



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Potencial de leveduras no controle
biológico da podridão-de-esclerócio em
feijão caupi**

Leonardo Tavares de Souza

**Recife – PE
2013**

LEONARDO TAVARES DE SOUZA

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
PODRIDÃO-DE-ESCLERÓCIO EM FEIJÃO CAUPI**

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2013**

LEONARDO TAVARES DE SOUZA

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
PODRIDÃO-DE-ESCLERÓCIO EM FEIJÃO CAUPI**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Prof.º Dr.º Delson Laranjeira (UFRPE)

Co-Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rejane Pereira Neves (UFPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2013**

Ficha Catalográfica

S719p Souza, Leonardo Tavares de
Potencial de leveduras no controle biológico da podridão-
de-esclerócio em feijão caupi / Leonardo Tavares de Souza. –
Recife, 2013.
101 f. : il.

Orientador (a): Delson Laranjeira.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2013.
Referência.

1. Biocontrole 2. *Kodamaea ohmeri* 3. *Sclerotium rolfsii*
4. *Vigna unguiculata* I. Laranjeira, Delson, Orientador
II. Título

CDD 632

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
PODRIDÃO-DE-ESCLERÓCIO EM FEIJÃO CAUPI**

LEONARDO TAVARES DE SOUZA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 15/02/2013

ORIENTADOR:

Prof.º Dr.º. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof.ª Dr.ª Rejane Pereira Neves (UFPE)

Prof.ª Dr.ª Juliana Paiva Carnaúba Ramos (IFAL)

Prof.ª Dr.ª Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

Dr.ª Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho (UFRPE)

**RECFE-PE
FEVEREIRO – 2013**

Ao meu Deus,

AGRADEÇO.

Aos funcionários e professores da UFRPE.

DEDICO.

Ao meu pai Abílio “*in memoriam*” e minha mãe Helena.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela dedicação e amor, às minhas irmãs Gislene, Giselle e a minha sobrinha Ana Clara pelo carinho.

Às avós Maria Keesen de Souza “*in memoriam*”, Maria das Dores Tavares pelos incentivos em minha formação.

A todos os amigos em Minas Gerais e demais familiares que deram apoio nas minhas conquistas almejadas.

À Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES-MG) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelas oportunidades de estudo.

Ao meu orientador de iniciação científica Dr.º Mário Sérgio Carvalho Dias da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais pela base em Fitopatologia.

Aos professores Dr.º Delson Laranjeira, Dr.º Sami Jorge Michereff e Dr.ª Rejane Pereira Neves pelos ensinamentos e orientação ao decorrer de minha pós-graduação.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Fitopatologia da UFRPE, em especial às professoras Dr.ª Rosa Mariano e Dr.ª Elineide Barbosa pelos exemplos morais, educadores e humanos.

Aos colegas do Laboratório de Fungos de Solo (UFRPE), Epidemiologia de Doenças de Plantas (UFRPE) e Laboratório de Micologia Médica (UFPE) pelo apoio, em especial aos amigos Litervaldo, Adriana, Rejane Costa, Adelmo, Juliana, Kátia, Viviane e Geane.

Aos funcionários Sr. Luis Coelho e Dona Darcy pela disponibilidade contínua.

Ao governo estadual pernambucano, através da Fundação de Amparo e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da minha bolsa de estudo no curso de doutorado em Fitopatologia.

SUMÁRIO

	página
RESUMO GERAL.....	ix
GENERAL ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I - Introdução Geral.....	11
Referências Bibliográficas.....	38
CAPÍTULO II - Seleção de leveduras visando o controle biológico da podridão de esclerócio em feijão caupi.....	39
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	43
Resultados e discussão.....	49
Referências.....	57
CAPÍTULO III - Mecanismos antagônicos de <i>Kodamaea ohmeri</i> a <i>Sclerotium rolfsii</i> e efeito na promoção do crescimento em plantas de feijão caupi.....	69
Abstract.....	71
Introdução.....	72
Material e Métodos.....	74
Resultados.....	82
Discussão.....	85
Agradecimentos.....	91
Resumo.....	92
Referências.....	93
CONCLUSÕES GERAIS.....	100

RESUMO GERAL

A podridão-de-esclerócio, causada pelo fungo habitante do solo *Sclerotium rolfsii*, é uma importante doença na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata*). O presente trabalho teve como objetivos: a) selecionar, identificar e verificar a estabilidade antagônica de isolados de leveduras a *S. rolfsii* no potencial de controle biológico da podridão-de-esclerócio em feijão caupi; b) elucidar as possíveis atividades antagônicas *in vitro* de leveduras sobre *S. rolfsii*, bem como a capacidade destas leveduras na promoção de crescimento de plantas de feijão caupi. Os experimentos foram conduzidos em condições de casa-de-vegetação e em ensaios *in vitro*. Um total de cinco isolados, dentre 74 leveduras avaliadas, foram selecionados visando a redução da severidade da podridão-de-esclerócio em plantas de feijão caupi ocasionada por um isolado de *S. rolfsii* pré-selecionado em testes de patogenicidade. Ensaio experimentais demonstraram que quatro dos cinco isolados de leveduras selecionados foram estáveis na redução da severidade da doença em plantas perante três diferentes isolados de *S. rolfsii*. Ocorreu uma significativa diminuição do controle da doença quando foi reduzida a concentração de suspensões destes isolados leveduras no tratamento de sementes. Os cinco isolados de leveduras selecionados foram submetidas à classificação por taxonomia clássica, considerando os caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, bem como por identificação à nível de biologia molecular, através do sequenciamento das regiões genômicas ITS1 e ITS4. Os cinco isolados de leveduras selecionados foram identificados como pertencentes à espécie *Kodamaea ohmeri*. Em ensaios *in vitro*, todos os cinco isolados de *K. ohmeri* apresentaram atividade “killer” positiva, sendo observada uma inibição do crescimento micelial de isolados de *S. rolfsii* crescidos sobre meio de cultivo contendo filtrados extraídos dos isolados de *K. ohmeri* para a maioria das interações testadas. Em testes de pareamentos de colônias, somente um isolado de *K. ohmeri* foi eficiente na inibição do crescimento micelial de dois isolados de *S. rolfsii* entre três isolados do patógeno avaliado. Nos testes de promoção de crescimento de plantas, todos os cinco isolados de *K. ohmeri* selecionados geraram ganhos significativos na biomassa de parte aérea de plantas a partir do tratamento de sementes. O uso de isolados *K. ohmeri* selecionados, se demonstrou como uma ferramenta promissora de controle biológico a ser incrementada no manejo de doenças causadas por *S. rolfsii* na cultura caupi.

Palavras-chave: biocontrole; *Kodamaea ohmeri*; *Sclerotium rolfsii*; *Vigna unguiculata*

GENERAL ABSTRACT

The southern blight, caused by *Sclerotium rolfsii* soilborne fungi, is an important disease in the culture of cowpea (*Vigna unguiculata*). The present work aimed: a) select, identify and verify the stability of antagonistic yeast isolates to *S. rolfsii* for biological control potential of rot southern blight in cowpea; b) elucidate the possible antagonistic activity in vitro of the yeast *S. rolfsii*, and the ability of yeast for growth promotion of cowpea plants. The experiments were conducted under conditions of a green house and in vitro assays. A total of five isolates, among 74 evaluated yeasts were selected in order to reduce the severity of southern blight in cowpea plants caused by an isolate of *S. rolfsii* pre selected in pathogenicity tests. Experimental tests showed that four out of five selected strains of yeast were stable in reducing disease severity in plants against three different isolates of *S. rolfsii*. There was a significant decrease in disease control was reduced when the concentration of these isolates yeast suspensions for seed treatment. The five selected yeast isolates were submitted to classification by classical taxonomy, considering the morphological, physiological and biochemical, as well as identifying the level of molecular biology, through sequencing of genomic regions ITS1 and ITS4. The five selected yeast isolates were identified as belonging to species *Kodamaea ohmeri*. In assays in vitro, all five strains of *K. ohmeri* showed activity "killer" positive, and observed an inhibition of mycelial growth of isolates of *S. rolfsii* grown on culture medium containing filtered extracted from strains of *K. ohmeri* for the majority of interactions tested. In tests of colonies pairings, only one isolate of *K. ohmeri* was effective in inhibiting the mycelial growth of two isolates of *S. rolfsii* between three pathogen strains evaluated. The tests of promoting plant growth, all five isolates *K. ohmeri* selected have generated significant gains in Shoot biomass of plants from seed treatment. The use of isolated *K. ohmeri* selected been shown as a promising tool for biological control to be incremented in the management of diseases caused by *S. rolfsii* in cowpea culture.

Keywords: biocontrol; *Kodamaea ohmeri*; *Sclerotium rolfsii*; *Vigna unguiculata*.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO-DE-ESCLERÓCIO EM FEIJÃO CAUPI

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], também denominado por feijão-macaça, feijão-macaçar ou feijão-de-corda, é uma espécie vegetal da família das fabáceas (SINGH et al., 2002). O centro de origem desta espécie é o continente africano, sendo a região de maior diversidade desta leguminosa um vasto território, que se abrange pela Namíbia, Zimbábue, Moçambique e África do Sul. A região de Transvaal, na África do Sul, detém o maior número de variedades existentes dentro da espécie *V. unguiculata* (PADULOSI; NG, 1997).

Entre as fabáceas cultivadas, a espécie *V. unguiculata* se destaca em diversas regiões tropicais (SINGH et al., 2002). Apesar do seu local de origem e histórico secular de distribuição por diferentes continentes no mundo (PURSEGLOVE, 1976), o seu cultivo iniciou-se de modo mais intensivo no sul da Europa, por comunidades greco-romanas durante o século VIII A. C. (TOSTI; NEGRI, 2002).

As evidências indicam que a introdução da espécie *V. unguiculata* para outras regiões do novo mundo, tal como a América Latina ocorreu no século XVI por colonizadores ibéricos, primeiramente em colônias espanholas e em seguida no Brasil, em regiões onde atualmente situa-se o estado da Bahia. Posteriormente, os colonizadores introduziram a espécie para outras áreas da região Nordeste, assim como em outras partes do país, sendo utilizada atualmente para diversos fins (FREIRE FILHO, 1988).

Sendo uma leguminosa rica em proteínas, o feijão caupi tem ampla utilidade na nutrição humana e animal (ADEGBITE; AMUSA, 2005). Seu teor proteico nos grãos pode chegar a valores de 20-30%, sendo também uma fonte de vitaminas, tais como tiamina e niacina, também de minerais como zinco, ferro e fósforo (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008). Esta leguminosa pode proporcionar uma excelente cobertura vegetal, sendo utilizada na melhoria da fertilidade de solos degradados e no combate de processos erosivos (ADEGBITE; AMUSA, 2005).

O feijão caupi, apesar de ser cultivado praticamente em todas as regiões brasileiras, tem cultivo intensificado nas regiões Norte e Nordeste do país, sendo uma

cultura complementar do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (FREIRE FILHO et al., 1999). Quando este último não tem desenvolvimento satisfatório nestas regiões, o feijão caupi é preferido por adaptar-se com mais facilidade à amplas faixas climáticas e condições edáficas (SMARTT, 1990).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a produção mundial de feijão caupi no ano de 2010, atingiu cerca de 5,54 milhões de toneladas de grãos, em uma área colhida de aproximadamente 10,49 milhões de hectares. A Nigéria é o maior produtor mundial de feijão caupi, obtendo em 2010 uma produção de 2,24 milhões de toneladas, com uma área total colhida de 2,52 milhões de hectares (FAO, 2012).

No Brasil, a média estimada da produção de feijão caupi é de 482 mil toneladas/ano de grãos colhidos, em uma área anualmente plantada de 1,3 milhões de hectares. Entretanto, os dados de produção do feijão caupi e do feijão comum geralmente não são somados separadamente pelos órgãos oficiais responsáveis pelo levantamento da produção agrícola brasileira, sendo assim, um fator limitante ao panorama real da produção do feijão caupi no país (SILVA, 2011).

Na região Nordeste do Brasil, o feijão caupi corresponde por um consumo de 73% do total dos feijões comercializados (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005). desempenhando um destacável papel social e econômico, principalmente em unidades de agricultura familiar de baixa renda (BARBOSA; SANTOS; SANTANA, 2010).

O estado de Pernambuco é um destacável produtor de feijão caupi, concentrando sua produção nas mesorregiões do Agreste Meridional e Sertão, apresentando áreas anualmente cultivadas em torno de 12 e 20 mil hectares, respectivamente. Embora cultivado também na mesorregião da Zona da Mata pernambucana, ao longo de todas as estações climáticas do ano, a área cultivada nesta mesorregião é inferior em relação ao Sertão e Agreste Meridional, isto devido às condições climáticas na Zona da Mata que favorecerem desenvolvimento de outros cultivos, que agregam maior valor econômico (MACHADO, 2012). Segundo dados do Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco, na cidade Recife, foram comercializadas cerca de 249 toneladas de grãos de feijão caupi no ano de 2011. Grande parte, da totalidade destes grãos, foi proveniente de regiões produtoras dos estados da Bahia e interior de Pernambuco (CEASA-PE, 2012).

Dentre os fatores de importância nas perdas de produtividade do feijão caupi e na qualidade de seus grãos produzidos, estão às doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos, tais como: vírus, bactérias, nematóides e fungos (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005). Entre as doenças de maior destaque na cultura, são citadas fitoviroses, incluindo o mosaico severo *Cowpea severe mosaic virus* – CPSMV; os mosaicos de potyvirus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV e *Bean common mosaic virus* – BCMV; as fitonematoses, sendo a principal ocorrência as meloidoginoses, causadas por algumas espécies do gênero *Meloidogyne*. Entre as fitobacterioses, as mais relatadas são o crestamento bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye (SINGH; ALLEN, 1979; ADEGBITE; AMUSA, 2005; ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO; ANDRADE, 2005) e a murcha de *Curtobacterium* causada por *Curtobacterium flaccufasciens* pv. *flaccufasciens* (Hedges) Collins & Jones (CASTRO et al., 2006)

Devido às condições climáticas do Brasil, perdas em áreas de cultivo de feijão caupi por doenças causadas por fungos, podem alcançar um patamar elevado, principalmente onde se emprega baixa tecnologia fitossanitária no cultivo desta leguminosa (POLTRONIER; TRINDADE; SILVA, 1994). Entre os fungos fitopatogênicos, existe uma diversidade de espécies que causam perdas na produção e produtividade do feijão caupi, estas podem causar diferentes doenças, podendo colonizar distintos tecidos e sobreviver em habitats diversificados (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005). As doenças de causas fúngicas de parte aérea mais relacionadas ao feijão caupi são as cercoporioses ocasionadas pelas espécies *Mycosphaerella cruenta* Latham [*Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deighton] e *Cercospora canescens* Ellis & Martin; a ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger; a antracnose ocasionada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Bosis & Cavara e a mancha-café causada por *Colletotrichum truncatum* (Schewin.) Andrus & Moore (SINGH; ALLEN, 1979; ADEGBITE; AMUSA, 2005; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO; ANDRADE, 2005).

O grupo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo responsável por grandes perdas no feijão caupi é representado principalmente pelas espécies: *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (E. F. Smith) Snyder & Hansen, causadora da murcha de fusário; *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., causadora da podridão cinzenta do

caule; *Rhizoctonia solani* Kühn., sendo o agente causal da mela; *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., causador da podridão das raízes; *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp., causador da podridão do colo e *Sclerotium rolfsii* Sacc., o causador da podridão ou murcha de esclerócio (SINGH; ALLEN, 1979; ADEGBITE; AMUSA, 2005; ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; MICHEREFF et al., 2005; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO; ANDRADE, 2005), sendo a murcha de fusário e a rizoctoniose, as doenças radiculares de origem fúngica que ocorrem com mais intensidade no cultivo do feijão caupi no nordeste brasileiro (COELHO, 2001).

Entretanto, as perdas ocasionadas por *Sclerotium rolfsii* vem crescendo em magnitude nas lavouras de feijão caupi em algumas regiões do Brasil, sendo considerada uma ameaça potencial a áreas de cultivo do país (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005). O modo de proliferação e persistência da espécie *Sclerotium rolfsii* no solo, além de sua alta gama de hospedeiros contribui para grandes perdas econômicas na agricultura (SINGH; ALLEN, 1979; KOKUB et al., 2007), tendo este patógeno variados hospedeiros, de diferentes famílias botânicas, entre elas: monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo mais de 500 espécies vegetais relatadas como suscetíveis ao patógeno, o que dificulta ainda mais o seu controle (PUNJA, 1985; SINGH; SARMA, 2009).

A primeira descrição da espécie *S. rolfsii* foi feita por Saccardo em 1913 (SINGH; SARMA, 2009). No entanto, os primeiros trabalhos relatando esta espécie como fitopatógeno foram realizados anteriormente por Rolfsii em 1892, envolvendo em suas pesquisas plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.), no estado da Carolina do Norte, Estados Unidos da América (AYCOCK, 1966).

Atualmente, o gênero *Sclerotium*, tem sido estudado e descrito como um grupo polifilético mas sua classificação ainda tem sido revista, uma vez que algumas espécies do gênero são classificadas como ascomicetos e outras como basidiomicetos. Em literaturas mais recentes, a espécie *S. rolfsii* tem sido alocada taxonomicamente à classe Agaricomycetes (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011); ordem Atheliales (XU et al., 2010); família Atheliaceae (INDEX FUNGORUM, 2012), tendo como fase teleomorfa (sexual/perfeita) a espécie denominada *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough (AGRIOS, 2005; SINGH; SARMA, 2009; XU et al., 2010; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; INDEX FUNGORUM, 2012). Esta fase teleomorfa foi primeiramente descrita como *Corticium centrifungum* (Lev.) Bres. e depois mudada

para *Corticium rolfsii* Curzi. Posteriormente, a espécie foi alocada dentro do gênero *Pellicularia*, em seguida no gênero *Botryobasidium* e finalmente definida como sendo do gênero *Athelia* (SINGH; SARMA, 2009). Contudo, esta condição sexuada é raramente observada na natureza (AGRIOS, 2005). Em condições experimentais, a indução da fase teleomorfa é dependente do isolado em questão, da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura para crescimento, da intensidade de luz e idade da colônia fúngica (PUNJA, 1985; SINGH; SARMA, 2009).

Morfologicamente, *S. rolfsii* apresenta-se caracterizada pela formação de hifas estéreis, de coloração branca, septadas, intensamente ramificadas e de aspecto cotonoso. Durante seu desenvolvimento, o fungo pode apresentar a formação abundante de esclerócios (SINGH; ALLEN, 1979; AGRIOS, 2005; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011), sendo estas estruturas constituídas por agregados compactos de hifas somáticas, que formam massas arredondadas ou de formato irregular (SURHONE; TENNOE; HENSSONOW, 2011). Na espécie *S. rolfsii*, os esclerócios são conspícuos, com 0,5-3mm de diâmetro (SINGH; SARMA, 2009; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011), sendo considerados estruturas de resistência do patógeno e dependendo das condições ambientais, podem persistir no solo durante anos (PUNJA, 1985; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011). A formação e extensão do micélio do patógeno a partir destes esclerócios no solo é influenciada pela forma de germinação dos mesmos (eruptiva ou hifal), pela presença de compostos voláteis, tecidos de plantas hospedeiras e nutrientes solúveis no solo (PUNJA; GROGAN, 1982; PUNJA; JENKINS; GROGAN, 1984), além da presença de outros substratos orgânicos disponíveis (BEUTE; KABANA, 1981; SINGH; SARMA, 2009).

Regiões de clima tropical, caracterizadas por altas temperaturas e elevada umidade do ar, são mais propícias para o desenvolvimento de doenças ocasionadas por *S. rolfsii* (BEUTE; KABANA, 1981; ADANDONON, 2004). Conseqüentemente, estas doenças são mais comuns em áreas de plantio que se localizam em latitudes inferiores a 38°C em relação à linha do Equador (AGRIOS, 2005). O melhor desenvolvimento da espécie *S. rolfsii* em regiões quentes do globo é um reflexo da temperatura necessária para o crescimento do patógeno e formação dos esclerócios. Apesar desta espécie ter uma capacidade de desenvolvimento que abrange uma ampla faixa de temperatura, variando de 8-40°C, a faixa ideal para crescimento micelial e formação de esclerócios é de 27-30°C. Esta espécie é exigente em umidade no solo (sem encharcamento),

oxigênio e luz. Sendo assim, esta espécie desenvolve-se melhor em solos com textura mais arenosa, que proporcionam maior oxigenação, diante deste fato, observa-se uma maior formação de esclerócios nas camadas superiores do solo infestado com o patógeno (BEUTE; KABANA, 1981; PUNJA, 1985). Solos que apresentam pH entre 2-5 são mais favoráveis ao desenvolvimento de *S. rolfsii*, tendo esta espécie uma maior sensibilidade à solos cujo o pH encontra-se acima de 7, principalmente na presença de cátions de carbonatos e bicarbonatos, exercendo um efeito tóxico aos esclerócios do fungo. A presença de ânions de amônio no solo, também pode implicar em efeitos diretos na supressividade da espécie (PUNJA; GROGAN, 1982).

A espécie *S. rolfsii* é um agente causal enquadrado dentro do grupo das doenças denominadas de podridões de raízes e colo (BEDENDO, 2011). Em plantas de feijão caupi, os sintomas típicos da podridão ou murcha-de-esclerócio são o amarelecimento de folhas e murcha da planta (NECHET; VIEIRA, 2006). O amarelecimento das folhas é decorrente do bloqueio que o fluxo de água e nutrientes sofre na região do colo (BEDENDO, 2011), sendo esta interrupção resultante da desestruturação intensa dos tecidos vegetais afetados pelo patógeno na base da planta, o que ocasiona em danos sobre o sistema vascular, podendo levar a uma murcha e posterior morte do hospedeiro (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005).

Existe uma sequência de eventos ocorridos na patogenicidade de *S.rolfsii*, desde o contato do patógeno com o hospedeiro e os sintomas produzidos, que se iniciam pela maceração do tecido vegetal até a morte do mesmo (PUNJA, 1985). Quando um hospedeiro susceptível cresce na presença de propágulos do patógeno, hifas passam a se desenvolver sobre a região do colo e, a partir deste momento, através da ação de toxinas e enzimas secretadas pelo fungo, ocorre a morte das células hospedeiras (PUNJA; HUANG; JENKINS, 1985; BEDENDO, 2011). Embora a morte do tecido vegetal ocorra antes da penetração das hifas, devido à ação conjunta de grandes quantidades de ácido oxálico e endopoligalacturonases produzidas pelo patógeno (BATEMAN; BEER, 1965; BATEMAN, 1972; PUNJA, 1985; SINGH; SARMA, 2009), são os micélios que se formam na superfície do hospedeiro que auxiliam na penetração física no tecido vegetal, quando este evento ocorre no colo da planta, observa-se um estrangulamento na base da mesma, geralmente acompanhado por uma massa de micélio branco, que são típicos sinais do patógeno (ADANDONON, 2004).

Dentro dos mecanismos de patogenicidade de *S. rolfsii*, o ácido oxálico se destaca no processo da doença, sendo responsável pelo sequestro do cálcio da parede celular do hospedeiro, formando o oxalato de cálcio (PUNJA; JENKINS, 1984), este por vez reduz o pH do tecido vegetal promovendo à ação de enzimas como as endopoligalacturonases e celulases envolvidas na patogenicidade. As celulases desempenham um papel secundário na destruição dos tecidos do hospedeiro, aumentando assim a síndrome da doença. Diferenças nos níveis de endopoligalacturonases e as taxas de crescimento micelial entre diferentes isolados são altamente correlacionados a agressividade e diferenças genotípicas do patógeno (PUNJA, 1985), uma vez que estas estão muito presentes nesta espécie (CILLIERS; HERSELMAN; PRETORIUS, 2000).

Estudos demonstraram que a mortalidade de plantas de feijão caupi no campo, ocasionada pela podridão-de-esclerócio, pode variar entre 1-5%, sendo esta redução no estande muito dependente das condições edafoclimáticas da região, do nível de infestação do patógeno no solo e o manejo adotado na área de cultivo (ADEGBITE; AMUSA, 2005; FERY; DUKES, 2011). Entretanto, as maiores perdas da produção no campo estão mais relacionadas à redução do vigor das plantas ocasionadas pelo patógeno do que a percentagem da mortalidade por si própria. A perda deste vigor pode comprometer em mais de 50% a produção de grãos colhidos em plantas acometidas pela doença (FERY; DUKES, 2011).

O fato dos fitopatógenos radiculares terem coevoluido com as plantas por milhões de anos e de estarem altamente adaptados ao ambiente subterrâneo (BRUEHL, 1987), tais como o grupo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, e também por pertencerem a este habitat complexo, o manejo destes microrganismos fitopatogênicos torna-se mais difícil comparados a fungos fitopatogênicos relacionados a tecidos de parte aérea (FREIRE FILHO et al., 1999).

Dentro do manejo visando o controle de doenças ocasionadas por *S. rolfsii*, relata-se o uso de cultivares resistentes (ADANDONON, 2004; FERY; DUKES, 2011); práticas culturais que envolvem rotação de culturas (BENDENDO, 2011), o equilíbrio do pH do solo e estado nutricional da planta (PUNJA; GROGAN, 1982; BENDENDO; MASSOLA JÚNIOR; AMORIM, 2011); uso de produtos alternativos a base de extratos vegetais (ADANDONON, 2004; ADANDONON et al., 2006; FARIA; JÚNIOR BUENO; PAPA, 2009; SANTOS; TOMAZELI; MORALES, 2009) e compostos de

resíduos orgânicos (MORALES, SANTOS; DANNER, 2007; SANTOS; TOMAZELI; MORALES, 2009); uso de fungicidas químicos (PUNJA; 1985; SALES JÚNIOR et al., 2005; ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; BENDENDO, 2011) e a utilização de microrganismos biocontroladores (PUNJA, 1985; MADI et al., 1997; SINGH et al., 2002; ADANDONON, 2004; MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005; ADANDONON et al., 2006; MORANDI et al., 2009; SINGH; SARMA, 2009).

Entre as estratégias de manejo, o controle genético de doenças ocasionadas por *S. rolf sii*, através de materiais resistentes é dificultado, pois a natureza agressiva do patógeno, aliada a falta de especificidade em relação ao hospedeiro, impede a obtenção de materiais com bons níveis de resistência à doença (BEDENDO, 2011), além de que os métodos de triagens existentes em pesquisas, visando à resistência genética a murcha ou podridão de esclerócio em feijão caupi, não estão bem estabelecidos (ADANDONON, 2004). Contudo, alguns estudos recentes direcionados a obtenção de cultivares de feijão caupi, resistentes a *S. rolf sii*, vem sendo realizados na América do Norte, apresentando resultados promissores em cruzamentos envolvendo as cultivares “Carolina Cream” e “Brown Crowder”, criando desta forma, boas expectativas no controle genético para o manejo da doença (FERY; DUKES, 2011).

As práticas culturais tais como a rotação de culturas visando o controle de *S. rolf sii* com plantas não hospedeiras, pode ser uma medida adequada de controle, auxiliando na redução do inóculo no campo. Entretanto, uma atenção especial deve ser dada à escolha da espécie ou espécies a serem utilizadas na rotação de culturas (BEDENDO, 2011). Devido à alta gama de hospedeiros apresentada pelo patógeno (PUNJA, 1985), a diversificação indiscriminada da vegetação dentro de um agroecossistema pode não resultar na redução da doença. Os efeitos de combinações planejadas de plantas devem ser estudados criteriosamente antes da sua aplicação no manejo da doença (BETTIOL, 2010). Planos de rotações de culturas incluídos com milho (*Zea mays* L.) e espécies do gênero *Gossypium* são recomendados no manejo do patógeno no campo (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005). Outras práticas culturais que envolvam o preparo do solo, mantendo-o livre de restos culturais, seja pela queima ou pela incorporação destes restos culturais com aração profunda, aliados a uma manutenção do pH do solo e um bom estado nutricional das plantas, através de calagens e adubações equilibradas, podem reduzir as perdas causadas pelo

patógeno em áreas de cultivo (BENDENDO; MASSOLA JÚNIOR; AMORIM, 2011; BENDENDO, 2011).

Dentre as técnicas alternativas no manejo de doenças ocasionadas por *S. rolfsii*, o uso de algumas plantas tem sido relatado, sendo estas plantas utilizadas na forma de extratos vegetais, como o extrato de melão de são caetano (*Mormodica charantia* L.) em patossistema envolvendo *P. vulgaris* (FARIA; JÚNIOR BUENO; PAPA, 2009), e em patossistemas envolvendo *Vigna unguiculata*, com o uso de extratos de acácia branca (*Moringa oleifera* L.) em combinação com microrganismos biocontroladores (ADANDONON et al., 2006) e o uso do extrato de nim (*Azadirachta indica* A.) (ADANDONON, 2004). Apesar da disponibilidade de técnicas utilizando produtos alternativos a base de extratos de plantas para o controle de fitopatógenos, a utilização dos mesmos ainda é restrita, sendo uma prática polêmica, que apresenta diferentes linhas de abordagens quanto à forma de trabalho com estes extratos, tanto na padronização de testes a serem utilizados, bem como na obtenção e controle de qualidade final destes produtos alternativos (SILVA et al., 2010).

O uso de resíduos orgânicos, a exemplo do chorume líquido de suínos, foi estudado como um produto alternativo para o controle de *S. rolfsii* em plântulas de *P. vulgaris*. Contudo, apesar do eficiente controle do patógeno apresentado em ensaios experimentais por este composto e das melhorias na fertilidade do solo, tais como o excelente aumento dos níveis de zinco (Zn) e cobre (Cu), o uso desta técnica alternativa têm exigido um rigoroso monitoramento dos níveis introduzidos de chorume em campo. Apesar do conhecimento do Zn e Cu como fontes de micronutrientes para plantas, os mesmos são considerados metais pesados. Em excesso, estes micronutrientes podem causar contaminações ao solo por aplicações contínuas de produtos derivados de chorume, podendo assim o uso descontrolado deste resíduo se tornar um problema de ordem ambiental (MORALES, SANTOS; DANNER, 2007).

No caso do controle utilizando produtos químicos em doenças ocasionadas por *S. rolfsii*, através de fungicidas aplicados e biocidas usados em fumigações do solo, tem se demonstrado como estratégias limitadas que nem sempre estes agentes químicos atendem níveis satisfatórios de controle (PUNJA, 1985; SINGH; SARMA, 2009). Dessa forma, o emprego destes produtos químicos uma prática inviável economicamente para o controle de *S. rolfsii* para áreas de cultivo extensas (BENDENDO, 2011). A inviabilidade do uso de algumas moléculas químicas contidas em fungicidas deve-se ao

fato de que as mesmas podem ser facilmente degradadas pela deterioração no solo após a aplicação, devido à adsorção do produto a partículas do solo, por fatores físico-químicos inerentes ao mesmo, especialmente em solos com alto teor de matéria orgânica e/ou argila (SALES JÚNIOR et al., 2005). Produtos a base de moléculas químicas foram estudados e relatados no controle do patógeno, a exemplo do quintozene (pentacloronitrobenzeno-PCNB) (PUNJA, 1985; SALES JÚNIOR et al., 2005), captafol e dicloran (PUNJA, 1985).

No Brasil, o uso de fungicidas, tais como o PCNB para o controle de *S. rolfsii* através de formulações em “spray” ou granular aplicado via solo, é utilizado em alguns patossistemas, a exemplo da cultura do amendoim (*Arachis hipogea* L.) (SALES JÚNIOR et al., 2005; AGROFIT, 2012). Entretanto, o uso deste fungicida requer altas dosagens aplicadas para um efetivo controle do patógeno (PUNJA, 1985; SALES JÚNIOR et al., 2005). Na cultura do feijão caupi, a relação do custo/benefício do uso deste e de outros fungicidas deve ser muito bem avaliada antes de sua aplicação (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005). Apesar do uso de fungicidas em alguns casos para o controle de *S. rolfsii* em áreas de cultivo, o banco de dados defensivos agrícolas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não possui registros de fungicidas recomendados para a cultura do feijão caupi que atendam as normas de exigências da legislação fitossanitária brasileira (AGROFIT, 2012).

O aumento de doenças de plantas, causadas por fitopatógenos habitantes do solo em áreas de cultivo, pode indicar a existência de um desequilíbrio biológico. Uma vez que em sistemas naturais, existe uma alta taxa de mortalidade destes fitopatógenos, isso devido a diversos mecanismos naturais supressivos existentes no solo (BETTIOL; GHINI, 2005). Os problemas advindos de algumas práticas agrícolas, a exemplo do uso intensivo de defensivos agrícolas no controle de microrganismos fitopatogênicos, vêm causando estes desequilíbrios biológicos nos agroecossistemas e têm alterado o cenário agrícola, resultando na busca de segmentos diferenciados e práticas mais sustentáveis ao meio ambiente (MORANDI et al., 2009). Estes segmentos visa alterar as prioridades dos sistemas convencionas de agricultura em relação ao uso de fontes não renováveis, reduzindo a dependência por produtos químicos e outros insumos poluentes ao meio ambiente, dando mais atenção ao uso de processos biológicos nos sistemas agrícolas

(BETTIOL, 2010). Nesse contexto, o controle biológico de microrganismos fitopatogênicos torna-se importante e justificável (MORANDI et al., 2009).

O conceito original do controle biológico de fitopatógenos foi definido pelo grupo inglês denominado “Federation of British Plant Pathologists”, em 1973, onde consideraram o controle biológico de doenças de plantas, como o emprego de inimigos naturais ou antagonísticos para o controle de fitopatógenos (ROBBS, 1991). Um conceito mais abrangente foi apresentado por Cook e Baker (1983), onde o controle biológico foi definido como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinante da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem.

Alguns microrganismos apresentam bom potencial biocontrolador para interferir nos processos vitais de fitopatógenos diretamente ou indiretamente, neste segundo caso, através da indução de resistência a estes fitopatógenos em plantas hospedeiras (MORANDI et al., 2009). No caso de interferências diretas em fitopatógenos habitantes do solo, muitos microrganismos antagonistas atuam em processos que destroem as unidades propagativas deste grupo fitopatogênico, prevenindo a formação e/ou destruindo o inóculo no solo ou suprimindo o inóculo presente em resíduos vegetais infectados, com conseqüente redução do vigor e da virulência do fitopatógeno, ou indiretamente pela promoção do desenvolvimento das plantas hospedeiras contra o ataque destes microrganismos fitopatogênicos (COOK; BAKER, 1983). Os mecanismos de antagonismo podem atuar diretamente sobre o patógeno são: o parasitismo, competição, predação, estímulo à germinação seguida de exaustão e lise de propágulos, diminuição das reservas energéticas e antibiose (amensalismo) em fitopatógenos (WHIPPS, 2001; BETTIOL; GHINI, 2005).

Dentro do controle biológico de doenças de plantas várias metodologias já foram desenvolvidas, através do uso de diferentes grupos de microrganismos antagonistas, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (PUNJA, 1997). No controle biológico de doenças ocasionadas por *S. rolfsii*, algumas bactérias são objeto de estudo como agentes biocontroladoras em potencial, como *Pseudomonas* spp. (PUNJA, 1985; PUNJA, 1997) e *Bacillus subtilis* (Erhenberg) Cohn. (PUNJA, 1997; ANDANDONON et al., 2006). Dentre os fungos filamentosos, utilizados como antagonistas a *S.rolfsii*, destacam-se principalmente espécies do gênero *Trichoderma* Persoon. (PUNJA, 1985; PUNJA, 1997; ANDANDONON, 2004; ANDANDONON et al., 2006; SINGH, SARMA, 2009). Em relação ao controle biológico deste fitopatógeno através de

leveduras, poucos trabalhos têm sido mencionados em literaturas existentes, incluindo poucos relatos com *Saccharomyces cerevisiae* (Meyer) Hansen como agente biocontroladora, resumindo-se em ensaios *in vitro* (SHALABY; EL NADY, 2008). Contudo, em patossistema envolvendo feijão caupi e *S. rolfsii*, trabalhos relevantes são pouco divulgados ou inexistentes.

Os primeiros trabalhos utilizando o potencial de leveduras no controle biológico de doenças de plantas foram realizados a partir de 1980, onde se verificou a ação deste grupo de microrganismos sobre o crescimento e esporulação de alguns fitopatógenos (PUNJA; UTKHEDE, 2003). Entretanto, apesar dos muitos trabalhos relatados, utilizando leveduras no controle de fungos fitopatogênicos que causam doenças foliares e de pós-colheita, uma pouca atenção tem sido dada ao uso de leveduras como agentes biocontroladores de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, quando comparados ao uso de bactérias e fungos filamentosos antagonistas no controle biológico deste mesmo grupo de fitopatógenos (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006, SCHISLER et al., 2011).

Somente em estudos mais recentes, espécies de leveduras têm sido citadas como sendo potenciais antagonistas a fungos fitopatogênicos habitantes do solo (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; MORANDI et al., 2009; SCHISLER et al., 2011). Os estudos das interações entre leveduras e outros microrganismos fitopatogênicos, tem demonstrado que as mesmas podem desempenhar um importante papel na supressão de fitopatógenos habitantes do solo, incluindo nestes, uma grande diversidade de fungos fitopatogênicos (BOTHIA, 2011).

Dentre os mecanismos de antagonismo mais conhecidos e desempenhados por leveduras, encontra-se a indução de resistência em plantas hospedeiras (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; EL MEHALAWY et al., 2007); a competição por espaço e nutrientes; antibiose pela produção de metabolitos antifúngicos difusíveis, compostos voláteis e enzimas que degradam a parede celular e o micoparasitismo (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; SCHISLER et al., 2011). Estes estudos se baseiam principalmente na relação antagônica de leveduras no controle de patógenos fúngicos de partes aéreas de plantas, devido ao fato de que os mecanismos funcionais de antagonismo de algumas espécies de leveduras, atuando nestas partes vegetais, são semelhantes aos que ocorrem em outras partes da planta hospedeira, tais como as regiões do colo, raízes e tubérculos no solo (EL TARABILY;

SIVASITHAMPARAM, 2006). Aliado a este fato, sabe-se que muitas espécies de leveduras antagônicas são alóctones, podendo crescer epifiticamente em plantas controlando patógenos em partes aéreas, sendo estas leveduras oriundas de outros ambientes, a exemplo, migrando do solo para filosfera ou em processo inverso, estas espécies podem também apresentar bons potenciais antagônicos a serem explorados em relação a outros grupos fitopatogênicos que atacam diferentes tecidos vegetais (BOTHA, 2011). Alguns isolados de leveduras do gênero *Candida*, coletados a partir de amostras de solo, foram eficazes no controle de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Philips-Mora., fungo causador da vassoura de bruxa, uma doença de parte aérea de plantas de cacaueteiro (DE SOUZA et al., 2009), indicando desta forma, que algumas espécies deste gênero de levedura podem exercer atividade antagônica a outros microrganismos do solo, entre eles muitos fungos fitopatogênicos encontrados neste habitat.

Entre as espécies de leveduras antagônicas estudadas no controle biológico de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, encontram-se: *Candida glabrata* (Anderson) Meyer & Yarrow.; *C. maltosa* Komag, Nakase & Katsuya; *C. slooffia* Uden & Souza; *Rhodotorula rubra* (Schimon) Harrison; *Trichosporon cutaneum* (Beurm, Gourgerot & Vaucher) Ota; (EL MEHALAWY et al., 2004), *Saccharomyces unispora* (Hansen) Meyen; *Candida steatolytica* Yarrow (EL MEHALAWY, 2004), *Candida valida* Leberle; *Rhodotorula glutinis* Harrison; *Trichosporon asahii* Akagi (EL TARABILY, 2004), *Epicoccum purpurascens* Ehrenberg; *E. nigrum* Link.; *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner; *Pichia anomala* Hansen (MORANDI et al., 2009), *Candida sake* Saito & Ota; *Pichia membranifaciens* (Hansen) Kurtzman (ABO-ELYOUSR; MOHAMED, 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen) Hansen (SHALABY; EL NADY, 2008; EL WAKIL et al., 2009), *Candida incommunis* Ohara, Nonomura & Yamazaky, e *Hansenula arabitolgenes* Fang (EL MEHALAWY et al., 2007). Estudos demonstraram que a aplicação de compostos a partir de turfas obteve sucesso no controle do tombamento de plântulas de agrião (*Lepidium sativum* L.) causado por *Pythium silvaticum* Camp. & Hendrix. Após levantamento da microbiota existente nas turfas amostradas e ensaios experimentais conduzidos, foi identificada uma grande atividade supressiva ao patógeno atribuída por leveduras do gênero *Cryptococcus* contidas nestes materiais. Neste estudo também foi evidenciada a relação da supressividade dos compostos ao patógeno onde a população deste gênero foi maior em relação as amostras

de turfas que foram conducivas à doença, cuja população destas leveduras foi aparentemente menor (HUNTER et al., 2006).

Em outros estudos conduzidos por El Tarabily (2004), comprovou a eficácia de *C. valida*, *T. asahii* e *R. glutinis* no controle de doenças causadas pelo fungo habitante solo *R. solani*. A aplicação destas espécies de leveduras reduziu a severidade da podridão de raízes e a incidência do tombamento em plântulas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) em condições de casa de vegetação. Em outro patossistema envolvendo *R. solani*, experimentos realizados por El Mehalawy et al (2007), demonstraram que as espécies *C. incommunis*, *C. steatolytica* e *Hansenula arabitolgenes*, também reduziram a incidência do tombamento de plântulas de algodoeiro em ensaios experimentais.

Nestes estudos mencionados abrangendo patossistemas com *R. solani*, verificou-se a correlação do aumento de produção de fitohormônios em plântulas que receberam tratamentos envolvendo a inoculação de leveduras nas plantas hospedeiras. Estes fitohormônios, tais como ácido giberélico (AG) e indolacético (AIA), são conhecidos como reguladores de crescimento em plantas, acelerando o desenvolvimento vegetal e contribuindo desta forma para uma maior tolerância do hospedeiro ao ataque de *R. solani*, cujo dano causado por este fungo em plantas encontradas em estágios vegetativos iniciais é mais prejudicial (EL TARABILY, 2004; EL MEHALAWY et al., 2007).

Além da promoção de crescimento, certas espécies de leveduras são capazes de ativar mecanismos de defesa, induzindo resistência em hospedeiros, tal como a deposição de papilas em células bem como a produção de fitoalexinas e peroxidases em plantas (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). O uso de leveduras também foi demonstrado por Mohammed et al. (2008) na redução da severidade da rizoctoniose da batateira (*Solanum tuberosum* L.), em associação com micorrizas vasculares e *Trichoderma viride* ou quando individualmente aplicadas. Alguns isolados de leveduras neste estudo também promoveram o controle do patógeno *in vitro*.

Em estudos realizado por Elwalkil et al (2009), foi utilizado a espécie *S. cerevisiae* no controle de doenças ocasionadas por diferentes espécies fungicas habitantes do solo, tais como: *F. solani* (Mart.) Sacc.; *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.; *F. oxysporum*; *R. solani*; *Verticillium dahliae* Kleb.; *Cephalosporium* sp. O tratamento de sementes de feijão fava (*Vicia faba* L.) com *S. cerevisiae*, acarretou a redução dos danos causados em pré e pós emergência de plantas em todos os

patossistemas avaliados, além do excelente aumento da produção de biomassa vegetal e aumento da capacidade fotossintética proporcionado pelo tratamento de sementes com o antagonista. Um significativo aumento da capacidade fotossintética, bem como o controle biológico de *F. oxysporum* acometendo plantas de beterraba também foi relatada quando sementes desta hortaliça foram tratadas com a espécie *S. cerevisiae* (SHALABY; EL NADY, 2008).

O efeito de leveduras também foi mencionado na promoção do crescimento de plantas de feijão caupi, quando estas foram tratadas através da aplicação da micorriza arbuscular *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerd & Trappe. em conjunto com *R. mucilaginosa* (Jörg.) Harrison. Nesta interação foi observado o aumento dos teores de clorofila, nitrogênio, fósforo e compostos fenólicos nas plantas avaliadas (BOBY; BALAKRISHNA; BAGYARAJ, 2008).

Visando o controle biológico da murcha de fusário do tomate, causado por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen., nos trabalhos realizados por Abo-Elyousr e Mohamed (2009) onde plântulas foram tratadas com as espécies *C. sake* e *P. membranifasciens*, ambas as espécies de leveduras obtendo-se em 12,5 e 11,7%, respectivamente, a redução da severidade da doença em condições experimentais após oito semanas de avaliação. Os autores relataram um alto ganho de massa vegetal nas plântulas tratadas com estas espécies, indicando que a promoção de crescimento auxiliou na diminuição da severidade da doença neste patossistema.

A relação da antibiose como mecanismo de antagonismo de leveduras foi relatada no controle de doenças fungicas que afetam tecidos vasculares de plantas, tal como a murcha em feijão roxo, causada pelo fungo *F.oxysporum*, onde El Mehalawy (2004), através do tratamento de sementes com as espécies de leveduras *S. unispora* e *C. steatolytica*, reduziu a severidade da doença em mais de 75% nos tratamentos que receberam estas leveduras. Neste mesmo estudo, foi verificada a presença de dez diferentes compostos antifúngicos de altos e baixos pesos moleculares, entre estes, cerca de uma dezena de ácidos produzidos por estas espécies de leveduras, atuando diretamente na inibição do crescimento micelial do patógeno *in vitro*.

Na interferência de compostos produzidos por leveduras inibindo fitopatógenos, se faz importante a participação da atividade “killer” apresentada por alguns isolados de leveduras, nos quais são capazes de produzir toxinas extracelulares (de composição glicolípídica ou glicoproteica) com ação antifúngica ou fungistática sobre outras

leveduras e/ou fungos filamentosos (GOLUBEV, 2006). A atividade “killer” está entre os principais mecanismos de competição e seletividade apresentados por leveduras dentro de habitats onde estes microrganismos atuam. Contudo, sabe-se que a capacidade de produção de toxinas “killer” em leveduras pode variar entre espécies e isolados dentro das mesmas, sendo a presença da atividade “killer” uma característica determinada por elementos extra-cromossômicos, estes herdados de uma forma não-mendeliana (PHILLISKIRK; YOUNG, 1975).

As toxinas “killer” podem afetar diretamente a parede celular do microrganismo alvo, causando a morte do mesmo. Além da atividade “killer”, a produção de enzimas por leveduras também pode causar efeitos deletérios sobre células de outros microrganismos envolvidos neste processo de antibiose (GOLUBEV, 2006).

Dentre as principais enzimas conhecidas e produzidas por leveduras, envolvidas na antibiose a fungos fitopatogênicos, estão: as β -1, 3-glucanases e quitinases (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). A exemplo do controle de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, a grande produção de β -1, 3-glucanases e quitinases ocasionada por microrganismos antagonistas foi atribuída no controle da murcha tardia do milho, causada por *Cephalosporium maydis* Samra, Sabet & Hingorani. Em ensaios *in vitro*, verificou-se que estas enzimas, quando produzidas no processo de antagonismo, promoveram intensa plasmólise da parede celular do patógeno alvo (EL-MEHALAWY et al., 2004). Contudo, poucos são os estudos destas enzimas presentes em leveduras no processo de degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos do solo, em comparação a estas mesmas enzimas produzidas por outros grupos de antagonistas (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

Dos principais mecanismos de antagonismo de leveduras, a competição por nutrientes tem um importante destaque. O exemplo de algumas leveduras tem elucidado a capacidade de competição destas por ferro, interferindo desta forma sobre outras comunidades da microbiota do solo, através da produção de sideróforos (BOTHA, 2011). Estes sideróforos são quelantes de baixo peso molecular, produzidos por diferentes microrganismos na aquisição deste mineral (NEILANDS, 1981).

O papel de sideróforos produzidos por leveduras é bem conhecido na espécie de levedura *R. glutinis* (Fresen) Harrison, sendo esta espécie de levedura capaz de produzir o ácido rodotorulico, importante componente de sideróforos que sequestra o ferro do ambiente, o indisponibilizando desta forma para outros microrganismos, e

consequentemente suprimindo o desenvolvimento destes onde atuam (SANSONE et al., 2005). Na produção destes sideróforos, foi observada em ensaios *in vitro*, a inibição da germinação de conídios de patógenos fúngicos, tais como *Penicillium expansum* Link. e *Botrytis cinerea* Pers., considerados como importantes fitopatógenos de pós colheita (CALVENTE; BENUZZI; TOSETTI, 1999). De modo similar, a levedura *Metschnikowa pulcherrima* Pitt. & Mill., também foi relatada na inibição de vasta gama de comunidades microbianas do solo, devido a produção de ácido pulcherriminico e complexos de ferro, reduzindo a disponibilidade deste mineral para outros microrganismos concorrentes (SIPICZKI, 2006). Na competição por espaço e nutrientes, observações microscópicas demonstraram que muitas leveduras podem se multiplicar em abundância próximo a hifas de fungos fitopatogênicos crescendo sobre exsudatos secretados por folhas e frutos de hospedeiros sugerindo que a concorrência por espaço e nutrientes possa também ocorrer em outras regiões, tal como na rizosfera, inibindo desta forma a colonização de diversificados fitopatógenos radiculares (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

O entendimento e identificação de leveduras e as suas interações com agroecossistemas demonstra uma ferramenta importante para o controle biológico de doenças de plantas, melhorando desta forma, o uso de práticas mais viáveis na promoção de uma agricultura mais sustentável (BOTHÁ, 2011). Apesar do conhecimento dos efeitos benéficos de leveduras na otimização de características agronômicas desejáveis na cultura do feijão caupi (BOBY; BALAKRSHINA; BAGYARAJ, 2008), o uso destes microrganismos como agentes de controle biológico dentro do manejo de doenças nesta cultura tem sido negligenciado e/ou pouco explorado, principalmente em patossistemas que envolvem fungos fitopatogênicos habitantes do solo, tal como a espécie *S. rolfsii*.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (a) Selecionar, identificar e verificar a estabilidade de isolados de leveduras potenciais no controle biológico da podridão-de-esclerócio em feijão caupi; (b) elucidar as possíveis interações antagônicas de leveduras sobre a espécie fitopatogênica *S. rolfsii*, bem como a capacidade destas leveduras na promoção de crescimento de plantas de feijão caupi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBITE, A. A.; AMUSA, N. A. The major economic field diseases of cowpea in humid agro-ecologies of South-western Nigeria. **African Journal Biotechnology**, Cairo, v. 7, n. 25, p.4706-4712, 2005.

ABO-ELSYOUSR, K. A. M.; MOHAMED, H. M. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by plant growth promoting yeasts and rhizobacteria. **The Plant Pathology Journal**, Seul, v. 25, n. 2, p.199-204, 2009.

ADANDONON, A. **Damping-off and stem rot of cowpea in benin caused by *Sclerotium rolfsii***. 2004. 154 f. Tese (Doutorado em Microbiologia e Patologia de Plantas) – Universidade de Pretoria, Pretoria.

ADANDONON, A.; AVELING, T. A. S.; LABUSCHAGNE, N.; TAMO, M. Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium* caused cowpea damping-off and stem rot. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, n. 115, p. 409-418, 2006.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635.p.

AGROFIT – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA 2012**: Sistema de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2012. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos> > Acesso em: 06 dez. 2012.

AYCOCK, R. **Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii***. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station, 1966. 202p.

- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 463-484.
- BARBOSA, M. S.; SANTOS, M. A. S.; SANTANA, A. C. Análise socioeconômica e tecnológica da produção de feijão-caupi no município de Tracuateua, nordeste paraense. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v. 5, n. 10, p.7-25, 2010.
- BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção: uma visão global. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais-Zona da Mata, 2010, cap.1, p. 1-24.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 125-152.
- BEUTE, M. K.; KABANA, R. R. Effects of soil moisture, temperature, and environmental on survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 12, p. 1293-1296, 1981.
- BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, cap. 23, p. 443-449.
- BEDENDO, I. P.; MASSOLA JÚNIOR, N.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, cap. 17, p. 387-388.
- BENEVENUTTI, V. **Gestão governamental de apoio a produção de feijão: o caso Pernambuco (1991-1994)**. 1996. 160 f. Dissertação (Mestrado em Administração Rural e Comunicação Rural) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BOBY, V.U.; BALAKRSHINA, A. N.; BAGYARAJ, D.J. Interaction between *Glomus musseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. **Microbiological Research**. Copenhagen, v. 163, p. 693-700, 2008.

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

BRUEHL, G. W. **Soilborne plant pathogens**. New York: MacMillan, 1987. 368.p.

CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTI, S.I.S. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum* . **International Biodeterioation & Biodegradation**, Oxford, v. 43, p. 167-172, 1999.

CASTRO, J. L.; ITO, M. F.; MARINGONI, A. C.; BARLADIN, R. S. Desafios ao controle de doenças na cultura do feijoeiro nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Doenças fúngicas do caupi. In: VI SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOEIRO, 5. 2006. Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2006. p. 17-24.

CEASA-PE - Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco. Disponível em: < <http://www.ceasape.org.br/verCotacao.php?tipo=cereais#> > . Acesso em: 22 dez. 2012.

CILLIERS, A. J.; HERSELMAN, L.; PRETORIUS, Z. A. Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. **Phytopathology**. Saint Paul, v.90, n.9, p.1023-1031, 2000.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. 2. ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1983. 539 p.

COELHO, R. S. B. Doenças fúngicas do caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5. 2001. Teresina. **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p. 321-322.

DE SOUZA, A C.; CARVALHO, P. M. B.; PINOTTI, P.; HAGLER, A. N.; HAGLER, L. C. S. M.; MACRAE, A. Killer yeasts inhibit the growth of the *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches broom disease. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 40, p.108-110, 2009.

EL MEHALAWY, A. A. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused for *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 6, n. 2, p. 310-316, 2004.

EL MEHALAWY, A. A.; HASSANEIM, N. M.; KATHER, H. M.; EL DIN, E. A. K.; YOUSSEF, Y. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth promoter on the biological control of late wilt disease. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 6, n. 4, p. 599-604, 2004.

EL MEHALAWY, A. A.; HASSANIN, S. M.; HASSANIN, N. M.; ZAKI, S. A. Induction of resistance and biocontrol of *Rhizoctonia* in cotton against damping-off disease by rhizosphere microorganisms. **New Egypt Journal Microbiology**, Cairo, v. 17, p.148-168, 2007.

EL TARABILY, K. A. Supression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal Applied Microbiology**, Hoboken, v.96, p.69-75, 2004.

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

ELWAKIL, M.A.; AWADALLAH, O. A.; EL REFAI, I. M.; EL METWALLY, M.A.; MOHAMMED, M.S. The use of bread yeast as a biocontrol agent for controlling seed-borne fungi of faba bean. **Plant Pathology Journal**, New York, v.8, n.4, p.133-143, 2009.

FAO - Fao-Food and Agriculture Organization. Faostat. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> . Acesso em: 10 nov. 2012.

FARIA, F. A.; JÚNIOR BUENO, C.; PAPA, M. F. S. Atividade fungitóxica de *Mormodica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 3, p. 383-389, 2009.

FERY, R. L.; DUKES, P. D. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: genetic characterization of two sources of resistance. **International Journal**

Agronomy, 2011. Disponível em:<<http://www.hindawi.com/journals/ija/2011/652404/>>
Acesso em: 04 jul. 2012.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C.A.F.
Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no nordeste brasileiro. Embrapa Semi Árido, 1999. Disponível em:
<<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo//livrorg/>> Acesso em: 20 jul. 2012.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. **O caupi no Brasil**. Goiânia: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa Arroz Feijão, 1988. p. 25-46.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p. 470-476, 2008.

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

HUNTER, P. J.; PECHT, G.M.; CALVO-BADO, L. A.; PETTITT, T. M.; PARSONS, N. R.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M. Differences in microbial activity and microbial populations of peat associated with suppression of damping off disease caused by *Pythium sylvaticum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.10, p.6452-6460, 2006.

INDEX FUNGORUM. **Family Names Databases**. Disponível em:
<<http://www.indexfungorum.org/names/families.asp?FamilyName=Atheliaceae>>.
Acesso em: 17 out. 2012.

KOKUB, D.; AZAM, F.; HASSAN, A.; ANSAR, M.; ASAD, M. J.; KHANUM, A. Comparative growth, morphological and molecular characterization of indigenous *Sclerotium rolfsii* strains isolated from different locations of Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.5, n. 39, p. 1849-1866, 2007.

- MACHADO, L. P. **Indução da supressividade à rizoctoniose do feijão-caupi pela rotação de culturas e adubação verde**. 2012. 111 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- MADI, L.; KATAN, J.; KATAN, T.; HENIS, Y. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 10, p. 1054-1060, 1997.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, cap. 8, p. 149-206.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M.; MENEZES, M. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 1-18.
- MOHAMMED, A. S.; EL HASSAN, S. M.; EL BALLA, M. M. A.; EL SHEIK, E.A.E. The role *Trichoderma*, VA Mycorrhiza and dry yeasts in the control of *Rhizoctonia* disease of potato (*Solanum tuberosum* L.). **University of Khartoum Agriculture Science**, Shambat, v. 16, n.2, p. 285-301, 2008.
- MORALES, R. G. F.; SANTOS, I.; DANNER, M. A. Efeito do chorume líquido de suínos na podridão do colo e tombamento de plântulas de feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 429-433, 2007.
- MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BETTIOL, W.; TEXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, 2009.
- NECHET, K. L.; VIEIRA, B. A. H. **Doenças do feijão caupi em Roraima**. Boa Vista: Embrapa/Roraima, 2006. 16 p. (Comunicado Técnico, 2).
- NEILANDS, J. B. Microbial iron compounds. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 50, p.715-731, 1981.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B.B. et al. **Advances in cowpea research**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 1997. p. 1-12.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M.; ANDRADE, G. P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, J.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.F.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p.215-222.

PHILLIPSKIRK, G.; YOUNG, T.W. The occurrence of killer character in yeast of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, v.41, p. 147-151, 1975.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, R. S.; SILVA, J. F. A. F. **Principais doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Pará e recomendações de controle**. Belém: Embrapa/CPATU, 1994. 24 p. (Documentos, 75).

PUNJA, Z. K.; GROGAN, R. G. Effects of inorganic salts, carbonate and bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of pH on sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Palo Alto, v.72, p.635-39, 1982.

PUNJA, Z. K.; HUANG, J. S.; JENKINS, S. F. Relationship of mycelial growth and production of acid oxalic and wall cell degrading enzymes to virulence in *Sclerotium rolfsii*, **Canadian Journal of Plant Pathology**, Oxon, v. 7, p. 109-117, 1985.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p.97-127, 1985.

PUNJA, Z. K. Comparative efficacy of bacteria, fungi and yeasts as biological control agents for diseases of vegetables crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Oxon, v. 19, p. 315-323, 1997.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crops diseases. **Trends in Biotechnology**, Londres, v. 21, p. 400-407, 2003.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops: dicotyledons**. New York: Jhon Wiley & Sons, 1976, 736 p.

ROBBS, C. F. Controle biológico de doenças de plantas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 167, p. 63-71, 1991.

SALES JÚNIOR, R.; MEDEIROS, E. V.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M. RODRIGUES, V. J. L. B. Controle químico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 345-366.

SANSONE, G.; REZZA, I.; CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTI, S.I.S. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Phostharvest Biology and Technology**, Amisterdã, v. 35, 245-251, 2005.

SANTOS, I.; TOMAZELI, V. N.; MORALES, R. G. F. Resíduos orgânicos e solarização para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 13, p.209- 224.

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**, Szeged, v. 52, n. 2, p. 271-275, 2008.

SCHISLER, D. A.; JANISIEWICZ, W, J.; BOECKHOUT, T.; KURTZMAN, C. P. Agriculturally important yeasts: Biological control of field and postharvest diseases using yeasts antagonists, and yeasts pathogens of plants. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOECKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. London: Elsevier, 2011, cap. 4, p. 45-58.

SMARTT, J. **Grain legumes: evolution and genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 333 p.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- Zona da Mata, 2010, cap.3, p. 33-54.

SILVA, K. J. D. **Estatística da produção de feijão caupi**. Grupo Cultivar, 2011.
Disponível em:<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=880>
Acesso em: 07 nov. 2012

SINGH, S. R.; ALLEN, D. J. **Cowpea pests and diseases**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 1979, 85 p.

SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S. A.; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMO, M. (Eds). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. P. 22-40.

SINGH, U.P.; SARMA, B.K. **Biology and control of *Sclerotium rolfsii*: the incitant of collar rot of *Cicer arietinum***. Saarbrücken: VDM, 2009,198p.

SIPICZKI, M. *Metschnikowa* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, p.6716-6724, 2006.

SURHONE, L. M.; TENNOE, M. T.; HENSSONOW, S. F. ***Sclerotium***. Mauritius: Betascript Publishing, 2011, 56p.

TOSTI, N.; NEGRI, V. Efficiency of three PCR based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 2, p. 268-275, 2002.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p.487-511, 2001.

XU, Z.; HARRINGTON, T. C.; GLEASON, M. I.; BATZER, J. C. Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. **Mycologia**, Lawrence, v.2, n. 102, p. 337-346, 2010.

CAPÍTULO II

Seleção de leveduras visando o controle biológico da podridão-de-esclerócio em feijão caupi

Seleção de leveduras visando o controle biológico da podridão-de-esclerócio em feijão caupi

Leonardo Tavares de Souza¹, Rejane Pereira Neves², Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho¹, Adriana Pereira Melo¹, Maria Geane Fontes², Delson Laranjeira¹

¹ UFRPE/DEPA – Área de Fitossanidade, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n – 52171-900 – Recife, PE – Brasil.

² UFPE/CCB – Departamento de Micologia, Av. Professor Moraes Rego, 1235 – 50670-901 – Recife, PE – Brasil

*Autor correspondente <delson@depa.ufrpe.com.br>

Título abreviado: Leveduras no controle biológico da podridão-de-esclerócio

Categoria do manuscrito: Fitopatologia

Resumo

O fungo *Sclerotium rolfsii* é um importante habitante do solo, que causa doenças em muitos vegetais de interesse agrícola. Na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), este fitopatógeno é o agente causal da podridão-de-esclerócio, sendo conhecidas poucas medidas viáveis de controle dentro do manejo desta doença. Um total de 74 isolados de leveduras foi utilizado no tratamento de sementes de feijão caupi visando a seleção de isolados com potencial antagonico na redução da severidade da podridão-de-esclerócio em condições de casa-de-vegetação. Nos testes de seleção de antagonistas, cinco isolados de leveduras (L-1, L-5, L-F, L-N e L-SJAD) apresentaram valores de redução do índice da doença (RID) em valores $\leq 25\%$ em ensaios experimentais repetidos perante um isolado de *S. rolfsii* pré-selecionado como padrão de patogenicidade. A estabilidade antagonica para a maioria das leveduras selecionadas foi confirmada perante avaliação da RID utilizando diferentes isolados de *S. rolfsii*, apresentados por distintos padrões de virulência, bem como por diferentes concentrações de leveduras no tratamento de sementes. As leveduras selecionadas foram identificadas como sendo pertencentes a espécie *Kodamea ohmeri* por meio de taxonomia clássica e por biologia molecular através das regiões genômicas ITS1 e ITS4. Nas presentes condições avaliadas, foi evidenciado o primeiro relato do uso de *K. ohmeri* no tratamento de sementes como ferramenta de controle biológico da podridão-de-esclerócio na cultura do feijão caupi.

Palavras-chave: Antagonismo, *Kodamea ohmeri*, *Sclerotium rolfsii*, *Vigna unguiculata*

Introdução

O feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], é uma importante fonte de alimento dentre as espécies cultivadas da família Fabaceae, destacando-se na agricultura de diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Singh et al., 2002). Dentre os fatores que podem limitar a produtividade do feijão caupi em áreas de cultivo, estão às diversas doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos, tal como a podridão-de-esclerócio, causada pelo fungo fitopatogênico habitante do solo *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Adegbite e Amusa, 2005; Athayde Sobrinho et al., 2005; Fery e Dukes, 2011).

A espécie *S. rolfsii* é caracterizada pela sua alta gama de plantas hospedeiras, competição saprofítica e persistência no solo, devido a formação de estruturas de resistência denominadas esclerócios (Punja, 1985; Singh e Sarma, 2009; Bedendo, 2011). Em plantas acometidas por *S. rolfsii*, geralmente são observados sintomas de murcha e amarelecimento de folhas, devido aos danos causados na região do colo da planta hospedeira, geralmente causando a morte de plantas encontradas em estágios iniciais de crescimento (Singh e Sarma, 2009).

As medidas mais comumente adotadas no controle de doenças ocasionadas por *S. rolfsii* visam a redução do inóculo no campo, incluindo a rotação de culturas, erradicação de restos culturais, eliminação de hospedeiros alternativos e o controle químico (Bedendo, 2011). Contudo, muitas destas práticas no controle de doenças ocasionadas por *S. rolfsii* podem se apresentar como inviáveis na relação econômica de custo/benefício, bem como pelos possíveis danos ao meio ambiente (Athayde Sobrinho et al., 2005; Singh e Sarma, 2009). Neste contexto, o uso de microrganismos antagonicos obtidos de processos naturais como agentes de controle biológico do

fitopatígeno, pode se tornar uma prática justificável e tecnicamente sustentável no ponto de vista ambiental (Morandi, 2010). O sucesso relatado de leveduras antagônicas no controle biológico de doenças causadas por fitopatógenos fúngicos de parte aérea, leva a hipótese de que os mesmos mecanismos antagônicos existentes nestas leveduras, também possam ocorrer no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos habitantes do solo (El Tarabily e Sivasithamparam, 2006; Botha, 2011). Com este intuito, o presente trabalho teve como objetivo selecionar e identificar leveduras com potencial antagônico no controle biológico da podridão-de-esclerócio em feijão caupi causada por *S. rolfsii* em condições de casa-de-vegetação.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fungos do Solo e em casa-de-vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.

Testes de patogenicidade

Visando selecionar isolados de *S. rolfsii* com diferentes padrões de virulência na incitação da podridão de esclerócio em plantas de feijão caupi, foi utilizado um total de 44 isolados do patógeno concedidos pela Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof^a Maria Menezes” - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Em um primeiro teste de patogenicidade, foi utilizada a metodologia de inoculação do patógeno adaptada por Blum et al. (2003), na qual sementes de feijão

caupi (cultivar IPA-206; 99,09% de germinação) foram desinfestadas por imersão em solução de NaOCl (0,5%) por dez minutos e posteriormente lavadas por três vezes em água-destilada-esterilizada (ADE). Para a obtenção do inóculo, foi realizada a extração de esclerócios oriundos de colônias do patógeno com 14 dias de crescimento em meio batata-dextrose-ágar (BDA) sob incubação à 28°C em fotoperíodo alternado de 12 h (luz/escuro). A inoculação do patógeno consistiu na deposição de dois esclerócios sobre a superfície de cada semente no ato da semeadura, realizada em covas encontradas no interior de vasos (1,3L⁻¹) de plástico, preenchidos com solo (textura franco-arenosa; pH= 5,73; P= 2mg dm³; Na= 2,4 cmol_c dm³; K⁺= 0,73 cmol_c dm³; Ca⁺²+Mg⁺²= 1,6cmol_c dm³; Ca⁺²=0,9 cmol_c dm³ ; Al⁺³=0,8 cmol_c dm³; H + Al = 5,68cmol_c dm³; C.O=2,31g kg; M.O= 3,97g kg) esterilizado por autoclavagem (120°C; 1 atm; 1h; 2 dias consecutivos).

Em um segundo ensaio experimental, foi utilizado a metodologia de inoculação adaptada de Serra e Silva (2005), onde grãos de arroz autoclavados foram depositados sobre colônias do patógeno com 7 dias de crescimento em placas de Petri (90 mm) contendo meio BDA incubadas à temperatura de 28° C sob fotoperíodo alternado de 12 h (luz/escuro). Decorrido o período de 7 dias de incubação, em condições supramencionadas de temperatura e fotoperíodo, os grãos de arroz colonizados pelo fungo foram extraídos das placas de Petri e depositados na proporção de 0,25 g por cova de plantio, em vasos de mesmo volume e condições do solo estabelecido no primeiro ensaio experimental. Transcorridas 48 h após a infestação das covas de plantio, foi realizada a semeadura com sementes de feijão caupi desinfestadas.

Os vasos contendo os tratamentos foram acondicionados sobre bancadas em casa-de-vegetação, por um período de avaliação de 14 dias, sob temperatura variando

entre 25-36°C e 26-35°C, com umidade relativa do ar (UR) entre 57-68% e 60-71%, para o primeiro e segundo ensaio experimental, respectivamente. Nos presentes ensaios, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada ensaio composto por 44 tratamentos (isolados de *S. rolfsii*), com 4 repetições (vasos), sendo cada repetição representada por 4 unidades amostrais (plantas). A testemunha foi representada por vasos semeados com feijão caupi sem a presença do patógeno

Após o período de 14 dias, foi realizada a avaliação da severidade da podridão-de-esclerócio incitada pelos diferentes isolados de *S. rolfsii* nas duas condições experimentais estabelecidas. Para ambos os ensaios conduzidos, a avaliação da severidade foi realizada através da escala de notas adaptada de Blum et al (2003), onde: 0=planta sadia; 1=planta com podridão no colo; 2=planta murcha; 3=planta morta; 4=planta não germinada ou com tombamento em pré emergência. As notas obtidas foram transformadas em percentuais de severidade da doença, através do cálculo do Índice da Doença (ID) de Mckinney (1923), onde: $ID = \frac{[(\text{número de plantas com nota } 0 \times 0) + (\text{número de plantas com nota } 1 \times 1) + (\text{número de plantas com nota } 2 \times 2) + (\text{número de plantas com nota } 3 \times 3) + (\text{número de plantas com nota } 4 \times 4)] \times 100}{[(\text{total de sementes plantadas por vaso}) \times (\text{grau máximo da escala de notas})]}$.

Para os testes de controle biológico, foi escolhido um isolado de *S. rolfsii* como padrão de virulência com base nos valores de severidade da doença (ID) nos dois testes de patogenicidade realizados, bem como o melhor método de inoculação do patógeno.

Testes de controle biológico

Para realização dos testes de seleção de leveduras antagônicas no controle biológico da podridão-de-esclerócio, foi utilizado um total de 74 isolados de leveduras, sendo estas extraídas de plantas de feijão caupi coletadas em diferentes áreas de cultivo das mesorregiões: Sertão, Agreste e Zona da Mata, no estado de Pernambuco, Brasil.

A partir das plantas coletadas, foram retirados fragmentos de amostras de tecidos de raízes, colo, caule e folhas. Os fragmentos foram imersos separadamente em tubos de ensaio, contendo 10 mL^{-1} de água esterilizada não destilada, adicionada de clorafenicol (50 mg L^{-1}). Os tubos foram submetidos à agitação ultrassônica por 10 min, com posterior agitação em “vórtex” por 30 segundos. Depois de efetuada uma diluição (10^{-1}) do conteúdo dos tubos, uma alíquota de $0,1 \text{ mL}^{-1}$ foi retirada e posteriormente distribuída de forma homogênea com auxílio de alça de Drigalski em superfície de placas de Petri contendo meio Sabouraud (peptona 10 g; ágar 15 g; dextrose 40 g; água destilada esterilizada 1000 mL^{-1}), adicionado com extrato de levedura ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) e clorafenicol (50 mg L^{-1}). Em seguida, as placas foram mantidas em incubação por 72 h em temperatura de 25° C sob fotoperíodo contínuo. A partir das colônias de leveduras formadas, foram realizadas repicagens para tubos de ensaio contendo meio Sabouraud, com posterior acondicionamento dos mesmos em temperatura ambiente.

Os isolados de leveduras obtidos foram utilizados no tratamento de sementes de feijão caupi (cultivar IPA-206), sendo o tratamento de sementes realizado por imersão em suspensões de leveduras na concentração de 1×10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL^{-1} em um período de 10 min, com posterior acondicionamento das sementes em temperatura de 28° C por 12 h antes da semeadura. Em vasos de plástico ($1,3 \text{ L}^{-1}$) mantidos em casa-de-vegetação, preenchidos com solo esterilizado de mesma característica físico-química utilizado nos testes de patogenicidade, foram feitas

covas de plantio, nas quais foram infestadas com porções de 0,25g por cova de arroz colonizado pelo isolado de *S. rolfsii* (CMM-3034) pré-selecionado nos testes de patogenicidade. Após 48 h da etapa de infestação das covas conforme a metodologia de inoculação adaptada de Serra e Silva (2005) realizou-se a semeadura das sementes de feijão caupi (cultivar IPA-206) tratadas com leveduras. Transcorridos 14 dias após a semeadura, os sintomas em plantas foram avaliados conforme a escala de notas proposta nos testes de patogenicidade, sendo a severidade da podridão-de-esclerócio calculada pelo Índice da Doença (ID). Nos presentes testes de seleção de leveduras, foram realizados dois ensaios experimentais repetidos, conduzidos sobre bancadas de casa-de-vegetação, com temperatura ambiente variando entre 24,5-35°C e UR de 61-69% e 58-64%, para o primeiro e segundo ensaio experimental, respectivamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo avaliados 74 tratamentos (isolados de leveduras), representados por 4 repetições (vasos), contendo 4 unidades amostrais (plantas) por repetição. A testemunha foi representada por vasos infestados com arroz colonizado pelo isolado do patógeno pré-selecionado e semeados com feijão caupi (cultivar IPA-206) sem tratamento com leveduras.

Os isolados de leveduras que repetiram a redução do índice da doença (RID) em $\geq 25,0\%$, em ambos os testes de seleção de antagonistas, foram avaliados quanto a estabilidade no controle biológico da doença em teste utilizando quatro diferentes concentrações de suspensões (1×10^7 , 10^5 , 10^3 e 10^1 UFC mL⁻¹) no tratamento de sementes de feijão caupi (cultivar IPA-206), bem como em um segundo teste de estabilidade no controle da doença perante 3 diferentes isolados do patógeno (CMM-3034, CMM-3042 e CMM-3071), sendo estes representados por distintos padrões de virulência na severidade da podridão-de-esclerócio apresentada nos testes de

patogenicidade. Para este segundo teste de estabilidade, o tratamento de sementes foi realizado em imersão em suspensão (1×10^7 UFC mL⁻¹) de concentração única de leveduras. Para ambos os testes de estabilidade do antagonismo a metodologia infestação de covas de plantio e aplicação de leveduras em sementes foi realizada conforme descrito anteriormente na etapa de seleção de leveduras. No teste de estabilidade com diferentes concentrações de leveduras e isolados do patógeno, utilizou-se 5 isolados de leveduras (tratamentos) selecionadas, com 4 repetições (vasos), dentro de cada concentração, sendo as repetições representadas por 4 unidades amostrais (plantas). Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação, em temperatura ambiente variando entre 25,5-36°C, com UR de 62-69%.

Identificação de leveduras selecionadas

Os isolados de leveduras selecionados nos testes de controle biológico foram identificados em nível de espécie através de taxonomia clássica, conforme Barnett et al. (2000) e por taxonomia molecular, através das regiões genômicas ITS1 e ITS4, segundo Valente et al. (1999).

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para os testes de patogenicidade e seleção de isolados de leveduras no controle biológico, os tratamentos foram comparados pelo teste de médias Scott-Knott (P=0,05).

Nos testes visando a estabilidade do controle biológico dos isolados de leveduras selecionados perante diferentes isolados de *S. rolfsii*, foram avaliadas as médias dos tratamentos comparadas pelo teste LSD ($P=0,05$). Os dados obtidos através da utilização de diferentes concentrações de leveduras no controle da doença foram avaliados através do ajuste de modelos de regressão linear, selecionando o melhor modelo conforme o coeficiente de determinação (R^2). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR (Versão 5.1 Build 72; Universidade Federal de Lavras, Brasil) e Statistix for Windows[®] (versão 9.0; Analytical Software Tallahassee).

Resultados e discussão

Testes de patogenicidade

Na seleção de isolados de *S. rolfsii* de maior virulência segundo a metodologia empregada no primeiro ensaio experimental, foram obtidos dois agrupamentos estatísticos distintos. Entre os 44 isolados do patógeno avaliados, conforme os resultados da severidade da doença calculada através do índice de doença (ID), um primeiro grupo de 15 isolados obteve valores de severidade da doença variando de 6,2 a 22,2%. Em um segundo grupo de severidade da doença os isolados obtiveram valores de severidade de 23,5 a 62,7% (Tabela 1).

No segundo ensaio experimental, obteve-se uma maior variabilidade da virulência entre isolados do patógeno testados. Nas condições avaliadas, foram obtidos seis grupos estaticamente distintos nos valores da severidade da doença. O grupo de

isolados que apresentaram menor severidade da doença foi representado por dois isolados, com valores de ID de 7,8 e 14,1% nas plantas avaliadas. Os isolados que promoveram maior severidade da doença foram representados em um sexto grupo constituído de vinte e seis isolados, onde os valores de ID variaram entre 89,10-100%. Neste mesmo grupo, dezesseis isolados apresentaram grau máximo (100%) de severidade da doença. Dos vinte e nove isolados considerados mais virulentos no primeiro ensaio experimental, dezenove destes repetiram estatisticamente os maiores valores de severidade no segundo ensaio experimental (Tabela 2).

A presença de diferenças na virulência entre os isolados testados podem está relacionadas a diversidade genotípica e patogênica existente dentro da espécie. Esta implicação foi descrita por Remesal et al. (2011), onde a variabilidade genotípica dentro da espécie *S. rolfsii* foi estudada através de diferentes grupos de compatibilidade micelial. Através de isolados coletados em distintas regiões geográficas e diversificados cultivos agrícolas, os autores elucidaram a correlação de diferenças genotípicas com o grau variabilidade da virulência apresentado dentro da espécie acometendo diferentes hospedeiros. Resultados semelhantes também foram obtidos por Flores-Moctezuma et al. (2006), demonstrando que a virulência dentro da espécie *S. rolfsii* pode variar conforme o isolado e grupo de compatibilidade micelial. Os patamares de severidade da doença (ID) nas plantas foram maiores para a maioria dos isolados testados quando utilizado a infestação de covas de plantio com arroz colonizado pelo patógeno em relação a severidade da doença quando empregou-se esclerócios sobre sementes.

A infestação das covas utilizando arroz colonizado pelo patógeno proporcionou uma melhor padronização do inóculo, influenciando no aumento da severidade da doença entre os isolados testados, quando comparado a deposição de esclerócios sobre

sementes, onde a maturação dos esclerócios pode não ter sido homogênea para a formação das colônias dos isolados avaliados e assim diminuindo o tempo de exposição do hospedeiro ao patógeno. Apesar dos resultados obtidos na metodologia utilizando arroz colonizado como inóculo, Punja (1985) e Matsumoto et al. (2000) consideram que o tipo de substrato não interfere na virulência de *S. rolfsii*. A diferença existente na germinação e conseqüente formação de colônias a partir de esclerócios são consideradas variadas entre isolados da espécie *S. rolfsii* (Serra e Silva, 2005), o que pode ter influenciado nas diferenças quanto ao grau de severidade da doença nas plantas avaliadas. Entre outros fatores a serem considerados em relação a virulência, estão às diferenças apresentadas por diferentes isolados na produção de enzimas e ácidos relacionados aos mecanismos de patogenicidade da espécie, além das diferenciadas taxas de crescimento micelial entre isolados (Punja, 1985).

Pelos resultados apresentados, foi escolhido dentre o grupo de isolados do patógeno, que se destacaram estatisticamente na promoção da doença, o isolado CMM-3034 como padrão de patogenicidade. A utilização de arroz colonizado pelo patógeno foi apresentada como o melhor método de inoculação nas condições avaliadas em relação a expressão da virulência do patógeno e na escolha de metodologias a serem empregadas nos posteriores testes de controle biológico.

Testes de controle biológico

Na avaliação da seleção de leveduras com potencial no controle biológico da podridão de esclerócio, no primeiro ensaio experimental realizado, os níveis de redução do índice doença (RID) variaram entre 0-65,7% (Tabela 3). O grupo de isolados de

leveduras (tratamentos) que proporcionou maior controle da doença foi representado por três isolados (L-F, L-69 e L-5), obtendo uma RID variando de 51,6-65,7% entre os mesmos. Em um segundo agrupamento estatístico, os tratamentos obtiveram um controle intermediário da doença, apresentando valores de RID entre 28,2-37,5%. O grupo que proporcionou menor controle da doença obteve valores de RID entre 0-23,5%, não diferindo estatisticamente da testemunha, tendo esta 1,6% de RID (Tabela 3).

No segundo ensaio experimental, foi observada novamente a formação de três grandes grupos na redução da severidade da doença. Os maiores valores de RID foram apresentados por um grupo constituído por onze isolados de leveduras, alcançando valores na redução da severidade da doença variando entre 25-34,4%. Um segundo grupo incluindo treze tratamentos, obteve valores médios de RID de 76,5-85,9%. O terceiro grupo, com um número total de dezenove tratamentos, não alcançaram valores de RID estatisticamente diferentes da testemunha, que apresentou um valor de RID de 3,2%. Os valores de RID neste último grupo de tratamentos apresentaram-se entre 0-12,5% (Tabela 4).

Nos dois testes de seleção de isolados de leveduras antagônicas, somente os isolados L-1, L-5, L-F, L-N e L-SJAD repetiram valores médios de RID em $\geq 25,0\%$. Dentro destes isolados de melhor desempenho no controle da doença, destaca-se o isolado L-F, no qual obteve os maiores valores de RID (34,3 e 65,6%) em ambos os ensaios experimentais. Apesar dos isolados L-69 e L-E proporcionarem valores de RID $\geq 25,0\%$ no primeiro ensaio experimental, ambos os isolados não repetiram a mesma eficiência no controle da doença em relação aos resultados obtidos no segundo ensaio experimental. Não foi observado incremento estatisticamente significativo dos valores

de ID em nenhum dos tratamentos com leveduras em relação a testemunha nos dois ensaios experimentais conduzidos.

Quando avaliada a eficiência dos cinco isolados de leveduras selecionados (L-1, L-5, L-F, L-N e L-SJAD), perante as quatro diferentes concentrações de suspensões no tratamento de sementes, notou-se de maneira geral, que o aumento de UFC nas suspensões dos isolados testados proporcionou uma gradativa diminuição da severidade da doença nas plantas avaliadas. Os valores do ID nos TR atamentos com leveduras foram de 97-100% na concentração mínima (10^1 UFC mL⁻¹) em imersão de sementes, sendo observado um valor de ID menor, quando empregada a concentração máxima (10^7 UFC mL⁻¹) em sementes, cujo os valores de ID alcançaram valores entre 62,8-73,5% entre os tratamentos com os isolados de leveduras (Figura 1).

Na avaliação dos cinco isolados de leveduras selecionados no controle da doença ocasionada por 3 diferentes isolados de *S. rolfsii*, a maioria dos isolados de leveduras foi estável na redução do índice da doença (RID). Somente o isolado de levedura L-N não apresentou redução significativa da severidade da doença em relação à testemunha, quando avaliados os valores de RID dentro do isolado do patógeno CMM-3034, obtendo este isolado de levedura uma RID de 15,7% na presente avaliação. Dentre os isolados de leveduras que apresentaram eficiência no controle da doença ocasionada pelo isolado CMM-3034, o isolado L-SJAD se destacou entre os demais, com uma RID de 51,7%. Em relação aos isolados do patógeno CMM-3042 e CMM-3071, todos os cinco isolados de leveduras foram significativamente eficientes na RID. Dentro do isolado CMM-3042 os valores de RID promovidos pelas leveduras variaram entre 29,7-37,5%, sendo todos os tratamentos com leveduras estatisticamente encontrados em um mesmo agrupamento estatístico. Em relação ao isolado do patógeno CMM-3071, os

valores de RID apresentados pelas leveduras avaliadas foram de 50-59,4%, apresentando todos os isolados de leveduras valores de RID superiores ao da testemunha (Tabela 6).

Identificação de leveduras selecionadas

Os isolados de leveduras L-5, L-F, L-1, L-N e L-SJAD selecionados através dos testes de controle biológico foram identificados conforme as metodologias de taxonomia clássica e molecular, como sendo pertencentes às espécies *Kodamaea ohmeri* (Tabela 7).

Como agente de controle biológico de doenças de origem fúngica, a espécie *K. ohmeri* (teleomorfo *Pichia ohmeri*) já foi estudada por Coelho et al (2009) no antagonismo à *Penicillium expansum*, uma espécie fúngica considerada de grande importância dentro da patologia pós-colheita. Nos resultados obtidos no trabalho mencionado, foi evidenciado que o isolado da espécie *K. ohmeri* foi capaz de inibir *in vitro*, o crescimento micelial de *P. expansum*. Neste mesmo estudo, através da purificação de extratos desta levedura, os autores associaram a antibiose, através da produção de toxinas *killer*, como o principal mecanismo de antagonismo a *P. expansum*. Entre outros estudos no controle biológico da espécie *P. expansum* realizados por Coelho et al (2007) e Coelho et al. (2008), foi demonstrada a alta capacidade de isolados de *K. ohmeri* na biodegradação de patulina, uma importante micotoxina produzida por *P. expansum*, que causa contaminação de frutos em pós-colheita.

Os resultados alcançados nas presentes condições avaliadas, através do tratamento de sementes com leveduras da espécie *K. ohmeri* selecionadas no controle da podridão-de-esclerócio, assemelham-se aos resultados obtidos no controle de outras

doenças radiculares, utilizando diferentes espécies de leveduras em diversificados patossistemas. Em trabalho conduzido por El Mehalawy (2004), evidenciou-se que a utilização das leveduras *Saccharomyces unispora* e *Candida steatolytica* no tratamento de sementes foi capaz de reduzir a murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* em patamares de 77,5 e 88,5%, respectivamente, em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) variedade kidney, após quatro semanas da semeadura em vasos contendo solo infestado com o patógeno sob condições de casa-de-vegetação. Neste mesmo trabalho, foi observado que as espécies *S. unispora* e *C. steatolytica* também aumentaram a percentagem de germinação em sementes tratadas com estas leveduras.

Em resultados obtidos por Abo-Elysours e Mohamed (2004), em patossistema envolvendo *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* e tomateiro (*Solanum lycopersicon*), foi evidenciado que o tratamento de plântulas pré-inoculadas com as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida sake* e *Pichia membranifaciens* reduziram em 53; 65,6 e 66,2%, respectivamente, a severidade da murcha-de-fusário em condições de campo. Estudos realizados por El-Tarabily (2003), envolvendo beterraba-açucareira (*Beta vulgaris*) e *Rhizoctonia solani*, foram obtidos resultados satisfatórios quando isolados das espécies de leveduras *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii* foram inoculados em sementes, visando a redução da perda de “stand” ocasionada pelo tombamento de plântulas promovido pelo patógeno. Um relevante relato de sucesso no uso de leveduras no tratamento de sementes foi demonstrado por El-Mehalawy et al. (2004) no controle da murcha tardia (cephalosporiose) do milho (*Zea mays*), uma doença vascular causada pelo fungo habitante do solo *Cephalosporium maydis*, neste estudo, as espécies *Candida glabrata*, *C. maltosa*, *C. slooffii* e *Rhodotorula rubra* promoveram a redução da incidência da doença em mais de 80% em

todos os tratamentos avaliados, como também na redução da severidade da doença, onde os patamares de controle da doença superaram os 90% para todas as espécies de leveduras trabalhadas dentro deste patossistema avaliado.

Apesar do mecanismo de antibiose em *K. ohmeri* ter sido reconhecido e relatado em literaturas, é levantada a hipótese de que o controle da podridão-de-esclerócio obtido pelos cinco isolados desta espécie de leveduras selecionados no presente trabalho, possa também está atribuído a outros fatores, tais como a ação conjunta ou isolada de mecanismos antagônicos, tais como competição, predação, bem como à fatores indiretos, através da indução de mecanismos de resistência nas plantas de feijão caupi oriundas de sementes tratadas por estas leveduras, tornando estas plantas menos predispostas a doença. Os resultados alcançados nas condições do presente trabalho fornecem subsídios promissores ao incremento destes isolados de *K. ohmeri* como ferramenta de controle biológico da podridão-de-esclerócio em feijão caupi, uma vez que o relato de leveduras no manejo de doenças dentro do patossistema envolvendo *S. rolfsii* e feijão caupi é considerado escasso.

Referências

Abo-Elsyousr, K. A. M.; Mohamed, H. M. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by plant growth promoting yeasts and rhizobacteria. 2009. The Plant Pathology Journal 25: 199-204.

Adegbite, A. A.; Amusa, N. A. The major economic field diseases of cowpea in humid agro-ecologies of South-western Nigeria. 2005. African Journal Biotechnology 25: 4706-4712.

Athayde Sobrinho, C.; Viana, F. M. P.; Santos, A. A. 2005. Fungal and bacterial diseases. p. 463-484. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A.; Ribeiro, V. Q, eds. Cowpea: technological advances. Embrapa, Brasília, DF, Brazil (in portuguese).

Barnett, J. A.; Paine, R. W.; Yarrow, D. 2000. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Bedendo, I. P. 2011. Root and collar rot. p. 443-449. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamim Filho, A, eds. Manual of phytopathology. Agronômica Ceres, Piracicaba, SP, Brazil (in Portuguese).

Blum, L. E. B.; Amarante, C. V. T.; Arioli, C. J.; Guimarães, L. S.; Dezanet, A.; Hack Neto, P.; Scheidt, F. R. 2003. Reaction of *Phaseolus vulgaris* genotypes to stem rot and

powdery mildew. *Fitopatologia Brasileira* 1: 96-100 (in Portuguese, with abstract in English).

Botha, A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 1-8.

Coelho, A. R.; Celli, M. G.; Ono, E. Y. S.; Wosiacki, G.; Hoffmann, F. L.; Pagnocca, F. C.; Hirooka, Y. E. 2007. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation *in vitro*. *Brazilian Archives of Biology and technology* 50: 725-733.

Coelho, A. R.; Celli, M. G.; Ono, E. Y. S.; Hoffmann, F. L.; Pagnocca, F. C.; Garcia, S.; Sabino, M.; Harada, K. I.; Wosiacki, G.; Hirooka, E. Y. 2008. Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin Journal* 3: 325-331.

Coelho, A. R.; Tachi, M.; Pagnocca, F. C.; Nobrega, G. M. A.; Hoffmann, F. L.; Harada, K. I.; Hirooka, E. Y. 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives and Contaminants* 26: 73-81.

El Mehalawy, A. A. 2004. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused for *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 6: 310-316.

El Mehalawy, A. A.; Hassaneim, N. M.; Kather, H. M.; El Din, E. A. K.; Youssef, Y. 2004. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth promoter on the biological control of late wilt disease. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 599-604.

El Tarabily, K. A. 2003. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal Applied Microbiology* 96: 69-75.

El Tarabily, K. A.; Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeast as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and plant growth promoters. *Mycoscience* 47: 25-35.

Flores-Moctezuma, H. E.; Montes-Belmont, R.; Jimenez-Perez, A.; Nava-Juarez, R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. *Crop Protection* 25: 195-201.

Fery, R. L.; Dukes, P. D. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: genetic characterization of two sources of resistance. 2011. *International Journal of Agronomy*, 6: 1-6.

Freire Filho, F. R.; Lima, J. A.; Ribeiro, V. Q, eds. 2005. Cowpea: technological advances. Embrapa, Brasília, DF, Brazil (in Portuguese).

Matsumoto, M. N.; Homechin, M.; Massola Júnior, N. S.; Kamikoga, A. T. M. 2000. Effect of substrate in the production of sclerotia and pathogenicity of *Sclerotium rolfsii*. Summa Phytopathologica 1: 91-94 (in Portuguese, with abstract in English).

Mckinney, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. 1923. Journal of Agricultural Research 26: 195-218.

Morandi, M. A. B. 2010. Control phytopathogens in organic agriculture. p.75-100. In: Venzon, M.; Paula Júnior, T. J.; Pallini, A., eds. Alternative control of pests and diseases on organic agriculture.. UFV, Viçosa, MG, Brazil (in Portuguese).

Punja, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. 1985. Annual Review of Phytopathology 23: 97-127.

Remesal, E.; Jordán-Ramírez, R.; Jiménez-Díaz, R.M.; Navas-Cortés, A. 2011. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. Plant Pathology 61: 739-753.

Singh, B. B.; Ehlers, J. D.; Sharma, B.; Freire Filho, F. R. 2002. Recent progress in cowpea breeding. p. 22-40. In: Fatokun, C. A.; Tarawali, S. A.; Singh, B. B.; Kormawa, P. M.; Tamo, M., eds. Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. IITA, Ibadan, Oyo, Nigeria.

Serra, I. M. R. S.; Silva, G. S. 2005. Biological and physiological characterization of *Sclerotium rolfsii* isolates, obtained from green pepper in the State of Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 1: 61-66 (in Portuguese, with abstract in English).

Singh, U.P.; Sarma, B.K., eds. 2009. Biology and control of *Sclerotium rolfsii*: the incitant of collar rot of *Cicer arietinum*. Verlag Dr. Müller, Saarbrücken, SA, Germany.

Valente, P.; Ramos, J. P.; Leoncini, O. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Canadian Journal Microbiology* 45: 949-958.

Tabela 1. Avaliação de isolados de *S.rolfsii* na promoção da severidade da podridão-de-esclerócio calculada pelo Índice da doença (ID) em plantas de feijão caupi utilizando o método de inoculação de Blum et al. (2003).

Isolado	ID (%)	Isolado	ID (%)
CMM-3036	6,2 * <i>a</i>	CMM-2081	31,2 <i>b</i>
CMM-3050	9,5 <i>a</i>	CMM-3064	31,2 <i>b</i>
CMM-3071	11,0 <i>a</i>	CMM-3030	31,2 <i>b</i>
CMM-3032	11,2 <i>a</i>	CMM-3079	31,5 <i>b</i>
CMM-2070	12,7 <i>a</i>	CMM-3056	31,5 <i>b</i>
CMM-3033	14,2 <i>a</i>	CMM-3043	31,5 <i>b</i>
CMM-3068	14,2 <i>a</i>	CMM-3073	32,7 <i>b</i>
CMM-3097	14,5 <i>a</i>	CMM-3038	33,0 <i>b</i>
CMM-3065	15,7 <i>a</i>	CMM-3093	33,2 <i>b</i>
CMM-3092	17,2 <i>a</i>	CMM-3080	34,5 <i>b</i>
CMM-3028	17,2 <i>a</i>	CMM-3047	36,2 <i>b</i>
CMM-3094	19,0 <i>a</i>	CMM-3044	36,2 <i>b</i>
CMM-3060	20,7 <i>a</i>	CMM-3067	39,2 <i>b</i>
CMM-3055	20,7 <i>a</i>	CMM-3086	39,2 <i>b</i>
CMM-3072	22,2 <i>a</i>	CMM-3062	39,2 <i>b</i>
CMM-3089	23,5 <i>b</i>	CMM-3042	39,5 <i>b</i>
CMM-3057	25,0 <i>b</i>	CMM-3046	41,0 <i>b</i>
CMM-3027	28,2 <i>b</i>	CMM-3087	42,2 <i>b</i>
CMM-3096	28,5 <i>b</i>	CMM-3054	42,2 <i>b</i>
CMM-3095	28,5 <i>b</i>	CMM-3041	42,5 <i>b</i>
CMM-3078	29,5 <i>b</i>	CMM-3045	56,5 <i>b</i>
CMM-3048	29,7 <i>b</i>	CMM-3034	65,7 <i>b</i>

CV=29,84%

*Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os valores das médias foram transformados em $\sqrt{x+0.5}$.

Tabela 2. Avaliação de isolados de *S.rolfsii* na promoção da severidade da podridão-de-esclerócio calculada pelo Índice da doença (ID) em plantas de feijão caupi utilizando o método de inoculação de Serra e Silva (2005).

Isolado	ID (%)	Isolado	ID (%)
CMM-3092	7,8* <i>a</i>	CMM-3089	93,8 <i>g</i>
CMM-3097	14,1 <i>a</i>	CMM-3095	96,9 <i>g</i>
CMM-3030	26,6 <i>b</i>	CMM-3046	96,9 <i>g</i>
CMM-3036	26,6 <i>b</i>	CMM-3056	96,9 <i>g</i>
CMM-3079	28,2 <i>b</i>	CMM-3068	98,4 <i>g</i>
CMM-3073	31,3 <i>b</i>	CMM-3047	98,4 <i>g</i>
CMM-3060	32,8 <i>b</i>	CMM-3087	100 <i>g</i>
CMM-2070	34,4 <i>b</i>	CMM-3041	100 <i>g</i>
CMM-3054	34,4 <i>b</i>	CMM-3038	100 <i>g</i>
CMM-3055	30,9 <i>b</i>	CMM-3096	100 <i>g</i>
CMM-3062	40,6 <i>c</i>	CMM-2081	100 <i>g</i>
CMM-3057	42,2 <i>c</i>	CMM-3032	100 <i>g</i>
CMM-3033	48,4 <i>c</i>	CMM-3048	100 <i>g</i>
CMM-3027	60,9 <i>d</i>	CMM-3094	100 <i>g</i>
CMM-3071	68,7 <i>e</i>	CMM-3067	100 <i>g</i>
CMM-3043	70,3 <i>e</i>	CMM-3050	100 <i>g</i>
CMM-3028	79,7 <i>f</i>	CMM-3064	100 <i>g</i>
CMM-3080	81,3 <i>f</i>	CMM-3065	100 <i>g</i>
CMM-3072	89,1 <i>g</i>	CMM-3044	100 <i>g</i>
CMM-3042	92,2 <i>g</i>	CMM-3086	100 <i>g</i>
CMM-3078	93,7 <i>g</i>	CMM-3034	100 <i>g</i>
CMM-3093	93,8 <i>g</i>	CMM-3045	100 <i>g</i>

CV=8,52%

*Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Avaliação do controle biológico da podridão-de-esclerócio ocasionada por *S. rolfsii* (CMM-3034) calculada pelo índice da doença (ID) e redução do índice de doença (RID) em plantas de feijão caupi originadas de sementes tratadas suspensão de leveduras (ensaio I).

Isolado	ID / RID (%)		Isolado	ID / RID (%)		Isolado	ID / RID (%)	
L-F	34,3 / 65,7*	a	L-BDAM	90,6 / 9,4	c	L-LIT	95,3 / 4,7	c
L-69	45,3 / 54,7	a	L-78	90,6 / 9,4	c	L-P	95,3 / 4,7	c
L-5	48,4 / 51,6	a	L-CE1	90,6 / 9,4	c	L-67	96,8 / 3,2	c
L-1	56,2 / 43,8	b	L-AD	90,6 / 9,4	c	L-11A2	96,8 / 3,2	c
L-SAJD	62,5 / 37,5	b	L-79	90,6 / 9,4	c	L-71	96,8 / 3,2	c
L-E	67,1 / 32,9	b	L-CA1V	90,6 / 9,4	c	L-70	96,8 / 3,2	c
L-N	71,8 / 28,2	b	L-G20B	90,6 / 9,4	c	L-L	98,4 / 1,6	c
L-014	76,5 / 23,5	c	L-013	90,6 / 9,4	c	L-65	98,4 / 1,6	c
L-09	81,2 / 18,8	c	L-64	90,6 / 9,4	c	L-72	98,4 / 1,6	c
L-C	81,2 / 18,8	c	L-G20V	90,6 / 9,4	c	L-GA22	98,4 / 1,6	c
L-54	81,2 / 18,8	c	L-B4B	93,7 / 6,3	c	L-W	98,4 / 1,6	c
L-77	81,2 / 18,8	c	L-003	93,7 / 6,3	c	L-60	98,4 / 1,6	c
L-61	82,3 / 17,7	c	L-AP	93,7 / 6,3	c	L-007	98,4 / 1,6	c
L-U	84,3 / 15,7	c	L-CA1A2	93,7 / 6,3	c	L-76	98,4 / 1,6	c
L-BA	85,8 / 14,2	c	L-B2	93,7 / 6,3	c	L-75	98,4 / 1,6	c
L-CA2B	85,8 / 14,2	c	L-006	93,7 / 6,3	c	L-59	98,4 / 1,6	c
L-11A1	85,8 / 14,2	c	L-G	95,3 / 4,7	c	Testemunha	98,4 / 1,6	c
L-AQ	85,8 / 14,2	c	L-66	95,3 / 4,7	c	L-Z	100 / 0,0	c
L-74	85,8 / 14,2	c	L-W1	95,3 / 4,7	c	L-BB	100 / 0,0	c
L-73	88,2 / 11,8	c	L-X	95,3 / 4,7	c	L-CAV	100 / 0,0	c
L-I	90,6 / 9,4	c	L-O	95,3 / 4,7	c	L-R	100 / 0,0	c
L-BC	90,6 / 9,4	c	L-AM	95,3 / 4,7	c	L-CA1B	100 / 0,0	c
L-ID	90,6 / 9,4	c	L-AR	95,3 / 4,7	c	L-AC	100 / 0,0	c
L-B7	90,6 / 9,4	c	L-GA23	95,3 / 4,7	c	L-08	100 / 0,0	c
L-B3	90,6 / 9,4	c	L-G21	95,3 / 4,7	c	L-2D	100 / 0,0	c

CV=15,23%

*Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Avaliação do controle biológico da podridão-de-esclerócio ocasionada por *S. rolfsii* (CMM-3034) calculada pelo índice da doença (ID) e redução do índice de doença (RID) em plantas de feijão caupi originadas de sementes tratadas suspensão de leveduras (ensaioII).

Isolado	ID / RID (%)		Isolado	ID / RID (%)		Isolado	ID / RID (%)	
L-SJAD	65,6 / 34,4*	<i>a</i>	L-CAV	90,6 / 9,4	<i>c</i>	L-007	98,4 / 1,6	<i>c</i>
L-F	65,6 / 34,4	<i>a</i>	L-P	90,6 / 9,4	<i>c</i>	L-W	98,4 / 1,6	<i>c</i>
L-N	67,1 / 32,9	<i>a</i>	L-G21	90,6 / 9,4	<i>c</i>	L-71	100 / 0,0	<i>c</i>
L-C	68,7 / 31,3	<i>a</i>	L-X	90,6 / 9,4	<i>c</i>	L-67	100 / 0,0	<i>c</i>
L-61	70,3 / 29,7	<i>a</i>	L-54	92,1 / 7,9	<i>c</i>	L-75	100 / 0,0	<i>c</i>
L-003	70,3 / 29,7	<i>a</i>	L-CA1A2	92,1 / 7,9	<i>c</i>	L-76	100 / 0,0	<i>c</i>
L-U	70,3 / 29,7	<i>a</i>	L-AQ	93,7 / 6,3	<i>c</i>	L-CE1	100 / 0,0	<i>c</i>
L-G20B	70,3 / 29,7	<i>a</i>	L-1D	93,7 / 6,3	<i>c</i>	L-66	100 / 0,0	<i>c</i>
L-BA	71,8 / 28,2	<i>a</i>	L-B4B	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-72	100 / 0,0	<i>c</i>
L-1	71,8 / 28,2	<i>a</i>	L-2D	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-73	100 / 0,0	<i>c</i>
L-5	75,0 / 25,0	<i>a</i>	L-AR	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-65	100 / 0,0	<i>c</i>
L-BB	76,5 / 23,5	<i>b</i>	L-B7	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-I	100 / 0,0	<i>c</i>
L-E	79,6 / 20,4	<i>b</i>	L-G	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-AM	100 / 0,0	<i>c</i>
L-013	81,2 / 18,8	<i>b</i>	L-AD	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-CA1B	100 / 0,0	<i>c</i>
L-64	81,2 / 18,8	<i>b</i>	L-LIT	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-GA23	100 / 0,0	<i>c</i>
L-W1	81,2 / 18,8	<i>b</i>	L-78	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-R	100 / 0,0	<i>c</i>
L-014	82,8 / 17,2	<i>b</i>	L-11A2	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-11A1	100 / 0,0	<i>c</i>
L-08	84,3 / 15,7	<i>b</i>	L-09	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-B2	100 / 0,0	<i>c</i>
L-69	84,3 / 15,7	<i>b</i>	L-O	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-59	100 / 0,0	<i>c</i>
L-006	85,9 / 14,1	<i>b</i>	L-Z	95,3 / 4,7	<i>c</i>	L-60	100 / 0,0	<i>c</i>
L-BC	85,9 / 14,1	<i>b</i>	L-G20V	96,8 / 3,2	<i>c</i>	L-B3	100 / 0,0	<i>c</i>
L-L	85,9 / 14,1	<i>b</i>	L-79	96,8 / 3,2	<i>c</i>	L-AP	100 / 0,0	<i>c</i>
L-CA1V	85,9 / 14,1	<i>b</i>	Testemunha	96,8 / 3,2	<i>c</i>	L-AC	100 / 0,0	<i>c</i>
L-CA2B	85,9 / 14,1	<i>b</i>	L-70	98,4 / 1,6	<i>c</i>	L-BDAM	100 / 0,0	<i>c</i>
L-77	87,5 / 12,5	<i>c</i>	L-74	98,4 / 1,6	<i>c</i>	L-GA22	100 / 0,0	<i>c</i>

CV=12,60%

*Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Avaliação da podridão-de-esclerócio em plantas de feijão (CMM-3034) em condições de casa-de-vegetação calculada pelo índice de doença (ID) utilizando diferentes concentrações de leveduras no tratamento de sementes.

Isolado	Índice da Doença (%)				R ² (%)
	Concentração (UFC/mL)				
	10 ¹	10 ³	10 ⁵	10 ⁷	
L-1	97*	98,5	81,5	62,8	84,0**
L-5	97	95,5	81,5	73,5	92,8
L-F	98,5	94	83	69	95,5
L-N	100	100	75,0	72,0	84,0
L-SJAD	98,5	97	65,8	64,5	83,2

*Média do Índice da Doença

**Coeficiente de determinação da reta

Tabela 6. Avaliação do controle biológico da podridão-de-esclerócio ocasionada por isolados de *S. rolfsii* (CMM-3034, CMM-3042 e CMM-3071) calculada pelo índice da doença (ID) e redução do índice de doença (RID) em plantas de feijão caupi originadas de sementes tratadas suspensão de leveduras.

Levedura	ID/RID (%)					
	CMM-3034		CMM-3042		CMM-3071	
L-1	76,5/23,5*	<i>b</i>	68,7/31,3	<i>b</i>	48,4/51,6	<i>bc</i>
L-5	79,6/21,4	<i>b</i>	67,1/32,9	<i>b</i>	40,6/59,4	<i>c</i>
L-F	76,5/23,5	<i>b</i>	70,3/29,7	<i>b</i>	48,4/51,6	<i>bc</i>
L-N	84,3/15,7	<i>ab</i>	65,6/34,4	<i>b</i>	50,0/50,0	<i>b</i>
L-SJAD	59,3/51,7	<i>c</i>	62,5/37,5	<i>b</i>	48,4/51,6	<i>bc</i>
Testemunha	98,4/1,6	<i>a</i>	100/0	<i>a</i>	59,3/40,7	<i>a</i>
CV	12,48%		17,56%		12,79%	

*Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD à 5% de probabilidade

Tabela 7. Isolados de leveduras selecionados para o controle da podridão-de-esclerócio e suas respectivas mesorregiões de coleta e tecidos isolados em plantas de feijão caupi.

Isolado	Espécie identificada	Local de coleta (mesorregião)	Tecido isolado
L-1	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Agreste	Colo
L-5	<i>K. ohmeri</i>	Zona da Mata	Folha
L-F	<i>K. ohmeri</i>	Zona da Mata	Folha
L-N	<i>K. ohmeri</i>	Zona da Mata	Caule
L-SJAD	<i>K. ohmeri</i>	Agreste	Colo

Mecanismos antagônicos de *Kodamaea ohmeri* a *Sclerotium rolfsii* e efeito na promoção do crescimento em plantas de feijão caupi

**MECANISMOS ANTAGÔNICOS DE *Kodamaea ohmeri* A *Sclerotium rolfsii* E
EFEITO NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM PLANTAS DE FEIJÃO
CAUPI**

**Leonardo Tavares de Souza¹, Rejane Pereira Neves², Rejane Rodrigues da Costa e
Carvalho¹, Adriana Pereira Melo¹, Melyna Chaves Leite², Reginaldo Gonçalves de
Lima Neto², Delson Laranjeira¹**

1 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP2171-900, Brasil.

²Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901, Brasil.

Palavras-chave: antagonismo, leveduras, podridão-de-esclerócio, *Vigna unguiculata*.

Leveduras antagonicas a *Sclerotium rolfsii*

Ciências Agrárias

Autor para correspondência: Delson Laranjeira. Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Laboratório de Fungos do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 2171-900, Brasil. (81) 3320.6205. delson@depa.ufrpe.br

**ANTAGONISTIC MECHANISMS OF *Kodamaea ohmeri* IN *Sclerotium rolfsii*
AND EFFECT IN GROWTH PROMOTION FROM COWPEA PLANTS.**

ABSTRACT

A total five strains the *Kodamea ohmeri* yeast specie was tested for antagonism of phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii*. Experiments assays *in vitro* were performed to evaluate the activity of *killer* yeasts, inhibition of isolates of *S. rolfsii* and expression of lectins in isolated from *K. ohmeri* and *S. rolfsii*, as well as control southern blight and promote growth in cowpea plants (*Vigna unguiculata*) in green house conditions. In the results, we observed the presence of killer activity for all isolates of *K. ohmeri* tested. The incorporation of the filtered yeast culture medium for growth of isolates of *S. rolfsii* *in vitro* conditions showed an inhibitory effect of pathogen mycelial growth for the majority of treatments with yeast. On pairing of colonies were demonstrated a antagonistic effect low for most isolates of yeast tested on *S. rolfsii*. In green house tests, all yeasts isolates were efficiently on control the severity of southern blight in cowpea plants, when applied as a suspension on the pathogen inoculated. All isolates of *K. ohmeri* applied on seed treatments, significantly promoted the gain of aerial plant biomass on cowpea plants, and these varied results were when at evaluating production of root biomass. The present results demonstrated the potential from use of strains species *K. ohmeri* in biological control of diseases caused by *S. rolfsii*, as well as the improvement on agronomic aspects in the cultivation of cowpea.

Keywords: antagonism; yeasts; Southern blight; *Vigna unguiculata*.

INTRODUÇÃO

A espécie *Sclerotium rolfsii* Sacc. é um fungo habitante do solo de grande importância agrícola, causando doenças como as podridões do colo e raízes em uma grande diversidade de plantas cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Singh e Sarma, 2009). Na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), a podridão-de-esclerócio causada por *S. rolfsii*, pode ocasionar a mortandade de plantas no campo de 1 a 5% em áreas infestadas (Adegbite e Amusa, 2005), como também reduzir em mais de 50% a produção de grãos em plantas acometidas por esta doença (Fery e Dukes, 2011).

Devido à sua alta capacidade saprofítica, agressividade e persistência em solos infestados, principalmente através de suas estruturas de resistência denominadas esclerócios (Bedendo, 2011), o manejo de doenças, causadas por esta espécie fúngica em cultivos agrícolas, são por meio de medidas usualmente utilizadas que envolvem a rotação de culturas, controle genético e químico, sendo estas muitas vezes impraticáveis no ponto de vista econômico e ambiental (Singh e Sarma, 2009).

O resgate dos princípios e mecanismos que operam em processos biológicos naturais comumente observados na natureza, podem auxiliar na obtenção de sistemas agrícolas mais sustentáveis que visem à proteção de plantas, por exemplo, no controle de diversos fitopatógenos veiculados pelo solo (Morandi, 2010).

Nessa visão, o termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais destas espécies fitopatogênicas, podendo estes antagonistas se adaptar ecologicamente ao mesmo nicho que os ocupados por estes fitopatógenos (Morandi, 2010). Entre os microrganismos antagonísticos utilizados no controle de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, pouca atenção tem

sido dada às leveduras, em comparação à utilização de fungos filamentosos e bactérias (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Contudo, a demonstração de que certas espécies de leveduras apresentam um bom potencial antagônico a uma diversidade de patógenos fúngicos que causam doenças de parte aérea de plantas, bem como em pós-colheita, levam a hipótese de que os mesmos mecanismos de antagonismo sobre estes fitopatógenos, também possam atuar de forma similar no controle de doenças em outras partes da planta, tais como as doenças radiculares de origem fúngica (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006; Botha, 2011).

Os mecanismos de antagonismo apresentados por leveduras são antibiose (amensalismo) através da produção de enzimas, a exemplo das β -1,3 glucanases e quitinases que afetam a parede celular de outros fungos (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006); produção de toxinas “*killer*” (Golubev, 2006); e produção de metabólitos voláteis e ácidos que afetam o desenvolvimento de fungos através da ação fungicida ou fungistática (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Em algumas espécies de leveduras, são observados ainda outros mecanismos de antagonismo incluindo a indução e ativação de mecanismos de resistência em plantas hospedeiras, a competição com fitopatógenos por espaço e nutrientes, e a predação (micoparasitismo) (Botha, 2011). Neste último caso mencionado, são mencionadas a expressão de lectinas (proteínas ou glicoproteínas) que se ligam a açúcares do patógeno alvo no processo de reconhecimento e predação por leveduras antagonistas (Schiler et al, 2011).

Além dos mecanismos de antagonismo mencionados, algumas leveduras também podem atuar na promoção do crescimento de plantas, através do efeito sinérgico com alguns microrganismos simbiotes (Boby et al, 2008), bem como no aumento da capacidade fotossintética e na produção de reguladores de crescimento nestes vegetais (Botha, 2011).

Dentre as leveduras estudadas no controle biológico de doenças de plantas, a espécie *Kodamaea ohmeri*, demonstrou grande potencial de controle biológico dentro da patologia pós-colheita. Como exemplo, tem-se a utilização de *K. ohmeri* no controle de *Penicillium expansum*, considerado como um fungo de grande importância em pós-colheita (Coelho et al, 2007). Contudo, relatos do potencial da espécie *K. ohmeri* envolvendo efeitos benéficos em plantas de feijão caupi, bem como na ação de mecanismos antagônicos promovidos por esta espécie de levedura, atuando no controle biológico *in vitro* de *S. rolfsii* e no manejo de doenças em plantas de feijão caupi não foram relatadas. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar mecanismos antagônicos de isolados de *K. ohmeri* sobre *S. rolfsii*, assim como a promoção de crescimento em plantas de feijão caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos presentes ensaios experimentais, foi utilizado um total de cinco isolados de leveduras (L-F, L-5, L-1, L-N e L-SJAD), identificados como pertencentes a espécie *K. ohmeri* por meio de taxonomia clássica (Barnett et al, 2000) e molecular pelas regiões genômicas ITS1/ITS4 (Valente et al, 1999). Os isolados de *S. rolfsii* (CMM-3034, CMM-3071 e CMM-3079) utilizados nos ensaios experimentais foram concedidos pela Coleção de Culturas Fúngicas - “Professora Maria Menezes”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Atividade *killer* de leveduras

Para a caracterização quanto à atividade *killer* dos isolados de *K. ohmeri*, foram utilizados dois isolados padrões de sensibilidade, sendo estes representados pelos isolados NCYC 1006 (*Saccharomyces cerevisiae*) e NCYC Y-55 (*Candida glabrata*), ambos concedidos pelo Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco.

Os isolados foram ativados a uma temperatura de 25°C por 24 horas em placas de Petri contendo meio de cultura YEPD (10g de extrato de levedura, 20g de peptona, 20g de glucose, 20g de ágar, 1000mL de água destilada) suplementado com azul de metileno (0,003%), utilizando tampão citrato-fosfato (100 mM) para ajuste do pH à 4,2. Após esta etapa, foi preparada uma alíquota de suspensão (4×10^5 células/mL) destas leveduras em solução salina (NaCl 0,85%; m/v) e posteriormente espalhadas com auxílio de um “swab” esterilizado sobre placas contendo meio YEPD adicionado de azul de metileno. Em seguida, as placas foram mantidas em período de incubação por 24 horas a 25°C.

Os cinco isolados de leveduras testados quanto à atividade *killer* foram ativados em meio YEPD adicionado de azul metileno conforme a metodologia empregada anteriormente na ativação das leveduras padrões de sensibilidade. Das colônias formadas nestas placas, foram retiradas amostras, sendo estas plaqueadas em pontos separados sobre a superfície de placas de Petri contendo leveduras padrões de sensibilidade crescidas sobre meio YEPD. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25°C por 72 horas. Na verificação da estabilidade da atividade *killer* dos isolados testados, utilizou-se diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40°C) com período de incubação de placas por 72 horas, bem como a avaliação em diferentes valores de pH (3,5; 4,2; 4,5; e 5,0) do meio de cultivo em placas incubadas a 25°C por 72 horas. As testemunhas consistiram de pontos de plaqueamento individuais com os isolados NCYC

1006 (*S. cerevisiae*) e NCYC Y-55 (*C. glabrata*), sem a presença de outros isolados de leveduras. A confirmação da atividade *killer* pelos isolados testados sobre as cepas padrões (sensíveis) foi caracterizada pela presença/ausência de um halo de inibição ao redor dos pontos plaqueados. Para confirmação da atividade *killer*, todos os testes mencionados foram realizados em triplicata.

Inibição do crescimento micelial por filtrados de leveduras

Os isolados de leveduras foram testados quanto à ação de compostos antifúngicos através do uso de filtrados atuando no crescimento micelial de diferentes isolados de *S. rolfssii*, conforme a metodologia de El-Mehalawy (2004) adaptada. Em erlenmeyers contendo 250 mL de meio Sabourad (peptona 10g; dextrose 40g; água destilada esterilizada 1000mL) com adição de extrato de levedura (1,5g/L), foi introduzido 100µL (suspensão de 10^7 células /mL) de levedura e então incubados a $28\pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas (luz/escuro). Transcorrido o período proposto, o meio de cultura contendo leveduras foi submetido à filtração através da utilização de filtros Millipore® (0,45µm) e o conteúdo colocado em recipientes previamente esterilizados.

Os filtrados de leveduras foram vertidos e homogeneizados em meio BDA modificado (batata 200g; dextrose 20g; ágar 34g; água destilada 1000 mL) encontrados ainda em forma líquida, a uma temperatura de 36°C . A proporção de filtrado adicionado ao meio BDA foi de 1:1 (v/v). O conteúdo foi homogeneizado e vertido em seguida para placas de Petri (90mm de diâmetro). Após a solidificação do meio, foi depositado um disco de micélio de 4mm retirado de colônias de *S. rolfssii* com 7 dias de crescimento a 28°C em fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro). As placas foram acondicionadas em incubadora tipo B.O.D conforme condições mencionadas para o crescimento de

colônias de *S. rolfsii*. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos (filtrados de leveduras + testemunha) testados para cada um dos três isolados (CMM-3034, CMM-3071 e CMM-3079) do patógeno. A testemunha consistiu de placas contendo meio de cultura BDA adicionado em 1:1 (v/v) com meio Sabourad sem a presença de filtrado de levedura. Cada tratamento foi representado por cinco repetições (placas).

A avaliação dos tratamentos foi realizada através medição do diâmetro médio final das colônias (DMFC) obtido através da média do cálculo da medição do diâmetro micelial nos dois sentidos diametralmente opostos, onde: $[(\text{Comprimento A})/2 + (\text{Comprimento B})/2]$. As medições foram encerradas assim que a primeira repetição (placa), dentro de cada isolado de *S. rolfsii*, apresentou preenchimento completo na superfície do meio de cultivo.

Inibição do crescimento micelial por pareamento de colônias

As leveduras foram inicialmente cultivadas (48 horas; 28°C; fotoperíodo de 12 horas) em placas de Petri contendo meio de cultivo Sabourad, adicionado de extrato de levedura (1,5g/L). A partir das colônias formadas, foram feitas suspensões destas leveduras, ajustando-se as suas concentrações para 1×10^7 células/mL. Bordas de funis de vidro com 80mm de diâmetro, esterilizados, foram imersos nas suspensões de leveduras e tocadas no meio BDA de cada placa de Petri (90mm). No centro das placas, foi depositado um disco de micélio (4mm) do patógeno. Como testemunhas, foram utilizadas placas de Petri contendo disco de micélio de cada isolado do patógeno avaliado, sem a presença de leveduras. O acondicionamento das placas, bem como a metodologia de avaliação, seguiram os procedimentos aplicados nos testes de inibição

do crescimento micelial por filtrados de leveduras. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos (isolados de leveduras + testemunha) para cada um dos isolados (CMM-3034, CMM-3071 e CMM-3079) de *S. rolfsii*. Cada tratamento foi representado por cinco repetições (placas). Os ensaios mencionados foram repetidos por duas vezes em mesmas condições experimentais.

Teste de aglutinação com lectinas

As lectinas foram selecionadas para garantir a marcação de uma ampla variedade de açúcares específicos. As lectinas usadas foram Concanavalin A (Con A), Wheat-germ agglutinin (WGA), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA I) e peanut agglutinin (PNA), todas conjugadas a peroxidase (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), a concentração de 25 µg/mL em tampão fosfato salino (PBS) (0,01M; pH 7,2-7,4) estocado a -20°C em “Eppendorf”.

A marcação com lectinas na superfície de leveduras foi desenvolvida de acordo com Lima Neto et al. (2011). As colônias de leveduras cresceram em ágar Sabouraud (Difco) por 48h e foram suspensas em tampão PBS (0,01M; pH 7,2), ajustando a concentração para 10^7 células/mL. Em seguida, a suspensão foi tratada com tripsina a 1% em PBS por 3min, seguida por solução metanol-H₂O₂ por 5 minutos a 25±2°C e incubada com as lectinas (25 µg/mL) conjugadas a peroxidase por 1hora a 25±2°C. Para a percepção da aglutinação de lectinas foi adicionado às células um conjugado de 3,3-diaminobendizina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS por 5-8minutos a 25±2°C. Entre cada passo no protocolo, as células foram lavadas com PBS sob centrifugação (2.000 rpm/10 minutos) até a formação do “pellet”.

Para os isolados de *S. rolfsii* foi utilizado a metodologia de Leal et al. (2011), adaptada para fungos filamentosos. Com o auxílio de fita adesiva transparente, foram retirados fragmentos de hifas dos isolados de *S. rolfsii* crescidas em meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) por 72 horas. As fitas adesivas com hifas do fungo foram fixadas em lâminas de microscopia. Após esta etapa, foi aplicada entre a lâmina e a fita adesiva, uma solução contendo lectina (50µg/mL). Posteriormente, as lâminas contendo as hifas do patógeno adicionadas com lectinas foram incubadas à temperatura de 4°C por 1 hora. Para visualização da aglutinação de lectinas as hifas do fungo, foram aplicadas soluções de 3,3-diaminobendizina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) logo após o período de incubação proposto. Entre cada etapa, as hifas foram lavadas com solução PBS por 2 vezes.

Ensaio controles foram feitos por ligação da lectina na presença do açúcar específico correspondente: metil- α -D-manosídeo, N-acetil-D-glicosamina, α -L-fucose and D-galactose para Con A, WGA, UEA I e PNA, respectivamente, a concentração de 300 mM. Padrão de marcação foi avaliado por microscopia de luz e classificado qualitativamente como intenso (+++), moderado (++) , fraco (+) ou negativo (-), conforme Ozer (2000). Os ensaios foram realizados em triplicata para todos os isolados mencionados.

Controle da podridão-de-esclerócio

Na verificação da atuação do antagonismo de leveduras no controle da podridão-de-esclerócio em plantas de feijão caupi, foi utilizado o isolado de *S. rolfsii* CMM-3034, sendo este selecionado em pré-testes como padrão de patogenicidade na severidade da doença. Na produção de inóculo do referido isolado, foi utilizada a metodologia de

Serra e Silva (2005), adaptada, onde grãos de arroz autoclavados foram depositados sobre colônias do patógeno com 7 dias de crescimento em placas de Petri (90 mm) contendo meio BDA, à temperatura de 28°C e fotoperíodo alternado de 12 horas (luz/escuro). Após um período de 7 dias de incubação, na mesma circunstância de crescimento das colônias fúngicas.

Os grãos de arroz colonizados pelo fungo foram depositados na proporção de 0,25 g por cova de plantio feita em vasos de 1,3L (volume) preenchidos com solo (textura franco-arenosa; pH= 5,73; P= 2mg/dm³; Na= 2,4 cmol_c/dm³; K⁺= 0,73 cmol_c/dm³; Ca⁺²+Mg⁺²= 1,6cmol_c/dm³; Ca⁺²=0,9 cmol_c/dm³; Al⁺³=0,8 cmol_c/dm³; H + Al = 5,68cmol_c/dm³; C.O=2,31g/kg; M.O= 3,97g/kg) autoclavado (120°C; 1atm; 1hora; 2 dias consecutivos). Transcorridas 48 horas após a infestação das covas de plantio, foi realizada a aplicação de 1mL/cova de suspensões (10⁷ UFC/mL) de isolados de leveduras. Em seguida, foi realizada a semeadura com sementes superficialmente desinfestadas de feijão caupi (cultivar IPA-206) nas covas.

Os vasos contendo os tratamentos foram acondicionados sobre bancadas em casa de vegetação, por um período de avaliação de 14 dias. Após o período proposto, foi realizada a avaliação da severidade da doença para todos os isolados de *S. rolfsii*, nas condições experimentais estabelecidas. Para a avaliação da severidade da doença foi utilizada a escala de notas proposta por Blum et al (2003), adaptada, onde: 0=planta sadia; 1=planta com podridão no colo; 2= planta murcha; 3=planta morta; 4= planta não germinada ou com tombamento em pré emergência. Com as notas obtidas nas avaliações, foi calculado o Índice da Doença (ID) (Mckinney, 1923). Os valores de ID foram posteriormente transformados em percentuais de severidade da doença, onde: ID= [(número de plantas com nota 0 x 0) + (número de plantas com nota 1 x 1) + (número de plantas com nota 2 x 2) + (número de plantas com nota 3 x 3) + (número de

plantas com nota 4 x 4) x 100 / [(total de sementes plantadas por vaso) x (grau máximo da escala de notas)].

Os ensaios experimentais foram repetidos por duas vezes em casa-de-vegetação, em temperatura ambiente variando entre 25,5-36°C e 25-37,5°C, com umidade relativa do ar (UR) em valores de 60-65% e 61-66%, para o primeiro e segundo ensaio experimental, respectivamente.

Promoção de crescimento de plantas

No presente teste foram utilizadas sementes de feijão caupi (cultivar IPA-206) com 99,09% de germinação. As sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de NaOCl (0,5%) por 10 minutos e posteriormente lavadas por 3 vezes em água-destillada-esterilizada (ADE). Após a etapa de desinfestação, as sementes foram introduzidas em frascos de plástico contendo suspensões de leveduras (10^7 UFC/mL) por um período de 10 minutos. Em seguida, as sementes tratadas foram mantidas em temperatura ambiente de 28° C por um período de 12 horas. Após o período estabelecido, foi realizada a semeadura em condições de casa-de-vegetação iguais a encontradas nos testes anteriores de controle da podridão-de-esclerócio. O presente teste foi repetido em dois ensaios experimentais distintos.

Transcorridos o período de 14 dias de permanência em casa-de-vegetação, as plantas foram removidas dos vasos e lavadas em água corrente para retirada de fragmentos aderidos as mesmas. Posteriormente, realizou-se a separação da parte aérea e da raiz das plantas, com conseguinte pesagem em balança analítica para obtenção da biomassa fresca de parte aérea (BFPA) e biomassa fresca de raiz (BFR). As partes pesadas de cada planta foram colocadas individualmente no interior de sacos de papel e

aconditionadas em estufa de secagem a 45°C por um período de cinco dias. Após a secagem em estufa, as partes vegetais foram novamente pesadas para obtenção de biomassa seca de parte aérea (BSPA) e biomassa seca de raiz (BSR).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos (isolados de leveduras + testemunha), quatro repetições (vasos), sendo cada repetição representada por quatro unidades amostrais (plantas).

Análises estatísticas

Os dados obtidos nos ensaios experimentais repetidos foram submetidos conjuntamente à análise de variância (ANOVA). Para a comparação dos tratamentos, foi aplicado o teste de média LSD ($P=0,05$), com o auxílio do programa computacional “Sisvar” (Ferreira, 2000).

RESULTADOS

Atividade *killer* de leveduras

Na caracterização da atividade *killer*, em todas as avaliações, os isolados de *K. ohmeri* (L-5 L-1, L-N e L-SJAD e L-F) apresentaram halos de inibição nos pontos de plaqueamento com o isolado de *C. glabrata* (NCYC Y-55), bem como também na presença de *S. cerevisiae* (NCYC 1006) em meio de cultivo com pH 4,2 com incubação a 25°C por 72 horas. A estabilidade da atividade *killer* foi confirmada em diferentes temperaturas e valores de pH do meio de cultivo após 72 horas de incubação

dos isolados, onde foi observada a presença do halo de inibição das leveduras padrões de sensibilidade em todos os pontos de plaqueamento.

Inibição do crescimento micelial por filtrados de leveduras

Entre os tratamentos com filtrados de leveduras na inibição do crescimento micelial de diferentes isolados de *S. rolfsii* (CMM-3034, CMM-3071 e CMM-3079), somente os isolados L-F e L-SJAD não apresentaram estatisticamente a redução do DMC, nos isolados CMM-3034 e CMM-3071, respectivamente, em relação as suas referentes testemunhas. Os demais tratamentos com filtrados de leveduras promoveram estatisticamente a inibição do crescimento micelial dos três isolados de *S. rolfsii* utilizados no ensaio experimental (Tabela 1).

Inibição do crescimento micelial por pareamento de colônias

Dentre os isolados de *K. ohmeri*, somente o isolado L-N foi capaz de causar a inibição do crescimento micelial de isolados de *S. rolfsii*. O efeito inibitório promovido pelo isolado de levedura L-N foi observado somente nos pareamentos envolvendo os isolados de *S. rolfsii* CMM-3034 e CMM-3071. Foi verificado que os valores do DMC dos isolados CMM-3034 e CMM-3071 em pareamento com a levedura L-N foram de 76,35 e 46,75mm, enquanto as testemunhas obtiveram valores de DMC de 85,11 e 89,75mm, respectivamente, para os dois isolados do patógeno. Contudo, nenhum isolado de levedura testado obteve eficiência na diminuição do DMC quando pareado com o isolado CMM-3079. (Tabela 2).

Teste com aglutinação de lectinas

Nos testes envolvendo lectinas para os isolados de *S. rolfsii*, foi verificada somente a aglutinação com a lectina WGA (Wheat-germ agglutinin). Contudo, apesar de presente no patógeno, esta lectina foi fracamente expressa nesta referida espécie.

Uma maior distinção na aglutinação das quatro lectinas testadas foi observada nos isolados de leveduras. Apesar da lectina WGA ter sido expressada em todos os isolados de leveduras, esta expressão foi considerada fraca para a maioria dos isolados, sendo o isolado L-N o único apresentado com expressão moderada a esta lectina. A coloração de células de leveduras de forma intensa dentro da escala proposta foi representada pelos isolados L-N e L-5, para as lectinas ConA e PNA, respectivamente, bem como na intensidade da coloração em relação a lectina PNA, onde foi notada uma intensa expressão desta lectina no isolado L-5 e de modo fraco no isolado L-F (Tabela 3).

Controle da podridão-de-esclerócio

Todos os isolados de leveduras promoveram estatisticamente o controle da podridão-de-esclerócio quando aplicados previamente em forma de suspensão em covas infestadas com o inóculo do patógeno. Os valores médios da severidade da doença no ensaio experimental expressaram um índice da doença (ID) entre 17,19 a 34,38% nos tratamentos com leveduras, enquanto a testemunha apresentou um valor de ID de 79,9%. (Tabela 4).

Promoção de crescimento de plantas

Nos resultados obtidos nos testes de promoção de crescimento de plantas, todos os isolados de *K. ohmeri* foram eficientes no rendimento de BFPA e BSPA em relação a testemunha. Contudo, quando avaliada a produção de BFR, somente o isolado L-N obteve resultados superiores aos demais tratamentos. Na avaliação da BSR, três isolados (L-5, L-N e L-SJAD) obtiveram estatisticamente valores mais elevados em relação a testemunha, bem como outros isolados de *K. ohmeri* testados.

Apesar do incremento variado da biomassa de parte aérea e raiz nas plantas oriundas de sementes tratadas com leveduras, em todos os tratamentos avaliados, não foi detectado efeito deletério das leveduras sobre as plantas em nenhum dos tratamentos. Pelos resultados apresentados, considera-se que o isolado L-N foi capaz de se manter estável na promoção de crescimento das plantas em relação a produção de biomassa da parte aérea e raiz em todas as variáveis analisadas (Tabela 5).

DISCUSSÃO

Entre os mecanismos antagônicos comumente encontrados em leveduras sobre fitopatógenos fúngicos, a atividade *killer* é considerada um dos importantes componentes dentro da antibiose (amensalismo), onde por meio de secreções de toxinas extracelulares, de composição proteica e/ou glicoproteicas, liberadas por estas leveduras, são ocasionados efeitos deletérios de ação fungicida ou fungistática sobre uma ampla gama de fitopatógenos (Botha 2011). Esta atividade, é considerada um fenômeno encontrado em diferentes espécies e isolados de leveduras oriundos de diversificados habitats (Buzzini e Martini 2000). Na presente condição, a presença desta atividade *killer* em todos os isolados de *K. ohmeri* avaliados, auxilia na compreensão da

ação antagônica das leveduras testadas sobre os isolados de *S. rolfsii* utilizados nos testes de controle biológico.

A decorrência da produção de toxinas na atividade *killer* foi bem elucidada através dos testes com filtrados de leveduras na inibição do crescimento micelial de diferentes isolados de *S. rolfsii*, onde os isolados do patógeno CMM-3071 e CMM-3079 foram sensíveis a todos os filtrados dos isolados de leveduras utilizados. Embora tenha sido caracterizada a atividade *killer* no isolado L-F nos diferentes valores de pH em meio de cultivo e temperaturas avaliadas em testes iniciais de atividade *killer*, a estabilidade desta atividade em testes com filtrados, pode ter sido afetada por diferentes fatores. Segundo Golubev (2006), a atividade *killer* é uma característica que pode estar sujeita a mudanças, como por exemplo a ação do calor, que em condições de temperaturas mais elevadas pode ocorrer a inativação de toxinas responsáveis pela capacidade micocinogênica da levedura sobre o microrganismo alvo a ser inibido. A ação da antibiose de *K. ohmeri* sobre outros fungos fitopatogênicos, como exemplo, na inibição do crescimento micelial de *P. expansum* foi investigada por Coelho et al. (2007) e Coelho et al. (2009), onde foi demonstrada uma forte atuação no retardamento do desenvolvimento deste fitopatógeno na presença de isolados de *K. ohmeri* que apresentavam esta atividade. Outras características demonstradas por *K. ohmeri* é a biodegradação de micotoxinas produzidas por fungos fitopatogênicos, a exemplo da citação de Coelho et al. (2008), onde um isolado de *Pichia ohmeri* (sinomínia: *K. ohmeri*) foi capaz de degradar uma micotoxina denominada pantulina produzida por *P. expansum*, considerada um importante contaminante de frutos em pós-colheita.

Nos testes de pareamentos de colônias de leveduras com isolados de *S. rolfsii*, o efeito inibidor do crescimento micelial promovido pelo isolado L-N para dois, dos três isolados do patógeno avaliados, sugere que uma substância e/ou substâncias específicas

produzidas por este isolado de levedura estejam presentes em maior quantidade em relação aos demais isolados de leveduras da espécie, sendo a causa da ação deletéria sobre estes isolados do patógeno. Alguns trabalhos realizados com espécies de diferentes gêneros de leveduras, tais como espécies do gênero *Candida*, vem demonstrando a identificação de muitos compostos produzidos por estas leveduras relacionados à antibiose sobre fitopatógenos fúngicos (El Tarabily e Sisvasithamparam 2006). Em trabalhos conduzidos por El Mehalawy (2004), foi demonstrado que em filtrados de *C. steatolytica* foram encontrados um total de dez compostos químicos com diferentes pesos moleculares, a exemplo: tetratetracontane, ácido hentetracontanoico e o ácido hexadecanoico, todos apresentando um grande efeito inibidor sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*. Além destes compostos químicos, foi relatada a atividade de enzimas produzidas por algumas leveduras na degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos, como quitinases e β -1,3- glucanases (Botha 2011). A exemplo, dos resultados observados com utilização da enzima β -1,3- glucanase extraída de filtrados de *Pichia anomala* como inibidor no desenvolvimento de *Botrytis cinerea* em frutos de maçã (Jijakli e Lepoivre 1998). Pelos resultados obtidos no presente trabalho, é possível que estes compostos químicos e enzimas estejam presentes nos isolados de *K. ohmeri*, atuando de forma direta na antibiose sobre os isolados de *S. rolfsii* utilizados nos ensaios *in vitro*.

A expressão da lectina WGA em isolados de *K. ohmeri*, bem como nos isolados de *S. rolfsii* utilizados no presente trabalho, sugere que estes microrganismos possuem afinidade à polissacarídeos análogos, e que estes possam estar envolvidos no antagonismo destas leveduras a *S. rolfsii*. A influência de lectinas no antagonismo de agentes fúngicos de controle biológico sobre *S. rolfsii* também foi comprovada em estudos realizados por Barak et al. (1984), onde lectinas encontradas em conídios de

Trichoderma harzianum e *T. hamatum* aglutinaram-se a polissacarídeos associadas às hifas de *S. rolfsii*, tendo as lectinas neste caso, um papel importante na predação do fitopatógeno.

Apesar dos resultados variados na inibição do patógeno nos ensaios *in vitro*, uma significativa redução da severidade da podridão-de-esclerócio em plantas de feijão caupi, em condições de casa-de-vegetação, foi obtida pela aplicação dos isolados de leveduras em forma de suspensão encontrada em arroz colonizado por *S. rolfsii* utilizado como fonte de inóculo nas covas de semeadura. Diversos fatores podem ser a causa da eficiência dos tratamentos no controle da severidade da podridão-de-esclerócio nas plantas avaliadas, como às diversas formas de interações que podem ocorrer entre células de leveduras antagônicas e o patógeno alvo e/ou na planta hospedeira. Segundo Botha (2011) e El Tarabily e Sisvasithamparam (2006), é provável que estas características antagônicas observadas em leveduras, atuando em patossistemas envolvendo fungos que atacam tecidos vegetais de parte aérea e frutos em pós-colheita, também possam ocorrer no controle de doenças radiculares de origem fúngica.

No trabalho realizado por Arras (1996), foram demonstradas interações antagônicas de leveduras sobre *Penicillium digitatum*, onde foi observada uma rápida colonização de micélios do fitopatógeno por células de *Candida famata*. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que esta levedura obteve uma grande atividade lítica e fagocítica em hifas deste fitopatógeno, elucidando desta forma que a predação foi um importante mecanismo de antagonismo encontrado em *C. famata*. Segundo El Tarabily e Sisvasithamparam (2006), o reconhecimento de leveduras à exsudatos provenientes de hifas de patógenos alvo é um processo importante dentro da predação destes microrganismos. Em outro exemplo, cita-se a adesão de células de *Pichia membranifaciens* a hifas de diferentes fungos filamentosos importantes em patologia

pós-colheita, tais como *Monillinia fructicola*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer*, onde o reconhecimento dos fitopatógenos pelas células da levedura foi mediado através da comprovação do envolvimento de lectinas no processo antagonismo (Schiler et al 2011).

A produção de biomassa vegetal promovida pelo tratamento de sementes com os isolados de *K.ohmeri* em feijão caupi no presente trabalho é semelhante ao observado em outros estudos realizados na promoção de crescimento desta leguminosa utilizando outras espécies de leveduras. A utilização de leveduras na promoção de crescimento de plantas de feijão caupi foi investigada por Boby et al. (2008), onde foi demonstrado que o tratamento com a espécie de micorriza *Glomus mosseae* incorporada ao solo aliado ao tratamento de sementes com *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus laurentii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Trichosporon cutaneum* foram capazes de incrementar biomassa vegetal em plantas de feijão caupi em relação as plantas que não receberam os tratamentos, ou mesmo em plantas que foram tratadas somente com a incorporação da micorriza ao solo. Neste mesmo trabalho, foi verificado o aumento de teores de nitrogênio e fósforo tanto na parte aérea como radicular de plantas oriundas de sementes tratadas com estas leveduras, além da elevação dos níveis de compostos fenólicos em raízes e clorofila em folhas.

Além do aumento da disponibilidade e acúmulo de nutrientes em plantas tratadas com leveduras, algumas espécies deste grupo fúngico têm a capacidade de influenciar o crescimento de plantas através de reguladores de crescimento, como as giberelinas e auxinas (El Tarabily e Sisvasithamparam 2006). Como alguns exemplos da influencia de reguladores de crescimento em plantas tratadas com leveduras, cita-se: o ácido 3-indol acético (AIA) na promoção de crescimento de beterraba açucareira (*Beta vulgaris* L.) que receberam tratamentos com *Candida Valida*, *Rhodotorula glutinis* e

Trichosporon asahii (El Tarabily 2004), assim como o ácido 3-indol pirúvico (AIP) como regulador de crescimento em plantas de milho (*Zea mays* L.), tratadas com a espécie de levedura *Williopsis saturnus* (Nassar et al. 2005).

Considerando que a espécie *S. rolfsii* é um agente fitopatogênico que causa danos bastante substanciais em plantas encontradas em fases iniciais de desenvolvimento vegetativo, pressupõe-se que a aceleração do crescimento da biomassa vegetal, bem como os possíveis ganhos em incremento nutricional e a ativação e/ou melhorias de mecanismos de resistência proporcionados às plantas tratadas com leveduras, auxiliam na redução de perdas futuras de produção e produtividade ocasionadas por este fitopatógeno. Entre outros mecanismos antagônicos importantes em leveduras a serem ressaltados em fases iniciais do crescimento de plantas, nas quais são mais predispostas ao ataque de fitopatógenos fúngicos habitantes do solo, estão a competição por espaço e nutrientes, seja pela capacidade de colonização da planta hospedeira ou pela disputa de exsudatos vegetais e minerais, a exemplo da produção de sideróforos encontrada em muitas leveduras (Botha 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho abrem perspectivas futuras para melhor compreensão do potencial de ação antagônica direta e/ou indireta encontrados em *K. ohmeri* sobre a espécie fitopatogênica *S. rolfsii*, onde se visa desta forma, incrementar novas ferramentas no controle biológico de doenças ocasionadas por este fitopatógeno na cultura do feijão caupi, bem como na melhoria de outras características agronômicas desejáveis, uma vez que relatos destas espécies de leveduras atuando como agentes de controle biológico neste patossistema ainda são inexistentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos a FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão de bolsa de estudo a Leonardo Tavares de Souza; ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa de Rejane Pereira Neves.

**MECANISMOS ANTAGÔNICOS DE *Kodamaea ohmeri* A *Sclerotium rolfsii* E
EFEITO NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO EM PLANTAS DE FEIJÃO
CAUPI**

RESUMO

Um total de cinco isolados da levedura *Kodamaea ohmeri* foi testado no antagonismo ao fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii*. Ensaio experimentais conduzidos *in vitro* foram avaliadas a atividade *killer* de leveduras, inibição de isolados de *S. rolfsii* e expressão de lectinas em isolados de *K. ohmeri* e *S. rolfsii*, bem como o controle da podridão-de-esclerócio e promoção de crescimento em plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) utilizando em casa-de-vegetação. Nos resultados obtidos, foi observada a presença da atividade *killer* em todos os isolados de *K. ohmeri* testados. A incorporação de filtrados de leveduras no meio de cultivo para crescimento de isolados de *S. rolfsii* em condições *in vitro* apresentou um efeito inibidor do crescimento micelial do patógeno para a maioria dos tratamentos com leveduras. Em pareamentos de colônias, foi demonstrado um baixo efeito antagônico para a maioria das leveduras testadas sobre isolados de *S. rolfsii*. Nos testes em casa-de-vegetação, todos os isolados de leveduras controlaram eficientemente a severidade da podridão-de-esclerócio em plantas quando aplicados em forma de suspensão sobre o inóculo do patógeno. Todos os isolados de *K. ohmeri* aplicados no tratamentos de sementes promoveram significativamente o ganho de biomassa vegetal de parte aérea em plantas de feijão caupi, sendo estes resultados variados quando avaliada produção de biomassa radicular. Os presentes resultados evidenciam o potencial do uso de isolados da espécie *K. ohmeri* no controle biológico de doenças ocasionadas por *S. rolfsii*, bem como na melhoria de aspectos agronômicos a serem incrementados no cultivo do feijão caupi.

Palavras-chaves: antagonismo, leveduras, podridão-de-esclerócio, *Vigna unguiculata*.

REFERÊNCIAS

ADEGBITE AA E AMUSA NA. 2005. The major economic field diseases of cowpea in humid agro-ecologies of South-Western Nigeria. *Afr J Biotechnol* 25: 4706-4712.

ARRAS G .1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biol Tec* 8:191–198.

BARAK R, ELAD Y, MIRELMAN D, CHET I.1985. Lectins: A possible base for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 75: 458-462.

BARNETT JA, PAINE RW, YARROW D. 2000. Yeasts: characteristics and Identification, 3rd ed., Cambridge: Cambridge University Press, 1152 p.

BEDENDO IP. 2011. Podridões de raiz e colo. In: AMORIM L ET AL (Eds), Manual de Fitopatologia, Piracicaba: Agronômica Ceres, Piracicaba, Brasil, 443-449.

BLUM LEB, AMARANTE CVT, ARIOLI CJ, GUIMARÃES LS, DEZANET A, HACK NETO P, SCHEIDT FR. 2003. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. *Trop Plant Pathol* 28: 96-100.

BOBY VU, BALAKRSHINA AN, BAGYARAJ DJ. 2008. Interaction between *Glomus musseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. *Microbiol Res* 163: 693-700.

BOTHA A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biol Biochem* 43:1-8.

BUZZINI P E MARTINI A. 2000. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. *Can J Microbiol* 46: 607–611.

COELHO AR, CELLI MG, ONO EYS, WOSIACKI G, HOFFMANN FL, PAGNOCCA FC, HIROOKA YE. 2007. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation *in vitro*. *Braz Arch Biol Techn* 50: 725-733.

COELHO AR, CELLI MG, ONO EYS, HOFFMANN FL, PAGNOCCA FC, GARCIA S, SABINO M, HARADA KI, WOSIACKI G, HIROOKA EY. 2008. Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin J* 3: 325-331.

COELHO AR, TACHI M, PAGNOCCA FC, NOBREGA GMA, HOFFMANN FL, HARADA KI, HIROOKA EY. 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia Ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Addit Contam* 26: 73-81.

EL MEHALAWY AA. 2004. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused for *Fusarium oxysporum*. *Int J Agric Biol* 6: 310-316.

EL TARABILY E SIVASITHAMPARAM K. 2006. Potential of yeast as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and plant growth promoters, *Mycoscience* 47: 25-35.

FERREIRA, D. F. Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. São Carlos, Brazil. Proceedings...São Paulo: UFSCA, 2000.

FERY RL E DUKES PD. 2011.Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: genetic characterization of two sources of resistance. *Int J Agr* 10: 1-6.

GOLUBEV WI. 2006.Antagonist interactions among yeasts. In: ROSA CA E PETER G (Eds), *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Berlin: Springer-Verlog, Berlin, Germany, 197-219.

LEAL AFG, LIMA NETO RG, MACÊDO DPC, BELTRÃO EI, NEVES RP. 2011. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Trichophyton tonsurans* and other keratinophilic filamentous fungi using lectins. *Mycoses* 54: 789-794.

LIMA NETO RG, BELTRÃO EI, OLIVEIRA PC, NEVES RP. 2011. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* 54: 23-29.

MCKINNEY HH. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J Agric Res* 26: 195-218.

MORANDI MAB.2010. Controle de fitopatógenos na agricultura orgânica. In: VENZON M ET AL (Eds), Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa: Epamig , Viçosa, Brazil, 75-100.

NASSAR AH, EL TARABILY KA, SIVASITHAMPARAM K. 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. Biol Fertil Soils 42: 97-108.

OZER E. 2000. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the micebrain. Clin Neuropathol 19: 21-25.

SCHISLER DA, JANISIEWICZ WJ, BOECKHOUT T, KURTZMAN CP. 2011. Agriculturally important yeasts: Biological control of field and postharvest diseases using yeasts antagonists, and yeasts pathogens of plants. In: KURTZMAN CP, FELL JW, BOECKHOUT T (Eds). The yeasts: a taxonomic study. London: Elsevier, London, United Kington, 45-58.

SERRA IMRS E SILVA GS. 2005. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no estado do Maranhão. Trop Plant Pathol 1: 61-66.

SINGH UP E SARMA BK. 2009. Biology and control of *Sclerotium rolfsii*: The incitant of collar rot of *Cicer arietinum*, Saarbrücken: VDM, 198 p.

VALENTE P, RAMOS JP, LEONCINI O. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy, Can J Microbiol 45: 949-958.

ANEXOS

Tabela 1. Inibição do crescimento micelial de isolados de *S. rolfsii* (CMM-3034, CMM-3071 e CMM-3079) calculado pelo diâmetro médio de colônias (DMC) crescidos em meio de cultivo homogeneizado com filtrados de leveduras da espécie *K. ohmeri*.

Filtrado	DMC (mm) ⁵					
	CMM-3034 ¹		CMM-3071		CMM-3079	
L-1 ⁴	61,64 ²	<i>b</i>	73,40	<i>c</i>	48,4	<i>bc</i>
L-5	64,84	<i>b</i>	73,60	<i>c</i>	40,6	<i>c</i>
L-F	78,36	<i>a</i>	77,90	<i>bc</i>	48,4	<i>bc</i>
L-N	57,27	<i>b</i>	71,93	<i>c</i>	50,0	<i>b</i>
L-SJAD	64,83	<i>b</i>	84,05	<i>ab</i>	48,4	<i>bc</i>
Testemunha	85,11	<i>a</i>	89,75	<i>a</i>	59,3	<i>a</i>
CV(%) ³	14,06		9,31		7,51	

¹ Isolados de *S. rolfsii*. ² Médias de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra dentro da coluna não diferem entre si pelo teste LSD (P=0,05). ³ Valores do coeficiente de variação em percentagem (%). ⁴ Filtrados de isolados de leveduras. ⁵ Diâmetro médio de colônias em milímetros.

Tabela 2. Inibição do crescimento micelial de isolados de *S. rolfsii* (CMM-3034, CMM-3071 e CMM-3079) calculado pelo diâmetro médio de colônias (DMC) crescidos sobre influência de pareamentos com isolados de leveduras da espécie *K. ohmeri*.

Levedura	DMC (mm) ⁵					
	CMM-3034 ¹		CMM-3071		CMM-3079	
L-1 ⁴	87,62 ²	<i>a</i>	88,70	<i>a</i>	90,00	<i>a</i>
L-5	89,46	<i>a</i>	89,10	<i>a</i>	86,93	<i>a</i>
L-F	87,55	<i>a</i>	90,00	<i>a</i>	85,29	<i>a</i>
L-N	76,35	<i>b</i>	46,75	<i>b</i>	88,36	<i>a</i>
L-SJAD	89,87	<i>a</i>	90,00	<i>a</i>	90,00	<i>a</i>
Testemunha	89,04	<i>a</i>	89,20	<i>a</i>	89,31	<i>a</i>
CV(%) ³	4,87		11,92		4,98	

¹ Isolados de *S. rolfsii*. ² Médias de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra dentro da coluna não diferem entre si pelo teste LSD (P=0,05). Os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$. ³ Valores do coeficiente de variação em percentagem (%).

⁴ Isolados de leveduras. ⁵ Diâmetro médio de colônias em milímetros.

Tabela 3. Aglutinação de lectinas em isolados de *K. ohmeri* e *S. rolfsii*.

Isolado	Lectinas			
	WGA ¹	UEA ²	Con A ³	PNA ⁴
CMM-3034 ⁶	+ ⁵	-	-	-
CMM-3071	+	-	-	-
CMM-3079	+	-	-	-
L-1 ⁷	+	+	++	++
L-5	+	-	++	+++
L-F	+	+	++	+
L-N	++	++	+++	++
L-SJAD	+	+	++	++

¹ Wheat-germ agglutinin (WGA). ² *Ulex europaeus* agglutinin (UEA). ³ Concanavalin A (Con A). ⁴ Peanut agglutinin (PNA). ⁵ Classes de reação a lectinas segundo Ozer (2000): (-) ausente, (+) fraca, (++) moderada e (+++) intensa. ⁶ Isolados de *S. rolfsii*. ⁷ Isolado de leveduras.

Tabela 4. Avaliação da severidade da podridão-de-esclerócio causado por *S. rolfsii* (CMM-3034) calculada Índice da Doença (ID) sobre influência da aplicação de suspensões de isolados de *K. ohmeri* em covas de semeaduras.

Levedura	ID ¹ (%)
L-SJAD	17,19 ² a
L-5	18,75 ab
L-F	20,31 ab
L-N	32,81 ab
L-1	34,38 b
Testemunha	79,69 c
CV (%)	22,21

¹ Índice da Doença de Mckinney (1923). ² Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra dentro da coluna não diferem entre si pelo teste LSD (P=0,05).

Tabela 5. Promoção de crescimento de plantas de feijão caupi após tratamento de sementes com isolados de leveduras da espécie *K. ohmeri*.

Levedura⁶	BFPA (g)¹		BSPA(g)²		BFR (g)³		BSR (g)⁴	
L-1	2,30	<i>b</i>	0,51	<i>b</i>	0,96	<i>b</i>	0,35	<i>ab</i>
L-5	2,74	<i>a</i>	0,63	<i>a</i>	0,90	<i>b</i>	0,42	<i>a</i>
L-F	2,66	<i>a</i>	0,52	<i>b</i>	0,85	<i>b</i>	0,35	<i>ab</i>
L-N	2,75	<i>a</i>	0,52	<i>b</i>	1,18	<i>a</i>	0,39	<i>a</i>
L-SJAD	2,56	<i>ab</i>	0,53	<i>b</i>	0,98	<i>ab</i>	0,41	<i>a</i>
Testemunha	1,65	<i>c</i>	0,43	<i>c</i>	0,90	<i>b</i>	0,28	<i>b</i>
CV(%) ⁷	11,95		11,21		16,19		14,32	

¹Biomassa Fresca de Parte Aérea (gramas). ²Biomassa Seca de Parte Aérea (gramas).

³Biomassa Fresca de Raiz (gramas). ⁴Biomassa de Raiz Seca (gramas). Médias seguidas de mesma letra dentro da coluna não diferem entre si pelo teste LSD (P=0,05).

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. O tratamento de sementes com os cinco isolados (L-1, L-5, L-F, L-N e L-SJAD) selecionados, bem como a aplicação de suspensões de células destas leveduras em covas de semeadura foi considerado eficiente na redução da severidade da podridão-de-esclerócio em plantas de feijão caupi;
2. Apesar das diferentes mesorregiões de coleta e tecidos de origem, os cinco isolados de leveduras selecionados como antagonistas a *Sclerotium rolfsii* foram identificados como sendo da espécie *Kodamaea ohmeri*;
2. A inibição do crescimento de isolados *Sclerotium rolfsii* em testes utilizando filtrados de leveduras em meio de cultivo do patógeno foi associada a presença da atividade “killer” nos isolados de *K. ohmeri* selecionados;
3. A presente aglutinação da lectina WGA a carboidratos análogos encontrados em isolados de *K. ohmeri* antagonistas, bem como em isolados de *S. rolfsii*, demonstra a possibilidade de reconhecimento e predação na relação antagonista/patógeno entre as duas espécies;
4. Foi evidenciado o primeiro relato da espécie *K. ohmeri* no controle em patossistema envolvendo *S. rolfsii* e *Vigna unguiculata*;
5. Todos os isolados de *K. ohmeri* selecionados apresentaram potencial para a promoção do crescimento em feijão caupi pelo incremento de biomassa de parte aérea em plantas oriundas do tratamento de sementes com células de leveduras.