloranfenicol (50 mg l^{-1}). As placas foram incubadas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h, e as colônias de leveduras no meio foram individualmente identificadas pela aparência, odor e coloração, sendo transferidas para meio SDA em tubos de ensaio.

Foram também utilizados no estudo 37 isolados de leveduras da Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos da UFRPE. As suspensões de leveduras foram preparadas a partir de cultivo em meio de cultura SDA ou SD, suplementado com extrato de levedura e cloranfenicol a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h, e as concentrações ajustadas para $1,5 \times 10^8$ cel ml^{-1} , usando escala de McFarland.

2.2. Sensibilidade *in vitro* de *Acidovorax citrulli* a leveduras

A antibiose de isolados de leveduras a Ac1.12 foi testada utilizando a metodologia de Wang et al. (2009) modificada. Uma alíquota de 500 μl da suspensão bacteriana ($3,4 \times 10^7$ ufc ml^{-1}) foi semeada na superfície do meio NYDA depositado em placas de Petri (18 mm). Com o auxílio de um cortador de cortiça esterilizado (6 mm de diâmetro) foram feitos 9 poços no meio de cultura, distando 3 cm entre si. Alíquotas de 100 μL dos cultivos líquidos de cada levedura foram depositadas em cada orifício, sendo ADE utilizada como testemunha. As placas foram incubadas a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h, quando então foi observada a presença de inibição do crescimento bacteriano. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um orifício.

Para avaliar a produção de substâncias antibacterianas pelas leveduras, alíquotas de 60 μL de suspensão de cada isolado ($1,5 \times 10^8$ cel ml^{-1}) foram depositadas individualmente em frascos Erlenmeyer de 150 ml contendo 60 ml de meio líquido SD, os quais foram incubados a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante quatro dias e agitados a cada 24 h. A suspensão de levedura foi então

centrifugada a 12.000 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi esterilizado por filtração. O filtrado de cultura livre de células foi testado para inibição de *A. citrulli* como descrito acima.

A atividade killer nos isolados de levedura LMA1, LMS e CC-2 foi investigada em placas (9 mm) contendo meio de cultura SDA com diferentes pHs (4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 8,5), tamponado com citrato-fosfato. Em uma das extremidades, uma risca com o crescimento da levedura foi realizado, e em seguida, foram realizadas quatro riscas horizontais do patógeno, bem próximas e perpendiculares à risca da levedura. As placas foram incubadas por 48 h a temperatura de 28 °C e avaliadas quanto à inibição do crescimento bacteriano. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

2.3. *Proteção de plântulas de meloeiro com leveduras*

Sementes de meloeiro tipo Amarelo (Mandacaru F1) foram plantadas em vasos de 500 ml contendo mistura solo: húmus (1:1 v/v), e após seis dias as folhas cotiledonares foram pulverizadas com a suspensão das 60 leveduras ($1,5 \times 10^8$ cel ml⁻¹), separadamente, até o escoamento. Após 24 h, as folhas cotiledonares foram pulverizadas com a suspensão de Ac1.12 ($3,4 \times 10^7$ ufc ml⁻¹) também até o escoamento (Araújo et al., 2005). As plântulas foram submetidas à câmara úmida de pré e pós-inoculação por 24 h.

Após a inoculação do patógeno, as plantas foram avaliadas diariamente por seis dias quanto ao aparecimento dos sintomas e severidade da doença, estimada com auxílio de uma escala descritiva com notas variando de 0 a 5, com 0 indicando plântulas assintomáticas, 1-4 indicando hipocótilos assintomáticos e sintomas em uma ou ambas folhas cotiledonares com lesões correspondendo a 25%, 26-50%, 51-75% e 76 a 100%, respectivamente, e 5 indicando necrose total das folhas cotiledonares e hipocótilo associado ou não com damping-off (Araújo et al., 2005). Com os dados obtidos foi determinado o período de incubação (PI), definido como o número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença, sendo que nas plantas sem sintomas acrescentou-se um dia à última avaliação (Iamsupasit et al., 1993); índice de doença (ID), calculado pela fórmula de McKinney (1923); e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), (Shaner e Finney, 1977). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade relativa do ar de $32,5 \pm 2$ °C e $53,0 \pm 2\%$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por cinco plântulas.

2.4. *Proteção de plantas de meloeiro com leveduras*

Plantas de meloeiro foram cultivadas em vasos de 500 ml, contendo a mistura solo: húmus (1:1 v/v), por 15 dias, quando o primeiro par de folhas verdadeiras foi pulverizado com suspensão das leveduras LMA1, LMS e CC-2 ($1,5 \times 10^8$ cel ml⁻¹) separadamente, até o escoamento. Após 24 h as folhas foram pulverizadas com a suspensão de Aac1.12 ($3,4 \times 10^7$ ufc ml⁻¹) também até o escoamento (Silveira et al., 2003), sendo submetidas à câmara úmida de pré e pós-inoculação por 24 h. Após a inoculação do patógeno, as plantas foram avaliadas diariamente por dez dias quanto ao aparecimento dos sintomas e severidade da doença, estimada com auxílio de uma escala descritiva adaptada de Azevedo (1997), com notas variando de 0 a 6, onde 0 indica folhas sem sintomas e 1-6 indicando, respectivamente, 1-5%, 6-12%, 13-37%, 38-62%, 63-87% e 88 a 100% de área foliar infectada. Com os dados obtidos foram calculados o PI, ID e AACPD, conforme já detalhado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de $29,3 \pm 2$ °C e umidade relativa do ar de $60,0 \pm 2\%$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por quatro vasos com duas plantas cada, avaliando-se duas folhas por planta.

2.5. *Supressão da transmissão de Acidovorax citrulli por sementes pelo tratamento com leveduras*

Sementes de meloeiro foram inicialmente desinfestadas em hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) durante 10 min, lavadas em ADE e secas ao ar por 24 h. Após esse período, foram imersas por 30 min em 250 ml da suspensão de Aac1.12 ($3,4 \times 10^7$ ufc ml⁻¹) e postas para secar por 16 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Em seguida, as sementes foram imersas em 100 ml da suspensão ($1,5 \times 10^8$ cel ml⁻¹) das leveduras LMA1, LMS e CC-2 por 30 min. As sementes inoculadas e tratadas foram colocadas para secagem por 16 h, à temperatura ambiente (± 27 °C).

As sementes foram plantadas em bandejas de poliestireno expandido (Isopor[®], Brasil) contendo a mistura solo: húmus (1:1 v/v) e após a emergência, as plântulas foram submetidas à câmara úmida por 24 h. As plântulas foram avaliadas diariamente por seis dias quanto ao aparecimento dos sintomas e severidade da doença, estimada com auxílio de uma escala descritiva com notas de 0 a 5, onde: 0, plântulas sem sintomas; 1, plântulas com lesões marginais em até 50% de uma ou ambas as folhas cotiledonares; 2, plântulas com lesões

marginais em até 75% de ambas as folhas cotiledonares; poucas lesões no centro do limbo; deformação foliar leve; 3, plântulas com lesões marginais em 100% de ambas as folhas cotiledonares; muitas lesões no centro do limbo; deformação foliar acentuada; enfezamento; 4, plântulas com lesões marginais em 100% de ambas as folhas cotiledonares; muitas lesões no centro do limbo progredindo para o hipocótilo; deformação foliar total; enfezamento; 5, necrose total das folhas cotiledonares e hipocótilo; tombamento e morte (Araújo et al., 2005). Com os dados obtidos foram calculados o PI, ID e AACPD. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade relativa do ar de $32,2 \pm 2$ °C e $49,5 \pm 2\%$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por dez plântulas.

Neste e nos demais experimentos, plantas pulverizadas com acibenzolar-S-methyl – ASM (Bion 500 WG, Syngenta, Brasil) na concentração de 50 mg i.a. l⁻¹ foram utilizadas como controle positivo (Cabral et al., 2010) e as testemunhas foram pulverizadas com água. O surfactante químico Tween 80 foi adicionado aos tratamentos a 0,03% (v/v).

2.6. Efeito de leveduras no crescimento do meloeiro

Plantas de meloeiro foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de 500 ml, contendo a mistura solo: húmus (1:1 v/v), por 15 dias, quando as folhas definitivas foram pulverizadas com a suspensão das leveduras LMA1, LMS e CC-2 até o escoamento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de $32,2 \pm 2$ °C e umidade relativa do ar de $49,5 \pm 2\%$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por 20 plantas.

Aos 15 dias após o tratamento, as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes foram lavadas em água destilada para remoção dos fragmentos de solo aderidos às mesmas. Após separação, a parte aérea e raízes foram pesadas em balança analítica (Acculab VI 200, USA) para calcular a biomassa fresca da parte aérea (BFPA) e raiz (BFR). Posteriormente, o material foi acondicionado em sacos de papel e conduzido à estufa para secagem a 45 °C por cinco dias. Após esse período, as amostras foram pesadas novamente para obtenção da biomassa seca da parte aérea (BSPA) e raiz (BSR).

2.7. Identificação das leveduras

Os isolados LMA1, LMS e CC-2 foram identificados através de testes morfológicos e fisiológicos, de acordo com Barnett et al. (1983), e também através da comparação das sequências de rDNA, com primers específicos para a região D1/D2 da região 26S rDNA e os primers ITS1 e ITS4 da região ITS (Valente et al., 1999).

2.8. Análises estatísticas

Todos os ensaios foram repetidos para determinar a consistência dos resultados. Os dados obtidos foram analisados quanto aos pressupostos da análise de variância (ANOVA) e submetidos ao teste de Tukey ($P < 0,05$). Para os dados que não atenderam aos pressupostos da ANOVA, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statistix for Windows[®] (versão 9.0, Analytical Software Tallahassee).

3. Resultados

3.1. Isolamento e sensibilidade *in vitro* de *Acidovorax citrulli* a leveduras

Vinte e três isolados de leveduras foram obtidos de folhas de meloeiro de áreas de cultivo de Petrolina e Mossoró os quais, juntamente com os 37 isolados da Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos da UFRPE, totalizaram os 60 isolados que foram avaliados na inibição de *A. citrulli* e controle da mancha aquosa (Tabela 1).

Nenhum dos 60 isolados inibiu o crescimento de *A. citrulli* (Aac1.12) em meio NYDA, não sendo observada zona clara ao redor dos poços contendo as suspensões de leveduras após incubação a 28 °C por 48 h. A inibição do crescimento do patógeno pelo filtrado de cultura das leveduras livre de células também não foi observada. Adicionalmente, as leveduras LMA1, LMS e CC-2 apresentaram resultado negativo quanto à produção de toxinas killer contra *A. citrulli* em meio SDA nos diferentes pHs testados.

3.2. Proteção de plântulas e plantas de meloeiro com leveduras

A eficiência do controle das 60 leveduras em relação à doença em plântulas variou, sendo que 16,7% e 13,3% dos isolados afetaram pelo menos uma das variáveis analisadas nos experimentos 1 e 2, respectivamente. No entanto, os isolados LMA1, CC-2 e LMS foram os

únicos que diferiram significativamente ($P < 0,05$) da testemunha em relação a maioria das variáveis analisadas nos dois experimentos (Tabela 1). No experimento 1, não foram observados sintomas da mancha aquosa nas plântulas pulverizadas com as leveduras LMA1 e CC-2 e com ASM, indicando 100% de controle da doença, e o isolado LMS elevou o PI em 3,4 dias e reduziu o ID e AACPD respectivamente em 86,7 e 86,6% em relação à testemunha. No experimento 2, LMA1, CC-2 e LMS elevaram o PI (4,4; 4,1; 2,5 dias), enquanto reduziram ID (96,5; 94,1; 70,6%) e AACPD (95,9; 93,8; 76,3%) (Tabela 1). As três leveduras não diferiram significativamente do ASM, utilizado como controle positivo. O tratamento das plântulas apenas com *A. citrulli* (testemunha) resultou em lesões cobrindo de 51 a 75% de uma ou ambas as folhas cotiledonares, enquanto que nos tratamentos com as leveduras foram observadas no máximo, lesões em 25% das folhas cotiledonares.

As leveduras LMA1, LMS e CC-2 foram identificadas respectivamente como *Rhodotorula aurantiaca*, *R. glutinis* e *P. anomala*, com base em características morfológicas, fisiológicas e moleculares. LMA1 e LMS foram isoladas de folhas de meloeiro de áreas de cultivo de Petrolina-PE, Brasil e CC-2, pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos da UFRPE, foi obtida de frutos de melão oriundo de feira livre.

As leveduras LMA1, CC-2 e LMS mantiveram a eficácia na proteção de plantas de meloeiro contra a mancha aquosa pela pulverização 24 h antes da inoculação de *A. citrulli*, reduzindo significativamente ($P < 0,05$) o ID e a AACPD em relação à testemunha em até 58,6 e 47,2%, respectivamente. Apenas o tratamento com ASM aumentou o PI (Tabela 2).

3.3. Supressão da transmissão de *Acidovorax citrulli* por sementes pelo tratamento com leveduras

O tratamento de sementes de meloeiro com as leveduras LMA1 e CC-2 resultou em plântulas com menor severidade dos sintomas da mancha aquosa, com reduções do ID (34,3; 27,1%) e AACPD (45,5; 31,4%), embora sem reduzir o PI (Tabela 3). O isolado LMS não manteve a eficácia no controle da mancha aquosa, sendo incapaz de suprimir a transmissão de *A. citrulli* em sementes. Nesse ensaio e no de proteção de plantas, as leveduras foram menos eficientes do que ASM em controlar a doença (Tabelas 2 e 3).

3.4. Efeito de leveduras no crescimento do meloeiro

As leveduras LMA1, LMS e CC-2 não promoveram significativamente ($P < 0,05$) o crescimento das plantas de meloeiro em relação à testemunha, avaliado pelas variáveis BFPA, BFR, BSPA e BSR, comportando-se de forma semelhante ao ASM. Por outro lado, esses isolados não apresentaram efeito deletério, exceto LMS que reduziu a BSPA em 26,7% (Tabela 4).

4. Discussão

Estudos com leveduras para o controle de doenças bacterianas são poucos, principalmente para doenças de parte aérea. No entanto, diferentes gêneros de leveduras são eficientes agentes de controle de doenças pós-colheita causadas por patógenos fúngicos em frutas, hortaliças e cereais. Os produtos YieldPlus[®] (*Cryptococcus albidus*), Shemer[®] (*Metschnikowia fructicola*) e Nexy[®] (*C. oleophila* isolado O) são recomendados para doenças causadas por *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em pós-colheita (Haissam, 2011), mas ainda não possuem registro no Brasil.

Um importante mecanismo pelo qual leveduras beneficiam a planta é a produção de moléculas com atividade direta sobre o patógeno, chamado antibiose. No presente trabalho nenhuma das 60 leveduras obtidas de folhas e frutos de meloeiro inibiu o crescimento de *A. citrulli* (Ac1.12) no meio NYDA seja em cultivo líquido, seja como filtrado de cultura livre de células. No entanto, de 463 isolados de leveduras obtidos de folhas e flores de cucurbitáceas, 24 apresentaram antibiose contra *A. citrulli* e o filtrado de cultura livre de células do isolado 0732-1 inibiu o crescimento da bactéria (Wang et al., 2009). Por outro lado, ausência de antibiose também foi encontrada para as leveduras Rh1, Rh2 (*Rhodotorula* sp.) e Sc1 (*Saccharomyces cerevisiae*) contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Mello et al., 2011).

Dentre as 60 leveduras testadas por pulverização em plântulas de meloeiro apenas os isolados LMA1, LMS e CC-2 proporcionaram uma elevada proteção contra a mancha aquosa, com 100% de controle no experimento 1 e reduções do ID e AACPD de até 96,5% no experimento 2 (Tabela 1). Esses resultados são relevantes uma vez que o meloeiro nos estádios iniciais e finais de desenvolvimento, ou seja, plântulas e frutos, apresenta alta suscetibilidade a mancha aquosa (Bahar et al., 2009). Além disso, o controle em plântulas é importante porque após o transplântio de mudas infectadas para o campo, *A. citrulli* é disseminada para plântulas ou plantas vizinhas através de respingos de água de chuva e

irrigação, solos infestados, insetos, implementos agrícolas e operários de campo (Santos e Viana 2000), o que aumenta a incidência da doença. Proteção de plântulas de meloeiro contra infecção por *A. citrulli* também foi obtida por pulverização com *Paenibacillus lentimorbus* MEN2, com redução do ID (81%), AACPD (88%) e incidência (77%) (Medeiros et al., 2009). A seleção de agentes de biocontrole em plântulas apresenta as vantagens de ocupar pouco espaço e ser rápida, podendo ser facilmente realizada em casa de vegetação. Este estágio de desenvolvimento da planta tem sido utilizado com sucesso em estudos de seleção de cultivares com resistência a mancha aquosa (Bahar et al., 2009; Carvalho et al., 2012; Hopkins e Thompson 2002).

No ciclo da mancha aquosa, as lesões foliares são muito importantes como fonte de inóculo para os frutos (Latin e Hopkins, 1995). As leveduras LMS1, CC-2 e LMS, também foram eficazes no controle da mancha aquosa pela pulverização nas plantas com redução do ID e AACPD de até 58,6 e 47,2% (Tabela 2), indicando que podem ser utilizadas para reduzir no campo a quantidade de inóculo a ser disseminada para os frutos. Frutos são altamente suscetíveis a mancha aquosa (Bahar et al., 2009), e sob ótimas condições de temperatura e umidade, perdas totais podem ocorrer em campos afetados, porque frutos sintomáticos não são comercializáveis (Latin e Hopkins, 1995). Embora a proteção de plantas tenha proporcionado menor controle da doença em relação à proteção de plântulas (Tabela 1), os níveis obtidos foram expressivos quando comparados a outras pesquisas. *P. anomala* isolado 0732-1 pulverizado em folhas de meloeiro Hami reduziu o ID da mancha aquosa em até 82,3% (Wang et al., 2009); *Rhodotorula* sp. (LD-19) reduziu em 21,2% a severidade da podridão mole em tomate (Gomes et al., 2005); e três isolados de *Cryptococcus* suprimiram em até 65% a população de *Erwinia amylovora* em estigmas destacados de flores de macieira (Pusey et al., 2009).

É através de sementes infectadas que *A. citrulli* pode ser introduzida em uma determinada área (Assis et al., 1999), recomendando-se o plantio de sementes sadias como a principal medida de controle da mancha aquosa (Latin e Hopkins, 1995). Adicionalmente, o tratamento de sementes com antagonistas reforça esse controle (Medeiros et al., 2009), uma vez que é a partir de sementes infectadas ou infestadas que se originam as plântulas doentes e a bactéria se dissemina, acarretando significativa proporção de mudas infectadas (Latin e Hopkins, 1995). Em lotes de sementes contendo uma semente contaminada com a bactéria em concentrações diversas (1×10^1 a 1×10^7 ufc ml⁻¹), foram obtidos níveis de transmissão de *A. citrulli* variando de 16,7 a 100% (Dutta et al., 2011). No ensaio da supressão da transmissão de *A. citrulli* por sementes, as leveduras LMA1 e CC-2 confirmaram a eficácia no controle da

mancha aquosa, reduzindo o ID (34,3; 27,1%) e a AACPD (45,5; 31,4%) (Tabela 3). Wang et al. (2009) também observaram redução significativa da severidade dessa doença quando trataram sementes de meloeiro Hami contaminadas com *A. citrulli* com filtrado de células de *P. anomala* 0732-1, não diferindo dos tratamentos químicos com sulfato de estreptomicina (0,1% p/v) e ácido clorídrico (2% v/v).

Apenas na proteção de plântulas, as leveduras LMA1, LMS e CC-2 apresentaram eficácia similar ao tratamento com acibenzolar-S-metil. Esse indutor foi escolhido como controle positivo por apresentar registro para a mancha aquosa em meloeiro no Brasil (AGROFIT, 2003) e ter mostrado eficácia no controle da doença quando comparado a outros indutores e defensivos usados por produtores e em pesquisas, tanto em condições de casa de vegetação (Cabral et al., 2010) quanto de campo (Sales Junior et al., 2007).

As leveduras selecionadas como eficientes no controle da mancha aquosa foram identificadas como *R. aurantiaca* (LMA1), *P. anomala* (CC-2) e *R. glutinis* (LMS) (Barnett et al., 1983; Valente et al., 1999). Espécies dos gêneros *Pichia* e *Rhodotorula* são citadas na literatura como potenciais agentes de controle de doenças de plantas, principalmente em infecções pós-colheita.

A espécie *P. anomala* é um importante agente de controle biológico de fungos de importância agrônômica (Walker, 2011), a exemplo de *B. cinerea* e *Penicillium* sp. em maçã (Haissam, 2011), além de outros fungos e *Enterobacteriaceae* presentes em grãos de cereais (Olstorpe e Passoth, 2011). Há relatos da utilização de *R. glutinis* como agente de controle biológico eficaz em doenças pós-colheita de maçãs (Qin et al., 2003) e peras (Zhang et al., 2008), entre outras frutas, bem como de *Rhodotorula* sp. (Rh1) no controle da podridão mole em couve-chinesa (Mello et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos no controle da mancha aquosa por LMA1, LMS e CC-2 não foram elucidados, uma vez que essas leveduras não inibiram o crescimento de *A. citrulli*, ou seja, não agiram por antibiose e produção de toxinas killer. Dessa forma, na proteção das plântulas e plantas pode estar envolvida a competição por nutrientes e no tratamento de sementes, também a competição e a indução de resistência. Competição por nutrientes tem sido sugerido como modo de ação de várias leveduras biocontroladoras, a exemplo de *Pichia guilliermondii* contra *Penicillium digitatum* (Droby et al., 1989), bem como *Candida guilliermondii*, *C. oleophila* e *Metschnikowia pulcherrima* contra *B. cinerea* (Piano et al., 1997; Saligkarias et al., 2002). As respostas de defesa na planta também podem ser estimuladas pelas leveduras. *P. guilliermondii* incitou a produção de etileno em toranja (Droby et al., 1991) enquanto *C. laurentii* aumentou a atividade das enzimas relacionadas à

defesa, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia liases, peroxidases e polifenol oxidases, em frutos de pera contra *Alternaria alternata* (Tian et al., 2006).

No teste de caráter killer, as leveduras LMA1, CC-2 e LMS não foram eficientes em inibir o crescimento de *A. citrulli*. A produção de toxinas killer parece ser uma característica generalizada de espécies de leveduras de diferentes gêneros, incluindo *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e vários outros (Platania et al., 2012). No entanto, a capacidade de produzir toxinas killer não é uma característica fixa da espécie, ou seja, é variável entre os isolados (Coelho et al., 2011). *P. anomala* produz toxinas killer com amplo espectro contra fungos, leveduras, bactérias e vírus (Walker, 2011), tendo apresentado atividade antibacteriana para *Erwinia* (Polonelli e Moorde, 1986). O isolado 166 de *R. glutinis* também é citado como uma levedura killer (Coelho et al., 2011).

Leveduras também têm sido relacionadas à promoção de crescimento de plantas (Rosa et al., 2010). As principais ações diretas dos microrganismos que envolvem a promoção de crescimento de plantas estão associadas à produção de fitohormônios e no auxílio à nutrição da planta (fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos e outros nutrientes) (Vassilev et al., 2006). Neste estudo, LMA1, LMS e CC-2 não promoveram o crescimento das plantas de meloeiro (Tabela 4). Visando à promoção de crescimento de plantas de beterraba açucareira, Shalaby e El-Nady (2008) utilizaram a levedura *S. cerevisiae* para imersão de sementes, pulverização foliar e infestação do solo, e observaram que esta última técnica foi a mais adequada, aumentando a área foliar, e o comprimento, diâmetro, peso fresco e seco da raiz. Segundo Rosa et al. (2010), *Torulaspota globosa* (1S112) não proporcionou aumentos significativos em altura e massa seca da parte aérea de plantas de sorgo, embora apresentasse capacidade de produção de AIA *in vitro* o que foi explicado pelo fato de que a aplicação foi realizada por pulverização nas folhas, não atingindo o solo e a rizosfera, locais onde a levedura poderia auxiliar a planta a melhor expressar promoção de crescimento. É provável que o mesmo tenha ocorrido no presente trabalho, já que as leveduras também foram aplicadas por pulverização em folhas.

O indutor ASM, utilizado como controle positivo não influenciou o crescimento das plantas, discordando dos resultados obtidos por Cabral et al. (2010) que detectaram custo fisiológico, com redução de altura e biomassa fresca da parte aérea de plantas de meloeiro Amarelo de 24,5 e 41,4%, respectivamente, por este indutor. Apenas o isolado LMS (Tabela 4) apresentou efeito deletério reduzindo a BSPA das plantas de meloeiro. Este efeito pode ser atribuído ao custo da transferência de metabólitos envolvidos no crescimento para a síntese de compostos relacionados à defesa da planta (Buzi et al., 2004).

A mancha aquosa é detectada em vários estádios de desenvolvimento de cucurbitáceas. Dessa forma, a seleção de biocontroladores considerando essa característica, ou seja, nas diversas etapas da doença, torna os resultados mais confiáveis em condições de ocorrência natural. *R. aurantiaca* (LMA1) e *P. anomala* (CC-2) foram eficazes na proteção de plântulas e plantas e no tratamento de sementes de meloeiro. Portanto, a utilização dessas leveduras junto a outros métodos de controle, tais como cultivares resistentes e utilização de compostos cúpricos, será importante no manejo integrado da mancha aquosa.

Agradecimentos

A FACEPE pela concessão da bolsa de estudo a Edilaine A. Melo, e ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa a Rosa L. R. Mariano e Elineide B. Souza. A Dra. Rejane Pereira Neves, do Departamento de Micologia na Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, pela identificação dos isolados de leveduras.

Referências

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2003. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit.cons/principal_agrofit_cons (acessado 01.09.2012).
- Araújo, D.V., Mariano, R.L.R., Michereff, S.J., 2005. Inoculation methods of *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* in melon. *Summa Phytopathol.* 31, 69-73.
- Assis, S.M.P., Mariano, R.L.R., Silva-Hanlin D.M.W., Duarte, V., 1999. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* no Estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatol. Bras.* 24, 191.
- Azevedo, L.A.S., 1997. Manual de quantificação de doenças de plantas. Novartis, São Paulo.
- Bahar, O., Kritzman, G., Burdman, S., 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 71–83.
- Barnet, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1983. *Yeasts: characteristics and identification.* University Press, Cambridge.
- Buzi, A., Chilosi, G., Sillo, D., Magro, P., 2004. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-Smethyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *J. Phytopathol.* 152, 34-42.

- Cabral, C.P., Gama, M.A.S., Alexandre, E.R., Mariano, R.L.R., Silveira, E.B., 2010. Efeito de acibenzolar-S-metil, mananoligossacarídeo e bioflavonóides cítricos no controle da mancha-aquosa e no crescimento do meloeiro. *Trop. Plant. Pathol.* 35, 119-123.
- Carvalho, F.C.Q., Santos, L.A., Dias, R.C.S., Mariano, R.L.R., Souza, E.B., 2012. Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. *Euphytica* July 2012. doi:10.1007/s10681-012-0766-1. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10681-012-0766-1/fulltext.html> (acessado 30-08-12).
- Chan, Z., Tian, S., 2006. Induction of H₂O₂-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biol. and Technol.* 39, 314–320.
- Coelho, A.R., Nóbrega, G.M.A., Pagnocca, F.C., Hoffmann, F.L., Harada, K., Hirooka, E.Y., 2011. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. *Ciênc. Agrar.* 32, 1879-1892.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., 1991. Antagonist microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News Inf.* 2, 169-173.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35, 794–800.
- Dutta, B., Scherm, H., Gitaitis, R.D., Walcott, R.R., 2011. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 96, 705–711.
- Fessehaie, A., Wolcott, R.R., 2005. Biological control protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 95, 413-419.
- Gomes, A.M.A., Silveira, E.B., Mariano, R.L.R., 2005. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. *Hortic. Bras.* 23, 108-111.
- Haissam, J.M., 2011. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 93–105.
- Hopkins, D.L., Thompson, C.M., 2002. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant. Dis.* 86, 61–64.
- Hopkins, D.L., Thompson, C.M., Elmstrom, G.W., 1993. Resistance of watermelon seedlings and fruit to the fruit blotch bacterium. *HortScience* 28, 122–123.
- Iamsupasit, N., Chakraborty, S., Cameron, D.F., Adkins, S.W., 1993. Components of quantitative resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in tetraploid

- accessions of the pasture legume *Stylosanthes hamata*. Aust. J. Exp. Agric. 33, 855-860.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes, Rio de Janeiro. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf (acessado 05-07-12).
- Latin, R., Hopkins, D.L., 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon. The hypothetical exam question becomes reality. Plant Dis. 79, 761-765.
- Mariano, R.L.R., Silveira, E.B., 2007. Melões indefesos. Cultiv. Hortal. Frut. 7, 08-10.
- Mckinney, R.H., 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. J. Agric. Res. 6, 195-218.
- Medeiros, F.H.V., Moraes, I.S.F., Silva Neto, E.B., Silveira, E.B., Mariano, R.L.R., 2009. Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria. Phytoparasitica 37, 453-460.
- Mello, M.R.F., Silveira, E.B., Viana I.O., Guerra, M.L., Mariano, R.L.R., 2011. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. Hort. Bras. 29, 78-83.
- Oliveira, A., Santos, M.H.M., Silveira, E.B., Gomes, A.M.A., Mariano, R.L.R., 2006. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. Hort. Bras. 24, 373-377.
- Olstorpe, M., Passoth, V., 2011. *Pichia anomala* in grain biopreservation. Antonie van Leeuwenhoek 99, 57-62.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., Gullino, M.L., 1997. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against postharvest rot of apple. Postharvest Biol. and Technol. 11, 131-140.
- Platania, C., Restuccia, C., Muccilli, S., Cirvilleri, G., 2012. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). Food Microbiol. 30, 219-225.
- Polonelli, L., Morace, G., 1986. Reevaluation of the Yeast Killer Phenomenon. J. of Clin. Microbiol. 24, 866-869.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O., Mazzola, M., 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 99, 571-581.
- Qin, G.Z., Tian, S.P., Liu, H.B., Xu, Y., 2003. Biocontrol efficacy of three antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* in harvested apple fruits. Acta Bot. Sin. 45, 417-421.

- Rane, K.K., Latin, R.X., 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76, 509-512.
- Rosa, M.M., Tauk-Tornisielo, S.M., Rampazzo, P.E., Ceccato-Antonini., S.R., 2010. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1491–1502.
- Sales Junior, R., Pontes Filho, F.S.T., Nunes, G.H.S., Torres, G.R.C., 2007. Eficiência de Acibenzolar-S-Methyl e Oxicloreto de Cobre no Controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Agente Causal da “Mancha-Aquosa” no Meloeiro. *Rev. Biol. Ciênc. terra* 7, 66-71.
- Sales Júnior, R., Menezes, J.B., 2001. Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN. Technical report. Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró.
- Saligkarias, I.D., Gravanis, F.T., Eptona, H.A.S., 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182:II. A study on mode of action. *Biol. Control.* 25, 151-161.
- Santos, A.A., Viana, F.M., 2000. Mancha-aquosa do melão. Technical report. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza.
- Santos, E.R., Gouveia, E.R., Mariano, R.L.R., Souto-Maior, A.M., 2006. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. *Summa Phytopathol.* 32, 376-378.
- Shalaby, M.E., El-Nady, M.F., 2008. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biol. Szeged.* 52, 271-275.
- Shaner, G., Finney, R.E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051-1056.
- Silva Neto, E.B., Medeiros, F.H.V., Mariano, R.L.R., Silveira, E.B., 2003. Controle químico da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes. *Fitopatol. Bras.* 28, 340.
- Silveira, E.B., Michereff, S.J., Mariano, R.L.R., 2003. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Fitopatol. Brasil.* 28, 171-175.
- Tian, S., Wan, y., Qin, G., Xu, Y., 2006. Induction of defense responses against *Alternaria rot* by different elicitors in harvested pear fruit. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 729–734.
- Valente, P., Ramos, J.P., Leoncini, O. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can. J. Microbiol.* 45, 949-958.

- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I., 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 137-144.
- Walker, G.M., Mcleod, A.H., Hodgson, V.J., 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 127, 213-222.
- Walker, G.M., 2011. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 25–34.
- Wang, X., Li, G., Jiang, D.H., Huang, H.C., 2009. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. *Biol. Control.* 50, 164–171.
- Zhang, H.Y., Wang, S.Z., Huang, X.Y., Dong, Y., Zheng, X.D., 2008. Integrated control of postharvest blue mold decay of pears with hot water treatment and *Rhodotorula glutinis*. *Postharvest Biol. and Technol.* 49, 308–313.

Tabela 1

Proteção contra a mancha aquosa pela pulverização de leveduras em plântulas de meloeiro, avaliada pelo período de incubação (PI^a), índice de doença (ID^b) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD^c), em casa de vegetação.

Tratamento ^d	Experimento 1			Experimento 2		
	PI	ID	AACPD	PI	ID	AACPD
Testemunha	2,0 cd ^c	60,0 a	9,6 a	2,2 d	68,0 a	9,7 a
LMA2	2,2 bcd	44,0 abcd	7,2 ab	2,4 abcd	46,4 abcde	7,2 abcde
LMA3	2,6 abcd	44,8 abcd	6,7 abc	3,0 abcd	31,2 abcde	4,4 abcde
CPS-3	2,3 abcd	39,2 abcd	6,8 abc	2,3 cd	37,6 abcde	6,7 abcde
CA-1	2,3 abcd	44,0 abcd	6,5 abc	2,6 abcd	39,2 abcde	6,0 abcde
CPS-9	2,3 abcd	40,8 abcd	6,5 abc	2,4 cd	56,8 ab	8,2 abc
LMA-9	2,4 abcd	45,6 abcd	6,7 abc	3,0 abcd	31,2 abcde	4,5 abcde
CC-8*	3,0 abcd	42,4 abcd	6,3 abc	2,7 abcd	41,6 abcde	5,8 abcde
CA-6	2,6 abcd	46,4 abc	6,5 abc	2,4 abcd	53,6 abcd	8,5 abc
CA-7*	2,2 bcd	40,8 abcd	6,5 abc	2,6 abcd	34,4 abcde	5,5 abcde
CPS-6	2,8 abcd	40,8 abcd	6,2 abc	3,4 abcd	32,0 abcde	3,8 abcde
CA-4	1,9 d	36,0 abcd	6,2 abc	2,7 abcd	35,2 abcde	5,2 abcde
CC-24*	2,3 bcd	36,0 abcd	6,1 abc	2,6 abcd	37,6 abcde	5,0 abcde
CA-2	2,7 bcd	40,0 abcd	6,3 abc	2,6 abcd	49,6 abcde	7,0 abcde
CC-5	2,2 abcd	39,2 abcd	6,1 abc	2,6 abcd	39,2 abcde	5,9 abcde
LMA11	2,7 abcd	40,0 abcd	6,0 abc	3,6 abcd	28,0 abcde	3,5 cde
LMA4	2,4 abcd	36,8 abcd	6,0 abc	2,4 abcd	58,4 ab	8,6 abc
LMA5	2,5 abcd	34,4 abcd	6,0 abc	2,4 cd	55,2 abc	8,6 abc
LMA12	2,6 abcd	36,0 abcd	6,1 abc	2,5 abcd	49,6 abcde	8,0 abcd
LMA6	2,8 abcd	40,8 abcd	6,0 abc	2,5 abcd	43,2 abcde	6,6 abcde
CPS-2	2,7 abcd	40,0 abcd	6,1 abc	2,7 abcd	39,2 abcde	6,0 abcde
CC-26	2,4 abcd	40,0 abcd	5,8 abc	2,7 abcd	31,2 abcde	4,5 abcde
LMA13	2,7 abcd	44,0 abcd	5,8 abc	2,6 abcd	47,2 abcde	6,5 abcde
LMA-14	2,2 bcd	37,6 abcd	5,7 abc	2,6 abcd	44,0 abcde	6,7 abcde
LMA15	2,1 bcd	31,2 abcd	5,7 abc	2,7 abcd	42,4 abcde	6,1 abcde
CA-12	2,5 abcd	33,6 abcd	5,7 abc	2,7 abcd	49,6 abcde	6,6 abcde
CPS-5	2,7 abcd	38,4 abcd	5,7 abc	2,8 abcd	36,0 abcde	5,0 abcde
CA-3	2,5 abcd	33,6 abcd	5,7 abc	3,3 abcd	28,8 abcde	4,2 abcde
CA-10	2,6 abcd	36,8 abcd	5,6 abc	2,6 abcd	45,6 abcde	6,4 abcde
LMA16	2,9 abcd	42,0 abcd	5,7 abc	2,8 abcd	46,4 abcde	6,2 abcde
CPS-8	2,6 abcd	44,0 abcd	5,4 abc	2,7 abcd	49,6 abcde	7,3 abcde
LMA-17	2,6 abcd	34,4 abcd	5,3 abc	2,4 abcd	43,2 abcde	7,0 abcde
CC-10	3,0 abcd	32,0 abcd	5,4 abc	3,3 abcd	28,0 abcde	3,7 abcde
LMA18	3,1 abcd	34,4 abcd	5,3 abc	2,6 abcd	48,8 abcde	6,8 abcde
LMC	2,6 abcd	37,6 abcd	5,2 abc	2,7 abcd	29,6 abcde	5,0 abcde
CA-8	2,6 abcd	32,8 abcd	5,2 abc	3,0 abcd	28,0 abcde	4,6 abcde
CC-3	2,9 abcd	44,8 abcd	5,1 abc	2,8 abcd	44,0 abcde	5,2 abcde
LMA7	3,4 abcd	33,6 abcd	4,7 abc	2,6 abcd	51,0 abcd	7,9 abcd
CC-17	3,0 abcd	28,8 abcd	4,5 abc	2,7 abcd	32,0 abcde	4,8 abcde
LMA19	4,1 abcd	24,8 abcd	3,8 abc	2,5 abcd	46,4 abcde	7,1 abcde
CC-14	3,1 abcd	30,4 abcd	4,5 abc	2,8 abcd	30,4 abcde	4,6 abcde
LMA10	3,2 abcd	28,0 abcd	4,5 abc	3,1 abcd	28,8 abcde	4,6 abcde
CC-12	3,5 abcd	26,4 abcd	3,7 abc	3,3 abcd	28,8 abcde	3,8 abcde

CC-1*	2,8 abcd	28,0 abcd	3,3 abc	2,7 abcd	40,0 abcde	4,7 abcde
SPS-3	2,9 abcd	20,0 abcd	3,4 abc	2,6 abcd	50,4 abcde	7,0 abcde
CA5	4,7 abcd	28,8 abcd	3,3 abc	2,4 abcd	54,4 abc	8,1 abc
CPS-4	2,9 abcd	24,8 abcd	3,1 abc	4,2 abc	21,6 de	2,6 de
CC-16	3,6 abcd	23,2 abcd	3,0 abc	3,2 abcd	35,2 abcde	4,2 abcde
CC-25*	4,9 abcd	16,0 abcd	2,6 abc	3,9 abc	41,6 abcde	3,6 bcde
CC-4	3,8 abcd	25,6 abcd	2,9 abc	3,8 abc	24,0 bcde	2,8 de
CC-6*	4,5 abcd	17,6 abcd	2,6 abc	3,6 abcd	23,2 cde	2,9 cde
LMA8	5,3 abc	9,6 bcd	1,7 bc	2,6 abcd	33,6 abcde	5,5 abcde
CA-11	5,2 abc	8,0 bcd	1,6 bc	2,6 abcd	49,6 abcde	7,1 abcde
CA-9	4,3 abcd	9,6 bcd	1,6 bc	3,0 abcd	25,6 bcde	4,1 abcde
LMS*	5,4 abc	8,0 bcd	1,3 bc	4,7 abc	20,0 bcde	2,3 de
LMA-20	5,9 abc	8,0 bcd	1,2 bc	2,4 cd	46,4 abcde	7,1 abcde
CC-9	6,0 abc	5,6 bcd	0,8 bc	2,5 abcd	54,4 abcd	8,6 ab
CC-15	6,1 ab	4,8 cd	0,8 bc	2,8 abcd	37,6 abcde	5,2 bcde
ASM*	7,0 a	0 d	0 c	6,5 a	4,0 e	0,5 e
CC-2*	7,0 a	0 d	0 c	6,3 ab	4,0 e	0,6 e
LMA1*	7,0 a	0 d	0 c	6,6 ab	2,4 e	0,4 e
LMA-21	7,0 a	0 d	0 c	2,4 bcd	49,6 abcde	7,5 bcde

^a Calculado de acordo com Iamsupasit et al. (1993).

^b Calculado de acordo com McKinney (1923).

^c Calculado de acordo com Shaner e Finney (1977).

^d CP, CA e CC – leveduras isoladas de frutos de melão oriundos de feiras livres, pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos da UFRPE; LM - leveduras isoladas de folhas de meloeiro de áreas de cultivo de Petrolina (Pernambuco) e Mossoró (Rio Grande do Norte) * CC-8 = *Geotrichum candidum*; CA-7= *Candida guilliermondii*, CC-24 = *C. guilliermondii*, CC-1 = *Aureobasidium pullulans*, CC-25 = *A. pullulans*, CC-6 = *A. pullulans*, LMS = *Rhodotorula glutinis*, CC-2 = *Pichia anomala*, LMA1 = *Rhodotorula aurantiaca*; ASM - acibenzolar-S-metil.

^e Média de cinco repetições com cinco plantas cada. Dentro da coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Tabela 2

Proteção contra a mancha aquosa pela pulverização de leveduras em plantas de meloeiro, avaliada pelo período de incubação (PI^a), índice de doença (ID^b) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD^c), em casa de vegetação.

Tratamento ^d	PI (dias)	ID (%)	AACPD
Testemunha	3,0 b ^e	95,8 a ^f	24,8 a
LMA1(<i>Rhodotorula aurantiaca</i>)	3,2 b	44,2 b	13,1 b
ASM (acibenzolar-S-metil)	4,4 a	23,5 c	7,7 c
CC-2 (<i>Pichia anomala</i>)	3,2 b	39,7 b	14,0 b
LMS (<i>Rhodotorula glutinis</i>)	3,4 b	43,3 b	14,7b
CV (%)	10,7	4,8	17,07

^a Calculado de acordo com Iamsupasit et al. (1993).

^b Calculado de acordo com McKinney (1923).

^c Calculado de acordo com Shaner e Finney (1977).

^d LMA1 e LMS – leveduras isoladas de folhas de meloeiro de áreas de cultivo de Petrolina (Pernambuco); CC-2 – levedura isolada de fruto de melão oriundo de feira livre, pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos da UFRPE.

^e Média de 10 repetições com oito plantas cada; cada média representa dados de dois experimentos que não diferiram entre si. Dentro da coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

^f Dados transformados ($\text{Log } x + 1$).

Tabela 3

Efeito do tratamento de sementes de meloeiro com leveduras no controle da mancha aquosa, avaliado em plântulas pelo período de incubação (PI^a), índice de doença (IDO^b) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD^c), em casa de vegetação.

Tratamento ^d	PI (dias)	ID (%)	AACPD
Testemunha	1,1 b ^{ef}	65, 6 a	7,0 a
LMA1(<i>Rhodotorula aurantiaca</i>)	2,4 ab	43, 1 b	3,8 bc
ASM (acibenzolar-S-metil)	2,7 a	28, 3 c	2,8 c
CC-2 (<i>Pichia anomala</i>)	1,3 bc	47, 8 b	4,8 b
LMS (<i>Rhodotorula glutinis</i>)	1,3 bc	61, 7 a	6,2 a
CV (%)	17,70	21, 4	18,8

^a Calculado de acordo com Iamsupasit et al. (1993).

^b Calculado de acordo com McKinney (1923).

^c Calculado de acordo com Shaner e Finney (1977).

^d LMA1 e LMS – leveduras isoladas de folhas de meloeiro de áreas de cultivo de Petrolina (Pernambuco); CC-2 – levedura isolada de fruto de melão oriundo de feira livre, pertencente a Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos da UFRPE.

^e Média de 10 repetições com 30 plântulas cada; cada média representa dados de dois experimentos que não diferiram entre si. Dentro da coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

^f Dados transformados ($\text{Log } x + 1$).

Tabela 4

Efeito de leveduras na promoção de crescimento de plantas de meloeiro, avaliado pela biomassa fresca da parte aérea (BFPA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa fresca da raiz (BFR) e biomassa seca da raiz (BSR), em casa de vegetação.

Tratamento ^a	BFPA (g)	BSPA (g)	BFR (g)	BSR (g)
Testemunha	11,6 ab ^b	1,5 ab	2,0 a	0,6 a
LMA1(<i>Rhodotorula aurantiaca</i>)	12,5ab	1,8 a	3,3 a	0,8 a
ASM (acibenzolar-S-metil)	14,3 a	1,2 bc	2,5 a	0,6 a
CC-2 (<i>Pichia anomala</i>)	14,7 a	1,7 a	2,4 a	0,7 a
LMS (<i>Rhodotorula glutinis</i>)	9,2 b	1,1 c	1,8 a	0,6 a

^a LMA1 e LMS – leveduras isoladas de folhas de meloeiro de áreas de cultivo de Petrolina (Pernambuco); CC-2 – levedura isolada de fruto de melão oriundo de feira livre, pertencente a Coleção de Culturas do Laboratório de Fungos de Solos da UFRPE.

^b Média de 10 repetições com dez plantas cada; cada média representa dados de dois experimentos que não diferiram entre si. Dentro da coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- O cultivo líquido e o filtrado de cultura livre de células das 60 leveduras não inibiram o crescimento de *Acidovorax citrulli* (Aac1.12), indicando não agirem por antibiose;
- Dentre as 60 leveduras testadas, LMA1 (*Rodothorula aurantiaca*), CC-2 (*Pichia anomala*) e LMS (*Rodothorula glutinis*) reduziram a severidade da mancha aquosa em plântulas, porém apenas as duas primeiras mantiveram a eficiência pela proteção das plantas e tratamento de sementes, podendo ser incluídas como componente no manejo integrado da mancha aquosa;
- Toxinas killer não foram produzidas por LMA1, CC-2 e LMS contra *A. citrulli*, bem como essas leveduras não foram promotoras de crescimento de plantas de meloeiro.