

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON

ANDERSON LUIS HELING

**SELEÇÃO, AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM
PLANTAS DE BETERRABA TRATADAS COM LEVEDURAS PARA CONTROLE
DE CERCOSPORIOSE**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2019

ANDERSON LUIS HELING

**SELEÇÃO, AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM
PLANTAS DE BETERRABA TRATADAS COM LEVEDURAS PARA CONTROLE
DE CERCOSPORIOSE**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Orientador: Dr. Odair José Kuhn
Coorientadores: Dr. José Renato Stangarlin e Dr^a Márcia de Moraes Echer

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Heling, Anderson Luis

Seleção, avaliação do crescimento e alterações bioquímicas em plantas de beterraba tratadas com leveduras para controle de cercosporiose / Anderson Luis Heling; orientador(a), Odair José Kuhn; coorientador(a), José Renato Stangarlin, coorientador(a)II, Marcia de Moraes Echer, 2019.

71 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

1. Beta vulgaris. 2. Candida albicans. 3. Pichia pini. I. Kuhn, Odair José. II. Stangarlin, José Renato. III. Echer, Marcia de Moraes. IV. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

ANDERSON LUÍS HELING

Seleção, avaliação do crescimento e alterações bioquímicas em plantas de beterraba tratadas com leveduras para controle de cercosporiose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle Alternativo, APROVADO pela seguinte banca examinadora:

Orientador - Odair José Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

José Renato Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Marcia de Moraes Echer

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Roberto Luis Forz

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Eliana Pelicion Pereira Figueira

Instituto Federal do Paraná (IFPR)

Marechal Cândido Rondon, 5 de setembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Odair José Kuhn pela orientação e incentivos para meu crescimento como profissional, desde a graduação até o doutorado.

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin pela co-orientação e por estar sempre presente e auxiliando no desenvolvimento dos trabalhos.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, que através do Programa de Pós-Graduação em Agronomia possibilitou a realização desta.

Ao grupo de pesquisa em controles biológicos e alternativo em fitossanidade (COBALFI) e aos colegas de laboratório que sempre estiveram presentes e auxiliando no andamento das pesquisas.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que de uma forma ou outra participaram da realização desta obra.

RESUMO

HELING, Anderson Luis, Doctor Scientiae, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Agosto – 2019. **Seleção, avaliação do crescimento e alterações bioquímicas em plantas de beterraba tratadas com leveduras para controle de cercosporiose.** Orientador: Dr. Odair José Kuhn. Coorientadores: Dr. José Renato Stangarling e Dr^a Márcia de Moraes Echer.

Leveduras são potenciais agentes de controle biológico de doenças de plantas e indutores de resistência de plantas a patógenos. Este trabalho objetivou a seleção de leveduras com potencial para controle de cercosporiose (*Cercospora beticola*) em plantas de beterraba com base na redução da severidade e nos mecanismos de ação; avaliação da indução de resistência proporcionado pelas leveduras selecionadas ou seus exsudatos presentes em filtrado de cultura; e medida de crescimento e produtividade em função dos tratamentos com leveduras e seus filtrados. Inicialmente foram testados 44 isolados de leveduras em casa de vegetação quanto ao seu potencial de controle da cercosporiose. Destes selecionou-se 31, os quais foram testados *in vitro* quanto à produção de compostos voláteis, destes 19 foram selecionados e testados quanto à produção de compostos não voláteis. Após estas avaliações, selecionou-se três isolados de leveduras, com os quais testou-se células vivas e filtrados em relação ao desenvolvimento das plantas de beterraba e alterações bioquímicas, quando utilizados os tratamentos para controle da cercosporiose. As variáveis analisadas quanto ao desenvolvimento das plantas foram: número de folhas; massas secas de folha, pecíolo, hipocótilo, raiz, parte aérea e total; área foliar; produção; severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Quanto as alterações bioquímicas, analisou-se as variáveis: fenóis totais; lignina; proteínas totais, atividade de peroxidases, β -1,3-glucanases e fenilalanina amônia-liase. Selecionou-se as leveduras *Candida albicans*, *Pichia pini* e JRS Amarela como potenciais para o controle de cercosporiose em plantas de beterraba. Os tratamentos com as leveduras selecionadas não apresentaram custo energético significativo, não impactando no desenvolvimento e nem na produção das plantas tratadas com estas. Plantas tratadas com as leveduras selecionadas apresentaram alteração nos teores de ligninas, fenóis totais e proteínas totais, indicando uma possível indução de

resistência em função da aplicação da células e filtrados de cultura destas leveduras.

Palavras-chave: *Beta vulgaris*. *Candida albicans*. *Pichia pini*.

ABSTRACT

HELING, Anderson Luis, Doctor Scientiae, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, August – 2019. **Selection, growth evaluation and biochemical changes in plants of beet treated with yeasts to control of cercosporiosis.** Advisor: Dr. Odair José Kuhn. Co-Advisors: Dr. José Renato Stangarling and Dr^a Márcia de Moraes Echer.

Yeasts are potential agents of biological control of plants diseases and inductors of resistance of plants to pathogens. This work aimed the selection of yeasts with potential to control of cercosporiosis (*Cercospora Beticola*) in beet plants based on the reduction of severity and action mechanisms. Evaluation of resistance induction provided by the selected yeasts or their exudates presents in yours filtrates culture and to evaluate growth aspects and productivity as a function of the treatments with yeasts and their filtrates. Initially were tested 44 isolated yeasts in greenhouse about your potential of cercosporiosis control. Of these was selected 31, which were tested *in vitro* about production of volatile composts, wich 19 that were selected and tested about production of non-volatile composts. After these evaluation, was selected three yeasts isolate, which live cells and filtered were tested in relation to beet plants development and biochemical changes, when treatments are used to cercosporiais. The variables analyzed for the development of the plants were: number of leaves; dry mass of leaves, petiole, hypocotyl, root, total aerial part; leaf area; production; severity and área runder disease progress curve (AACPD). Regarding the biochemical alterations, the following variables were analyzed: total phenols; lignin; total proteins, peroxidases activity, β -1,3-glucanases and phenylalanine ammonia-lyase. The yeasts *Candida albicans*, *Pichia pini* and JRS Amarela were selected as potentials for the control of cercosporiasis in beet plants. The treatments with the selected yeasts did not present significant fitness cost, not impacting in the development nor in the production of the plants treated with them. Plants treated with selected yeasts cheged lignins, total phenols and total proteins, indicating a possible induction of resistance as a function of the application of the cells and culture filtrates of these yeasts.

Keywords: *Beta vulgaris*. *Candida albicans*. *Pichia pini*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores de temperaturas (°C) máxima, média diária e mínima, no interior da casa de vegetação, no período de 26 de setembro a 10 de novembro de 2016. .16	
Figura 2. Valores de umidade relativa do ar (%) máxima, média diária e mínima, no interior da casa de vegetação, no período de 26 de setembro a 10 de novembro de 2016.17	
Figura 3. Valores de temperaturas (°C) e umidade relativa do ar (%), na casa de vegetação, no período de 01 de fevereiro de 2018 a 30 de março de 2018.23	
Figura 4. Valores de temperaturas (°C) e umidade relativa do ar (%), na casa de vegetação, no período de 08 de agosto de 2017 a 13 de outubro de 2017.25	
Figura 5. Curva padrão de catecol27	
Figura 6. Curva padrão de lignina28	
Figura 7. Curva padrão para proteínas.....29	
Figura 8. Curva padrão para glicose30	
Figura 9. Curva padrão para o ácido trans-cinâmico.....31	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem dos isolados de leveduras.....	14
Tabela 2. Isolados de leveduras testados <i>in vitro</i> quanto a produção de compostos voláteis	18
Tabela 3. Isolados de leveduras testados <i>in vitro</i> quanto a produção de compostos não voláteis	19
Tabela 4. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cercosporiose (<i>Cercospora beticola</i>) de plantas de beterraba tratadas com isolados de leveduras.....	33
Tabela 5. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de colônias de <i>Cercospora beticola</i> , submetidas ao teste de compostos voláteis, produzidos por isolados de leveduras.....	36
Tabela 6. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de colônias de <i>Cercospora beticola</i> , submetidas ao teste de compostos não voláteis, produzidos por isolados de leveduras.....	39
Tabela 7. Número de folhas de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle da <i>Cercospora beticola</i>	41
Tabela 8. Massa seca (g) de folhas de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de <i>Cercospora beticola</i>	41
Tabela 9. Massa seca de pecíolos (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de <i>Cercospora beticola</i>	42
Tabela 10. Massa seca de hipocótilos (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de <i>Cercospora beticola</i>	43
Tabela 11. Massa seca de parte aérea (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de <i>Cercospora beticola</i>	43
Tabela 12. Massa seca de raiz (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de <i>Cercospora beticola</i>	44
Tabela 13. Área foliar (cm ²) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de <i>Cercospora beticola</i>	44
Tabela 14. Severidade final de <i>Cercospora beticola</i> , AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) e produção de beterrabas submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de <i>Cercospora beticola</i>	45

Tabela 15. Fenóis totais (mg g ⁻¹ tecido fresco) de plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com <i>Cercospora beticola</i>).....	47
Tabela 16. Lignina (mg g ⁻¹ tecido fresco) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com <i>Cercospora beticola</i>).....	49
Tabela 17. Proteínas totais (mg g ⁻¹ tecido fresco) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com <i>Cercospora beticola</i>)	51
Tabela 18. Atividade de peroxidases (absorbância min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com <i>Cercospora beticola</i>)	52
Tabela 19. Atividade de β-1,3-glucanases (mg de glicose min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com <i>Cercospora beticola</i>).....	54
Tabela 20. Atividade de Fenilalanina amônia-liase (mg de ác. <i>trans</i> -cinâmico hora ⁻¹ g ⁻¹ tecido fresco) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com <i>Cercospora beticola</i>)	55
Tabela 21. Severidade final e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de beterrabas tratadas com diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle da cercosporiose	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. CULTURA DA BETERRABA	3
2.2. DOENÇAS DA BETERRABA	3
2.2.1. Cercosporiose	4
2.3. CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS	6
2.4. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS	7
2.5. MICRORGANISMOS NO CONTROLE BIOLÓGICO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS.....	8
2.5.1. Leveduras	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. SELEÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	13
3.1.1. Local e preparo dos vasos	13
3.1.2. Origem, cultivo, preparo das leveduras e inoculação.....	13
3.1.3. Cultivo e preparo de inóculo e inoculação do patógeno.....	15
3.1.4. Avaliação de severidade	15
3.1.5. Coleta de dados ambientais.....	16
3.2. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	17
3.3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS.....	19
3.4. AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS	20
3.4.1. Local e preparo dos vasos	20
3.4.2. Cultivo, preparo das leveduras e inoculação.....	21
3.4.3. Cultivo e preparo de inóculo e inoculação do patógeno.....	21
3.4.4. Avaliações de crescimento.....	22
3.4.5. Coleta de dados ambientais.....	22
3.5. AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	23
3.5.1. Condução das plantas, obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar.....	23
3.5.2. Obtenção do extrato metanólico	26
3.5.3. Obtenção do extrato proteico	26
3.5.4. Fenóis totais	26
3.5.5. Lignina.....	27

3.5.6. Proteínas totais	28
3.5.7. Atividade de peroxidases	29
3.5.8. Atividades de β -1,3-glucanases	30
3.5.9. Atividades de fenilalanina amônia-liase	31
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. SELEÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	33
4.2. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	35
4.3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS.....	38
4.4. ANÁLISE DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS.....	40
4.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	47
4.5.1. Fenóis totais	47
4.5.2. Lignina.....	48
4.5.3. Proteínas totais	50
4.5.4. Atividade de peroxidases	51
4.5.5. Atividade de β -1,3-glucanases	53
4.5.6. Atividade de fenilalanina amônia-liase	54
4.5.7. Severidade final e AACPD	55
5. CONCLUSÃO	58
6. REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

A beterraba (*Beta vulgaris* L) é uma das principais hortaliças tuberosas produzida e consumida no Brasil, sendo que, 77% da produção brasileira é proveniente das regiões sul e sudeste, com produção está concentrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, além disto, 42% das propriedades brasileiras produtoras de beterraba estão localizadas na região sudeste e 35% na região sul (TIVELLI; TRANI, 2008; MARQUES et al., 2010).

Esta cultura pode ser infectada por diversos patógenos, no entanto, a cercosporiose, causada por *Cercospora beticola* é a principal doença da cultura em boa parte das regiões produtoras. Sua dispersão ocorre principalmente pelo vento e respingos de água da chuva ou irrigação (TIVELLI; TRANI, 2008).

Plantas infectadas tem sua área fotossintética reduzida, em casos de alta severidade da doença as lesões podem coalescerem e promoverem uma morte antecipada da folha, a planta então repõe suas folhas utilizando reservas da raiz e assim ocasionando redução da produtividade (TIVELLI et al., 2011; MAY DE MIO, et al., 2008).

O controle desta doença pode ser feito utilizando-se manejo adequado, como rotação de culturas, semeadura de sementes saudáveis e de cultivares tolerantes à doença, adubação equilibrada e controle químico com fungicidas (TIVELLI et al., 2011).

Outras formas de controle que podem ser empregadas são o controle biológico e indução de resistência das plantas.

O controle biológico consiste na utilização de um microrganismo como agente controlador, seja por antibiose, competição ou parasitismo. Esta técnica de controle é milenar, porém, após a revolução verde deixou de ser utilizado, e vem sendo retomada atualmente devido a demanda da sociedade por alimentos mais seguros do ponto de vista biológico e químico, e também devido a seleção de indivíduos resistentes dentro da população de patógenos (MEDEIROS et al., 2018).

A indução de resistência de plantas a patógenos consiste na ativação de mecanismos de defesa da planta que estavam latentes e seriam ativados apenas após a interação da planta com o patógeno. Esta indução pode ocorrer por indutor biótico ou abiótico, sendo que as leveduras apresentam-se como promissores agentes bióticos de indução de resistência de plantas a patógenos (KUHN, PASCHOLATI, 2007).

Diversos estudos vêm sendo realizados com leveduras como agentes de controle biológico de doenças de plantas e como agentes bióticos de indução de resistência de plantas a patógenos. Estes organismos apresentam grande variabilidade na natureza, podendo ser encontradas diversas espécies em diversos ambientes naturais, e apresentam grande afinidade com plantas, especialmente aquelas que colonizam o filoplano destas (RUZ-MOYANO et al., 2016).

Sendo assim, a hipótese deste trabalho é que leveduras e seus filtrados possuem potencial de controlar cercosporiose em plantas de beterraba, seja pelo controle do patógeno ou pela indução de resistência das plantas.

Deste modo, este trabalho teve como objetivos a seleção de leveduras com potencial para controle de cercosporiose em plantas de beterraba com base na redução da severidade e nos mecanismos de ação; avaliação da indução de resistência proporcionado pelas leveduras selecionadas ou seus exsudatos presentes em filtrado de cultura; e avaliar aspectos de crescimento e produtividade em função dos tratamentos com leveduras e seus filtrados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CULTURA DA BETERRABA

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é uma hortaliça da família Chenopodiaceae, tendo sua origem a partir de sua forma primitiva, a *Beta vulgaris perennis*. Esta planta é originária das regiões sul e leste da Europa e norte da África (TIVELLI et al., 2011).

No Brasil a beterraba é uma das principais hortaliças cultivadas, e seu cultivo é principalmente feito com cultivares de mesa para fins comerciais (TIVELLI et al., 2011).

Conforme Nascimento (2012) o cultivo de beterraba representa 2,1% do mercado nacional de hortaliças, sendo que, a cada ano está fatia do mercado vem crescendo, impulsionado pelo maior consumo desta.

De acordo com Tivelli e Trani (2008), no Brasil 77% da produção brasileira de beterraba é proveniente das regiões sul e sudeste.

Conforme dados do Departamento de Economia Rural (DERAL, 2016), na safra 2013/2014 o Estado do Paraná cultivou uma área de 3.708 ha com a cultura da beterraba, obtendo produção de 101.860 toneladas, o que resulta em uma produtividade de 27,5 t ha⁻¹.

2.2. DOENÇAS DA BETERRABA

Dentre os tratos culturais da beterraba o manejo de doença merece grande importância. Segundo Trani et al. (2013) no verão a produtividade da cultura é menor devido à alta incidência de doenças, em especial as fúngicas.

A cultura da beterraba está suscetível a diversas doenças, dentre elas a cercosporiose ou mancha de cercospora (*C. beticola*) é a principal e mais destrutiva doença da cultura. Além desta, outras doenças comumente encontradas na cultura da beterraba são: rizomania (*Beet necrotic yellow vein virus* – BNYVV), tombamento ou “damping-off” (*Rhizoctonia solani*, *Phoma betae*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp.), mancha das folhas (*Phoma betae*) podridão branca (*Sclerotium rolfsii*), nematoides de galhas (*Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incógnita*, *M. javanica* e *M. eterolabii*), manchas bacterianas das folhas (*Xanthomonas campestris* pv. *betae*), podridão mole (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) e oídio (*Erysiphe betae*) (CAMELO-GARCÍA, et al., 2016).

2.2.1. Cercosporiose

De acordo com Tivelli et al. (2011) diversas doenças podem estar presentes nos cultivos de beterraba e causar prejuízos na produção, no entanto, cercosporiose ou mancha de cercóspora causada por *C. beticola* é um sério problema, principalmente para os cultivos em condições de alta umidade relativa do ar (maior que 90%) e temperatura entre 22 e 26 °C, quando o fungo encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento, epidemias da doença são geralmente relatadas quando a diferença entre temperatura noturna e diurna passa dos 7 °C, o que favorece a formação de orvalho nas primeiras horas da manhã, o período de incubação do patógeno varia de 7 a 14 dias em função das condições ambientais e da variedade de beterraba, plantas com deficiência nutricional são mais suscetíveis a doença (CAMELO-GARCÍA, et al., 2016).

A cercosporiose (*C. beticola*) está presente praticamente em todas as regiões que a beterraba (*Beta vulgaris*) é cultivada (PITTNER et al., 2016).

Este patógeno sobrevive em restos de culturas, sementes e outras plantas da família e a disseminação ocorre principalmente pelo vento e por respingos de chuva ou da irrigação. Plantas infectadas diminuem a sua capacidade fotossintética e produzem novas folhas a partir das reservas da raiz, com isto a redução na produtividade pode chegar a 45% (TIVELLI et al., 2011; MAY DE MIO et al., 2008).

Trata-se de um fungo necrotrófico com uma gama restrita de hospedeiros (CAMELO-GARCÍA, et al., 2016), que se desenvolve intracelularmente e as lesões tornam-se visíveis de 5 a 21 dias após a infecção do tecido. Trata-se de uma doença policíclica e os sintomas são geralmente mais frequentes após o fechamento das linhas de cultivo (TEDFORD et al., 2018).

Os sintomas são observados nas folhas, sendo as folhas mais velhas mais suscetíveis ao patógeno, nas quais surgem lesões necróticas, inicialmente pequenas e rodeadas por uma pigmentação arroxeada nas faces adaxial e abaxial. As manchas possuem coloração acinzentada devido à estrutura produzida pelo fungo e podem alcançar de 4 a 5 mm de diâmetro e, em condições de alta intensidade podem coalescerem necrosar-se totalmente, e haver morte de plantas (CAMELO-GARCÍA, et al., 2016; TIVELLI et al., 2011; MAY DE MIO et al., 2008).

2.2.1.1. Métodos de controle

Conforme Tivelli et al. (2011) diversas práticas podem ser utilizadas para o controle da doença, como por exemplo, rotação de culturas, semeadura de sementes sadias e de cultivares tolerantes à doença, adubação equilibrada e controle químico com fungicidas. No entanto, algumas medidas de controle de doenças tidas como alternativas vem ganhando destaque atualmente, como é o caso do controle biológico de doenças de plantas e a indução de resistência de plantas a patógenos.

A rotação de culturas, conforme Reis, Casa e Bianchin (2011) afeta todos os fitopatógenos que sobrevivem saprofiticamente nos restos culturais dos hospedeiros, visto que, os restos culturais fornecem nutrição e abrigo aos patógenos durante a fase saprofítica.

Com relação a qualidade sanitária das sementes (glomérulos) de beterraba importadas pelo Brasil, conforme levantamento realizado pela EMBRAPA Hortaliças e ESALQ/USP, constatou-se uma elevada presença de microrganismos associados a estes (NASCIMENTO, 2012).

Estudos comprovam a menor incidência de doenças em virtude de adequada nutrição mineral da planta (MORALES et al., 2012). Uma nutrição adequada das plantas pode determinar uma menor predisposição às doenças, visto que, a nutrição equilibrada promove maior capacidade de defesa das plantas, pois o estado nutricional interfere nos mecanismos de defesa, protegendo sob a forma de barreira física, por meio do espessamento da cutícula e, ou, lignificação de células epidérmicas; por melhor controle da permeabilidade da membrana citoplasmática, impedindo a saída de açúcares e aminoácidos dos quais os patógenos se nutrem, além de produzir compostos fenólicos com propriedades fungistáticas (CARVALHO et al., 2013).

Para o controle químico desta doença, são registrados no Ministério da Agricultura 50 produtos comerciais com 10 diferentes ingredientes ativos (MAPA, 2019).

Conforme Tomic et al. (2018), os fungicidas com a maior eficiência no controle de cercosporiose são azoxistrobina e flutriafol, ambos com eficiência superior a 90% no controle da doença. O controle da cercosporiose é realizado principalmente através do uso de fungicidas protetores e curativos (PITTNER, et al., 2016).

Outros métodos de controle que podem ser empregados são o controle biológico e a indução de resistência de plantas a patógenos. O controle biológico promove o controle do patógeno através da ação de outro microrganismo. Este método foi muito utilizado no período que antecede a revolução verde, sendo que, após está, este método acabou deixando de ser utilizado. Já a indução de resistência de plantas a patógenos ocorre quando as plantas tem ativado seus mecanismos de defesa latentes. O sinal que desencadeia a ativação destes mecanismos de defesa pode ser proveniente da ação de agentes bióticos ou abióticos, chamado eliciador.

2.3. CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS

Medeiros et al. (2018) definem o controle biológico de doenças de plantas como sendo o controle de um microrganismo através da ação de outro microrganismo, cujo controle pode ocorrer por meio de diversos mecanismos, tais como, a antibiose, a competição e o parasitismo.

O controle biológico já é empregado de modo empírico por agricultores a milhares de anos. Desde 5.000 a.C. os egípcios não relatavam ocorrências significativas de *Sclerotium cepivorum* em cultivo de cebola, visto que, as inundações cíclicas do rio Nilo se encarregavam de manter as margens cultiváveis cobertas com lâmina d'água, o que favorecia a prevalência, na microbiota do solo, de antagonistas naturais ao patógeno, porém, esta doença começou a ter importância econômica após a construção da represa de Assuã em 1960, que alterou o ciclo de inundações (FREITAS et al., 2016).

A partir da década de 1940, o controle biológico de doenças de plantas ganhou grande importância em todo mundo, com diversos trabalhos e pesquisas sobre o tema (FREITAS et al., 2016).

O Brasil é um dos líderes mundiais no setor do agronegócio, no entanto, essa liderança ocorreu as custas de uma dependência crescente de insumos importados, no país, a história do controle biológico é relativamente recente e marcada por diversas interrupções porém, a produção e utilização de agentes de controle biológico de doenças em cultivos vem cada vez mais sendo requisitada, principalmente devido a demanda de produtos com menor utilização de agrotóxicos (BETTIOL; MORANDI, 2009; BETTIOL; MAFFIA; CASTRO, 2014).

Porém, a crescente preocupação da sociedade com os impactos negativos causados ao meio ambiente e à saúde humana, gerados pelo uso de agrotóxicos, faz com que pesquisadores e produtores busquem maneiras alternativas no manejo de doenças, dentre estas, destaca-se o controle biológico de doenças de plantas (GOUVEA et al., 2009). Esta preocupação é gerada pelo elevado e ainda crescente consumo de agrotóxicos na produção de alimentos, conforme Carneiro et al. (2015) desde o ano de 2008 o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo que em 2012, enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190%, e o uso crescente de agrotóxicos juntamente com o uso inadequado destes acarreta grandes problemas de saúde pública, gerando impactos diretos e indiretos a vida da população brasileira, além disto, a uso de agrotóxicos para produção de alimentos não necessariamente eleva esta, e nem mesmo é necessário para garantir o abastecimento alimentar de uma população, visto que em diversos estudos os sistemas de produção que não empregam agrotóxicos tem gerado mesma ou maior produtividade.

2.4. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS

As plantas apresentam um sistema de defesa latente, com a finalidade de economizar energia e substrato, que pode ser ativado com a chegada do patógeno, ao contrário da resistência constitutiva, que representa um custo real para a planta, uma vez que independente da presença do patógeno esta investe os seus limitados recursos na produção de defesas (KUHN; PASCHOLATI, 2007).

A indução de resistência de plantas a patógenos, conforme Pascholati e Dalio (2018) envolve a ativação de mecanismos de resistência latentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Essa resposta pode incluir o acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese e fitoalexinas, e proteger a planta contra infecções subsequentes.

O processo de indução de resistência das plantas a patógenos é desencadeado quando um sinal externo, denominado eliciador, se liga a um possível receptor na superfície da célula vegetal e através dele o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações compatíveis (doença) ou incompatíveis (resistência) (BARROS et al., 2010).

A atividade do agente indutor não é devido a ação antimicrobiana ou a sua transformação em agentes anti-microbianos, mas sim devido a capacidade do mesmo em sensibilizar a planta e a mesma em ativar seus mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos em resposta a presença de um patógeno em potencial (PASCHOLATI; TOFFANO, 2007).

A resistência induzida em plantas pode ser ativada por uma série de indutores, assim, impedindo ou atrasando a entrada e subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (COLARES; BONALDO, 2014).

Há relato de vários indutores de resistência em plantas a patógenos, podendo-se citar os biofertilizantes (COLARES; BONALDO, 2014), extratos vegetais e óleos essenciais (ALVES; PERINA, 2014), bactérias e fungos (MEDEIROS et al., 2014), polissacarídeos (AGUIAR et al., 2014), soluções ultradiluídas (STANGARLIN; TOLEDO, 2014), além de outros.

É provável que a resistência induzida contra doenças se torne um importante componente dos programas de manejo de pragas e doenças, em especial no casos em que os métodos de controle atual são pouco eficazes ou muito agressivos ao meio ambiente, o que conseqüentemente resultará na redução dos pesticidas tradicionais (OLIVEIRA et al., 2016).

2.5. MICRORGANISMOS NO CONTROLE BIOLÓGICO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS

Dentre estes vários indutores de resistência em plantas a patógenos o uso dos microrganismos para tal finalidade ganha destaque. Conforme Medeiros et al. (2014) os microrganismos co-evoluíram com as plantas, trazendo-lhes benefícios mútuos dos mais diversos.

Os agentes de controle biológico podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com outros métodos de controle para assim melhorar sua eficiência (PALAZZINI et al., 2016).

Outra forma de biocontrole de doenças de plantas é a utilização de biomoléculas funcionais para o controle biológico. Estas biomoléculas são enzimas produzidas por microrganismos e que apresentam efeito sobre os patógenos, podendo ser utilizadas como biofungicidas alternativos aos fungicidas sintéticos uma vez que são multifuncionais, biodegradáveis, não-persistentes no ambiente e com

baixo custo de produção (KRIAA et al., 2015), a exemplo dos filtrados produzidos por leveduras.

2.5.1. Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares e desprovidas de clorofila, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais, quimioorganotróficos estritos e requerem para sua sobrevivência compostos orgânicos como fonte de carbono. São classificados com base em aspectos da sexualidade, como ascomicetos ou basidiomicetos. As leveduras não produzem corpo de frutificação. Sua reprodução pode ser assexuada, realizada por brotamento ou por fissão ou de forma sexuada pela formação de asco ou basídio durante o processo de meiose. Elas exercem funções primordiais em diversos ecossistemas, crescem nos mais variados substratos, contribuindo substancialmente para a biodiversidade (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008; DIAS; SCHWAN, 2010; TORTORA et al., 2012).

Estes organismos apresentam enorme biodiversidade de espécies presentes no ambiente sendo, grande parte de seus potenciais biotecnológicos ainda desconhecidos pelo homem (FUENTEFRIA, 2004).

São amplamente distribuídas na natureza, possuem ampla incidência e podem ser isoladas de ambientes aquáticos, terrestres e aéreos. O filoplano também contém muitas espécies de leveduras, que podem ser encontradas recobrando os tecidos vegetais, como folhas, flores e frutos. Podem ainda serem utilizadas no estudo de biocontrole, visto que são adaptadas as condições de luz solar e vento (ASSIS et al., 1999; SCHWAN et al., 2008; DIAS; SCHWAN, 2010; TORTORA et al., 2012).

Leveduras são imensamente importantes quando se julga o propósito industrial e biotecnológico que possuem, e vêm sendo usadas há milhares de anos na produção de alimentos, como pães, e bebidas como vinho e cerveja. A espécie mais estudada é *Saccharomyces cerevisiae*, da qual vem compondo significativamente o arsenal de pesquisas de controle biológico de doenças de plantas cultivadas e que tem apresentando resultados promissores de controle, principalmente, devido à grande capacidade de colonização de ferimentos, produção de compostos de ação antagônica à fitopatógenos, à relações de competição com os mesmos e até através da indução de resistência das plantas (SCHWAN et al., 2008; DIAS; SCHWAN, 2010; LOPES et al., 2015; HELING et al., 2015).

2.5.1.1. Leveduras no controle biológico

As leveduras se apresentam como potenciais agentes de controle biológico de doenças de plantas, visto que possuem características desejáveis a um agente de controle biológico, como serem geneticamente estáveis, não necessitarem de nutrientes especiais para uma rápida proliferação, são resistentes a condições ambientais adversas, são eficientes contra uma grande gama de patógenos, não produzem metabólitos perigosos a saúde humana e não são fortemente afetadas por pesticidas (RUIZ-MOYANO et al., 2016).

De acordo com Coelho et al. (2011) as leveduras podem atuar no controle de doenças de plantas através de vários mecanismos, como competição por nutrientes, antibiose e hiperparasitismo.

Nesta classe de microrganismos, as leveduras se apresentam como agentes promissores no biocontrole de doenças de plantas, pois são integrantes da microbiota epifítica, endofítica e do solo, podendo induzir a resistência, sendo as principais leveduras biocontroladoras *Aureobasidium* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp. e *Sporobolomyces* spp. (MELLO et al., 2011).

De acordo com Chen et al. (2016) o controle biológico de doenças de plantas com o uso de antagonistas microbianos surge como uma alternativa de tratamento promissora para a substituição ou redução do uso de fungicidas sintéticos e com baixo impacto ambiental, principalmente em pós-colheita, com isto, alguns microrganismos antagonistas tem sido identificados como promissores agentes de controle biológico, como é o caso das leveduras *Pichia* spp. e *Candida* spp.

Fialho et al. (2010) observaram que *S. cerevisiae* produz compostos orgânicos voláteis antimicrobianos, constituídos principalmente por álcoois e ésteres, sendo que alguns dos possíveis mecanismos de ação atuantes sobre os patógenos são a redução da síntese de proteínas e redução da atividade de enzimas envolvidas na morfogênese, além de que a exposição aos voláteis desencadeia processos de estresse oxidativo.

Deste modo, os compostos orgânicos voláteis produzidos por esta levedura possuem grande potencial no controle de organismos patogênicos de importância agrônômica.

Toffano (2010), pesquisando sobre compostos voláteis que inibem *in vitro* o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, observou que os compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* que causaram tal efeito foram o 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol.

Diversos autores vem relatando efeitos positivos no uso de diferentes espécies de leveduras ou mesmo de subprodutos produzidos por estas em diferentes patossistemas, como por exemplo, no controle da antracnose em sorgo (PICCININ et al., 2005), da mancha de dendrofoma em morangueiros (GOUVEA et al., 2009), da antracnose em plântulas de pepino (ZANARDO et al., 2009), de podridões em framboesa (ANTONIOLLI et al., 2011), da podridão-mole em couve-chinesa (MELLO et al., 2011), do crestamento bacteriano comum em feijoeiro (MÜLLER, 2011; HOFFMANN et al., 2012), da antracnose em frutos de pimentão (FRANÇA et al., 2015), da mancha de micosfaerela em morangueiros (HELING et al., 2015), da mancha bacteriana em melão (MELO et al., 2015), e da antracnose em frutos de banana (HELING, et al., 2017), dentre outros.

Deste modo, é necessário se ter uma profunda compreensão do modo de ação destes agentes, para o desenvolvimento de formulações e métodos de aplicação apropriados e que apresentem resultados satisfatórios no controle de patógenos de plantas (SPADARO; DROBY, 2016).

2.5.1.2. Leveduras na indução de resistência de plantas a patógenos

As leveduras também podem ser utilizadas como indutoras de resistência de plantas a patógenos, tanto as células vivas das leveduras como também filtrados e compostos produzidos por estas.

Stangarlin et al. (2010) observaram que a leveduras *S. boulardii* e seus derivados, como o filtrado de cultura e produto comercial à base de células liofilizadas desta levedura, induzem a síntese das fitoalexinas gliceolina em soja e deoxiantocianidinas em sorgo.

As leveduras podem possuir frações indutoras de resistência, além de que, em alguns casos, é necessária que estes passem por determinados processos, como por exemplo, autoclavagem do extrato aquoso, para que ocorra a extração das moléculas eliciadoras da resistência (ZANARDO et al., 2009).

As leveduras apresentam enorme potencial para contribuir de modo efetivo para a inovação biotecnológica. No entanto, os mecanismos de ação das leveduras

no controle de patógenos de plantas e na indução de resistência de plantas a patógenos ainda não estão claramente elucidados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO

3.1.1. Local e preparo dos vasos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, no período de 26 de setembro de 2016 a 10 de novembro de 2016. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo 45 tratamentos e quatro blocos, totalizando 180 parcelas. Cada parcela foi constituída de um vaso contendo uma planta.

Utilizou-se a cultivar de beterraba Chata do Egito, cultivar esta suscetível a cercosporiose, semeada em vasos de poliestireno de 0,3 dm³, contendo substrato obtido por mistura homogênea de húmus de minhoca e substrato para mudas (1:1; v/v), com adição de 8 g de fertilizante formulado NPK 4-14-8 por litro de substrato.

A semeadura foi efetuada manualmente com três glomérulos por vaso, em profundidade de 2 cm. A emergência das plântulas deu-se com quatro dias após a semeadura. Seis dias após a emergência (DAE) complementou-se a adubação com Yogen[®] (0,5 g L⁻¹). O desbaste foi realizado 11 DAE, utilizando-se tesoura para evitar danos ao sistema radicular da planta remanescente. Esta tesoura foi previamente desinfetada com hipoclorito de sódio (2%) a fim de se evitar contaminações.

Aos 26 DAE foi realizada adubação de cobertura, utilizando-se 2 g por vaso de NPK 4-14-8. Para controle de pulgões (Família Aphididae) foi realizada uma aplicação de Azamax (azadiractina) (1%) aos 35 DAE.

3.1.2. Origem, cultivo, preparo das leveduras e inoculação

Os tratamentos utilizados foram 44 isolados de leveduras e uma testemunha (água destilada). Os isolados, bem como sua origem, estão apresentados na Tabela 1. O cultivo dos isolados se deu em placas de Petri contendo meio ágar-YEPG (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura; 2% ágar), mantidos em BOD a 27 °C por três dias. Após este cultivo foram preparadas suspensões na concentração de 10 g L⁻¹, utilizando-se da colônia fresca e de água destilada.

Tabela 1. Origem dos isolados de leveduras

ORIGEM	ISOLADOS
Folha de mangueira (<i>Mangifera indica</i>)	<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 01-1
Folha de chuchuzeiro (<i>Sechium edule</i>)	<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 02-1
Folha de jabuticabeira (<i>Myrciaria cauliflora</i>)	<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 03-1
Folha de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i>)	<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 04-1
Folha de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 05-2; <i>Candida albicans</i> AH 05-3; <i>Zygoascus hellenicus</i> AH 05-5
Folha de caquizeiro (<i>Diospyros inconstans</i>)	<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2
Folha de milho (<i>Zea mays</i>)	<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 07-1; <i>Zygoascus hellenicus</i> AH 07-2
Flor de beijinho (<i>Impatiens walleriana</i>)	<i>Candida albicans</i> AH 09-1; Isolado não identificado AH 09-2
Folha de nêspera (<i>Eriobotrya japonica</i>)	<i>Candida albicans</i> AH 10-3
Folha de mandioquinha ornamental (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>)	<i>Candida albicans</i> AH 11-2; <i>Candida albicans</i> AH 11-3
Folha de mamoeiro (<i>Carica papaya</i>)	<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 12-1; <i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 12-3
Flor de roseira (<i>Rosa</i> sp.)	<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-1; <i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 14-2; <i>Rhodotorula glutinis</i> AH 14-3; <i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-4
Folha de roseira (<i>Rosa</i> sp.)	<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-1; <i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-2; <i>Pichia pini</i> AH 15-3; <i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 15-4; <i>Sporobolomyces roseus</i> AH 15-5
Folha de beijinho (<i>Impatiens walleriana</i>)	<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 16-1; <i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-2; <i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-3

Continua...

Continuação...

Folha de limoeiro (<i>Citrus limon</i>)	<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 18-1; <i>Pichia guilliermondii</i> AH 18-2; <i>Pichia pini</i> AH 18-3
Folha de orquídea	<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 19-1; <i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-2; <i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-3;
Folha de pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i>)	<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-1; <i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 20-3; <i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-4
Água do Lago Municipal de Marechal Cândido Rondon – PR	JRS Amarela
Fermento de panificação Fleischmann®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Os tratamentos foram aplicados aos 17 DAE, com o auxílio de um borrifador manual, aplicando-se em toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total da folha, evitando-se chegar ao ponto de escorrimento.

3.1.3. Cultivo e preparo de inóculo e inoculação do patógeno

A inoculação das plantas com *C. beticola* foi realizada três dias após a aplicação dos tratamentos.

O cultivo deste patógeno foi efetuado em placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose, ágar), mantidas em BOD a 27 °C, por 15 dias.

Após este cultivo preparou-se suspensão de esporos na concentração de 10^5 esporos mL⁻¹, que foi borrifada sobre toda parte aérea da planta com auxílio de um borrifador manual, inoculando-se toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total da folha, evitando-se chegar ao ponto de escorrimento. Posteriormente, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida por período de 36 horas. Com valores de temperatura (°C) máxima, média diária e mínima e umidade relativa do ar (%) máxima, média diária e mínima, no interior da casa de vegetação, conforme apresentados nas Figuras 1 e 2.

3.1.4. Avaliação de severidade

As avaliações de severidade de cercosporiose deram-se a partir de uma folha de beterraba por parcela, que foi escolhida aleatoriamente no momento da primeira

avaliação, marcada com fita branca e sempre a mesma sendo utilizada para as demais avaliações de severidade.

As avaliações foram realizadas aos 20, 27, 34 e 41 DAE, com auxílio do software Quant[®] v.1.0.0.22 (FERNANDES FILHO et al., 2002).

Com os valores de severidade de cercosporiose nas folhas de beterraba, no período avaliado, foi construída a curva de progresso da doença e calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme a equação: $AACPD = \sum [(y1+y2)/2]*7$, onde y1 e y2 refere-se a duas avaliações sucessivas da severidade da doença.

3.1.5. Coleta de dados ambientais

No período de condução do experimento foram coletados diariamente, com auxílio de armazenador de dados digital, os dados de temperaturas (°C) máxima e mínima (Figura 1), e umidade relativa do ar (%) máxima e mínima, (Figura 2). A temperatura média no período foi de 25,1 °C e a umidade relativa do ar de 61,2%.

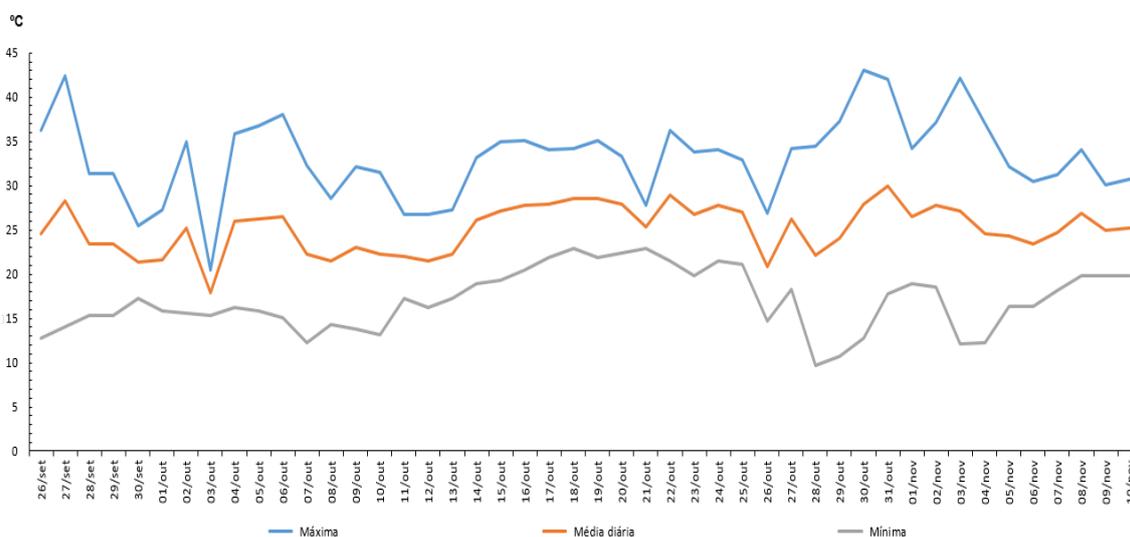


Figura 1. Valores de temperaturas (°C) máxima, média diária e mínima, no interior da casa de vegetação, no período de 26 de setembro a 10 de novembro de 2016.

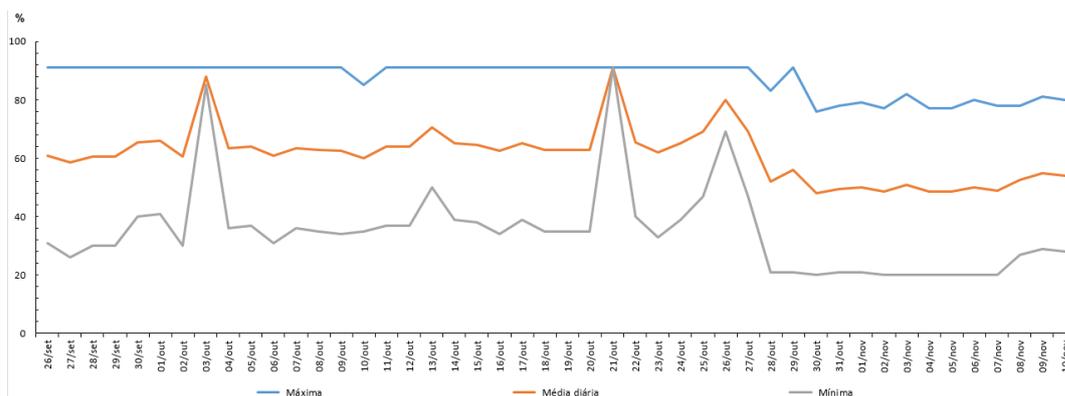


Figura 2. Valores de umidade relativa do ar (%) máxima, média diária e mínima, no interior da casa de vegetação, no período de 26 de setembro a 10 de novembro de 2016.

3.2. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

A avaliação de produção de compostos voláteis que reduzem o crescimento de colônias de *C. beticola* foi realizada com delineamento experimental em blocos casualizados (DBC) contendo 32 tratamentos (sendo 31 isolados de leveduras selecionados com base nos resultados obtidos no experimento em casa de vegetação, realizado previamente a este (Tabela 2), e uma testemunha, que recebeu apenas água destilada), com cinco blocos para cada tratamento, totalizando 160 parcelas, cada parcela sendo representada por uma placa de Petri.

Os isolados de leveduras foram cultivados em placas de Petri com meio ágar-YEPG, sendo estas placas fechadas na parte superior por outra placa de Petri, com meio BDA, na qual foi previamente alocado, na parte central da placa, um disco com 0,5 cm de diâmetro de colônia de *C. beticola*. Estas placas ficaram fixadas e vedadas por filme plástico por um período de 28 dias em BOD a 27 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

A cada sete dias avaliou-se o diâmetro da colônia, sendo esta variável mensurada com auxílio de régua graduada em milímetros. A avaliação foi realizada em duas direções opostas, sendo a média entre as duas direções considerada como sendo o diâmetro da colônia.

Com o valor do diâmetro calculou-se a área da colônia a cada avaliação, e com estes valores obteve-se a curva de progresso do crescimento micelial e calculou-se a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), conforme a equação: $AACCM = \sum [(z1+z2)/2]*7$, onde $z1$ e $z2$ refere-se a duas avaliações sucessivas da área da colônia.

Tabela 2. Isolados de leveduras testados *in vitro* quanto a produção de compostos voláteis

ISOLADOS
<i>Candida albicans</i> (AH 05-3)
<i>Candida albicans</i> (AH 09-1)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 07-1)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 19-1)
<i>Candida albicans</i> (AH 11-3)
<i>Candida albicans</i> (AH 11-2)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 07-2)
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)
<i>Candida albicans</i> (AH 10-3)
<i>Pichia pini</i> (AH 18-3)
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 18-2)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 12-1)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-4)
Isolado não identificado AH 09-2
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 02-1)
JRS Amarela
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 05-2)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)
<i>Sporobolomyces roseus</i> (AH 15-5)
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 14-2)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-1)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 01-1)
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 15-2)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 03-1)
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 20-3)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 04-1)

3.3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

A avaliação de produção de compostos não voláteis que reduzem o crescimento de colônias de *C. beticola* foi realizada com delineamento experimental em blocos casualizados (DBC) contendo 20 tratamentos (sendo 19 isolados de leveduras selecionados com base nos resultados obtidos no experimento de produção de compostos voláteis, desenvolvido previamente a este (Tabela 3), e uma testemunha, que recebeu caldo YEPG (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura) e cinco blocos para cada tratamento, totalizando 100 parcelas, cada parcela sendo representada por uma placa de Petri com uma colônia de *C. beticola*.

Tabela 3. Isolados de leveduras testados *in vitro* quanto a produção de compostos não voláteis

ISOLADOS
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-2)
Isolado não identificado AH 09-2
<i>Candida albicans</i> (AH 11-3)
<i>Candida albicans</i> (AH 11-2)
JRS Amarela
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 07-2)
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 18-2)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 12-1)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-4)
<i>Pichia pini</i> (AH 18-3)
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 05-2)
<i>Candida albicans</i> (AH 10-3)
<i>Candida albicans</i> (AH 05-3)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 02-1)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 07-1)
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 19-1)
<i>Candida albicans</i> (AH 09-1)

Previamente preparou-se os exsudatos, e para estes, cultivou-se as leveduras em caldo YEPG por um período de sete dias, mantidas sob agitação constante de

150 rpm em incubadora agitadora. Em seguida, o caldo cultivado foi centrifugado a 1400g por 2 min, recolhendo-se o sobrenadante, o qual foi esterilizado em filtro para seringa, com membrana PES 0,22 µm, esterilizada com radiação gama. Estes exsudatos filtrados foram armazenados, em tubos Falcon 15 mL, congelados a -20 °C até o momento de utilização, no qual foi descongelado em temperatura ambiente.

Em uma placa com meio BDA foram espalhados, com auxílio de uma alça de Drigalsky, 100 µL do exsudato de levedura filtrado, posteriormente, alocou-se na parte central da placa um disco com 0,5 cm de diâmetro de colônia de *C. beticola*. Estas placas ficaram armazenadas em BOD a 27 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por um período de 28 dias, sendo retiradas para avaliação a cada sete dias.

Para avaliação, procedeu-se da mesma maneira que o experimento com compostos voláteis, sendo realizada uma avaliação a cada sete dias e obtendo-se a AACCM.

3.4. AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS

3.4.1. Local e preparo dos vasos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, no período de primeiro de fevereiro de 2018 a 30 de março de 2018. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo nove tratamentos e quatro blocos, totalizando 36 parcelas. Cada parcela foi constituída de cinco vasos, contendo uma planta cada.

Utilizou-se a cultivar de beterraba Chata do Egito, cultivar esta suscetível a cercosporiose, semeada em vasos de poliestireno de 2 dm³, contendo substrato obtido por mistura homogênea de solo LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (SANTOS et al., 2018), substrato comercial para mudas e húmus de minhoca (2:1:2 v/v), com adição de 1,1 g de fertilizante formulado NPK 4-14-8 por litro de substrato.

A semeadura foi efetuada manualmente com três glomérulos por vaso, em profundidade de 2 cm. A emergência das plântulas deu-se com quatro dias após a semeadura. Quatro dias após a emergência (DAE) complementou-se a adubação com Yogen[®] (5 g L⁻¹). O desbaste foi realizado sete DAE, utilizando-se tesoura para evitar danos ao sistema radicular da planta remanescente, esta tesoura foi

previamente desinfestada com hipoclorito de sódio (2%) a fim de se evitar contaminações.

3.4.2. Cultivo, preparo das leveduras e inoculação

Os tratamentos utilizados foram células das leveduras *C. albicans*, *P. pini* e JRS Amarela, os exsudatos destas leveduras, indutor abiótico acibenzolar-S-metil uma testemunha positiva Tebuconazol + Trifloxistrobina e uma testemunha negativa (água destilada).

As leveduras foram cultivadas em caldo YEPG por sete dias, mantidas sob agitação constante de 150 rpm em incubadora agitadora. Após este período, o caldo cultivado foi centrifugado a 1400g por 2 min, as massas de células frescas foram utilizadas nos tratamentos e os sobrenadantes foram recolhidos, esterilizados em filtros para seringa com membrana PES 0,22 µm, esterilizados com radiação gama, para então estes exsudatos serem utilizados no tratamento das plantas.

As suspensões de células de leveduras foram preparadas na concentração de 10 g L⁻¹, utilizando-se da colônia fresca e de água destilada. As soluções com exsudatos foram preparadas na concentração de 10% (100 mL L⁻¹), utilizando-se o exsudato e água destilada. Acibenzolar-S-metil foi utilizado na concentração de 50 mg L⁻¹, diluído em água destilada, e fungicida (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹) na concentração de 1 mL L⁻¹ do produto comercial diluído em água destilada.

Os tratamentos foram aplicados aos 25 DAE, com o auxílio de um borrifador manual, aplicando-se em toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total da folha, evitando-se chegar ao ponto de escorrimento.

3.4.3. Cultivo e preparo de inóculo e inoculação do patógeno

A inoculação de *C. beticola* foi realizada três dias após a aplicação dos tratamentos (28 DAE). O cultivo deste patógeno foi efetuado em placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose, ágar), mantidas em BOD a 27 °C por 15 dias.

Após este cultivo, preparou-se suspensão de esporos na concentração de 10⁵ esporos mL⁻¹, que foi borrifada sobre toda parte aérea da planta com auxílio de um borrifador manual, inoculando-se toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total da folha, evitando-se chegar ao ponto de escorrimento,

posteriormente, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida por período de 36 horas.

3.4.4. Avaliações de crescimento

As avaliações foram realizadas aos 25, 32, 39, 46 e 53 DAE. As variáveis analisadas foram: número de folhas; massa seca de folha, pecíolo, hipocótilo, raiz, parte aérea e total; área foliar; produção; severidade e AACPD.

As avaliações de massa seca foram efetuadas acondicionando-se as porções vegetais em sacos de papel e levados a estufa de circulação de ar a 60 °C, até atingir massa constante, conforme recomendado por Benincasa (2003). A produção considerou-se a massa fresca do hipocótilo após a colheita.

Área foliar e severidade da doença foram avaliadas com auxílio do software Quant® v.1.0.0.22 (FERNANDES FILHO et al, 2002).

Com os valores de severidade de cercosporiose nas folhas de beterraba, no período avaliado, foi construída a curva de progresso da doença e calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme a equação: $AACPD = \sum [(y_1+y_2)/2]*7$, onde y_1 e y_2 refere-se a duas avaliações sucessivas da severidade da doença.

3.4.5. Coleta de dados ambientais

Os valores de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) foram computados a cada 30 minutos com auxílio de armazenador de dados digital, cujos valores são apresentados na Figura 3.

A temperatura média no período foi de 26,4 °C e a umidade relativa do ar de 79,3%.

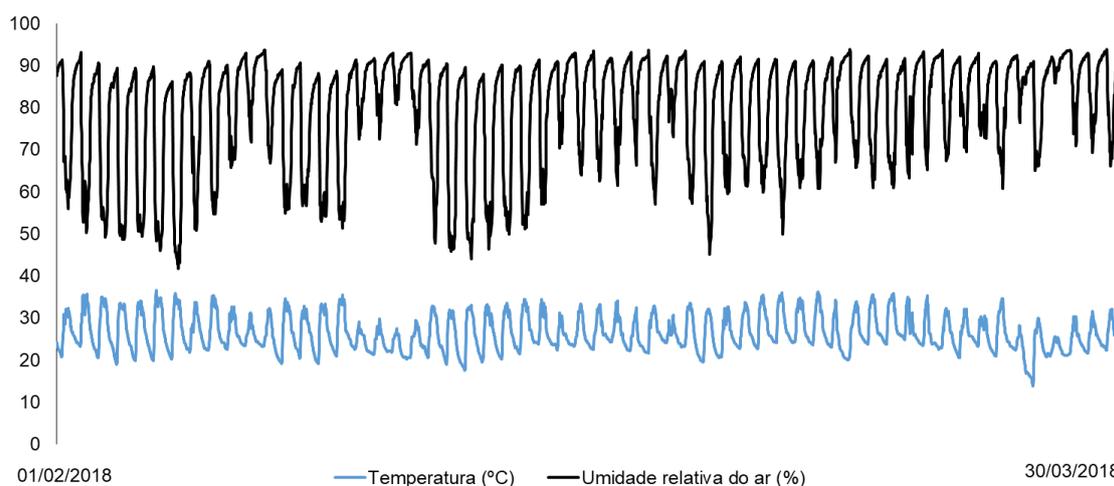


Figura 3. Valores de temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (%), na casa de vegetação, no período de 01 de fevereiro de 2018 a 30 de março de 2018.

3.5. AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.5.1. Condução das plantas, obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar

3.5.1.1. Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, no período de 08 de agosto de 2017 a 13 de outubro de 2017. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo nove tratamentos e quatro blocos, totalizando 36 parcelas. Cada parcela foi constituída de quatro vasos, contendo uma planta cada.

Utilizou-se a cultivar de beterraba Chata do Egito, cultivar esta suscetível a cercosporiose, semeada em vasos de poliestireno de 2 dm^3 , contendo substrato obtido por mistura homogênea de solo LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (SANTOS et al., 2018), substrato comercial para mudas e húmus de minhoca (2:1:2 v/v), com adição de 1,1 g de NPK 4-14-8 por litro de substrato.

A semeadura foi efetuada manualmente com três glomérulos por vaso, em profundidade de 2 cm. A emergência das plântulas deu-se com cinco dias após a semeadura. Seis dias após a emergência (DAE) complementou-se a adubação com Yogen[®] (5 g L^{-1}). O desbaste foi realizado 15 DAE, utilizando-se tesoura para evitar danos ao sistema radicular da planta remanescente, esta tesoura foi previamente desinfetada com hipoclorito de sódio (2%) a fim de se evitar contaminações.

3.5.1.2. Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram células das leveduras *C. albicans*, *P. pini* e JRS Amarela, os exsudatos destas leveduras, indutor abiótico acibenzolar-S-metil uma testemunha positiva Tebuconazol + Trifloxistrobina e uma testemunha negativa (água destilada).

As leveduras foram cultivadas em caldo YEPG (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura) por um período de sete dias, mantidas sob agitação constante de 150 rpm em incubadora agitadora. Após este período, o caldo cultivado foi centrifugado a 1400g por 2 min, as massas de células frescas foram utilizadas nos tratamentos e os sobrenadantes foram recolhidos, esterilizados em filtros para seringa com membrana PES 0,22 µm, esterilizadas com radiação gama, para então estes exsudatos serem utilizados no tratamento das plantas.

As suspensões de células de leveduras foram preparadas na concentração de 10 g L⁻¹, utilizando-se da colônia fresca e de água destilada. As soluções com exsudatos foram preparadas na concentração de 10% (100 mL L⁻¹), utilizando-se o exsudato e água destilada. Acibenzolar-S-metil foi utilizado na concentração de 50 mg L⁻¹, diluído em água destilada, e fungicida (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹) na concentração de 1 mL L⁻¹ do produto comercial diluído em água destilada.

Os tratamentos foram aplicados aos 31 DAE, com o auxílio de um borrifador manual, aplicando-se em toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total da folha, evitando-se chegar ao ponto de escorrimento.

3.5.1.3. Inoculação

A inoculação de *C. beticola* foi realizada três dias após a aplicação dos tratamentos (34 DAE). O cultivo deste patógeno foi efetuado em placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose, ágar), mantidas em BOD a 27 °C por 15 dias. Após este cultivo, preparou-se suspensão de esporos na concentração de 10⁵ esporos mL⁻¹, esta suspensão de esporos foi borrifada sobre toda parte aérea da planta com auxílio de um borrifador manual, inoculando-se toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total da folha, evitando-se chegar ao ponto de escorrimento, posteriormente, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida por período de 36 horas.

3.5.1.4. Coleta de tecido foliar

A coleta do tecido foliar para as análises bioquímicas foi realizado no dia do tratamento, três dias após o tratamento (DAT) e seis DAT.

Após a coleta dos tecidos foliares, estes foram devidamente pesados, embalados em papel alumínio e identificados, na sequência acondicionados em caixa de isopor contendo gelo e transportados imediatamente para o Laboratório de Fitopatologia onde foram armazenados em congelador em temperatura de -20°C , posteriormente, destes folíolos foram obtidos os extratos proteicos.

3.5.1.5. Avaliação de doença

Para complementar, aos 34, 43, 52 e 61 avaliou-se a severidade da doença, com auxílio do software Quant[®] v.1.0.0.22 (FERNANDES FILHO et al, 2002). Com os valores de severidade de cercosporiose nas folhas de beterraba, no período avaliado, foi construída a curva de progresso da doença e calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme a equação:

$$\text{AACPD} = \sum [(y_1+y_2)/2]*9$$

Onde y_1 e y_2 refere-se a duas avaliações sucessivas da severidade da doença.

Os valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (%) foram computados a cada 30 minutos com auxílio de armazenador de dados digital, cujos valores são apresentados na Figura 4. A temperatura média no período foi de $23,4^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa do ar de 73,6%.

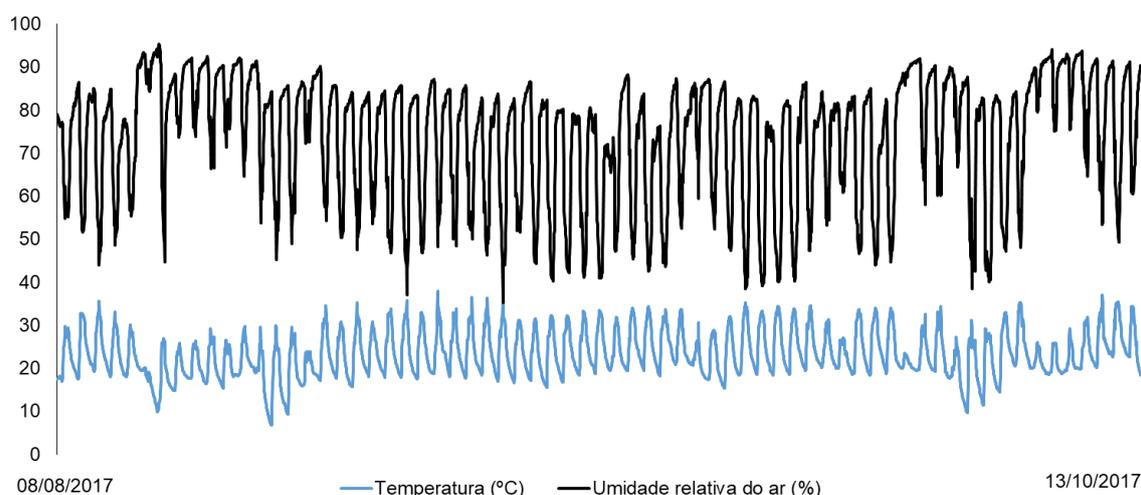


Figura 4. Valores de temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (%), na casa de vegetação, no período de 08 de agosto de 2017 a 13 de outubro de 2017.

3.5.2. Obtenção do extrato metanólico

Para obtenção do extrato metanólico para determinação de fenóis totais e lignina, as amostras de tecido foliar congelados foram homogeneizadas mecanicamente em 1,5 mL de metanol 80%, com o auxílio de almofariz de porcelana previamente resfriada. O conteúdo do almofariz foi transferido para microtubos de 2 mL (tipo eppendorf) e a extração desenvolvida sob agitação constante por 15 horas em agitador rotativo, protegido da luz e em temperatura ambiente.

O extrato metanólico foi centrifugado a 12.000g por 5 min e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 2 mL. O resíduo foi utilizado para determinação de lignina e o sobrenadante para fenóis totais.

3.5.3. Obtenção do extrato proteico

Para obtenção dos extratos proteicos para as demais avaliações, as amostras de tecido foliar congelados foram homogeneizadas mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), com o auxílio de nitrogênio líquido e almofariz de porcelana previamente resfriada.

O homogenato foi centrifugado a 20.000g durante 20 minutos a 4 °C, sendo que o sobrenadante obtido foi considerado como extrato enzimático. Este extrato enzimático foi armazenado em tubos eppendorfs.

Este extrato enzimático foi congelado a -20 °C e posteriormente utilizado para a determinação de proteínas totais, atividade de peroxidases, atividade de β -1,3-glucanases e atividades de fenilalanina amônia-liase, sendo que sempre antes destas avaliações o extrato proteico era descongelado em caixa de isopor contendo gelo (KUHN, 2007).

3.5.4. Fenóis totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pipetando-se 150 μ L do extrato metanólico, misturando-se 150 μ L do reagente Folin-Ciocalteau 0,25N e mantido em temperatura ambiente por 5 min, adicionando-se então 150 μ L de Na_2CO_3 1M, sendo homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 10 min.

A mistura então foi homogeneizada com 1,0 mL de Água destilada e mantida em temperatura ambiente por uma hora. A absorbância da reação foi lida em espectrofotômetro a 725 nm.

Os valores de absorbância foram calculados com base em curva de catecol ($y = 0,0017x + 0,0368$, onde “y” é a absorbância a 725 nm e “x” a concentração de fenóis) (Figura 5) e os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de catecol g^{-1} de tecido fresco (RODRIGUES et al., 2005).

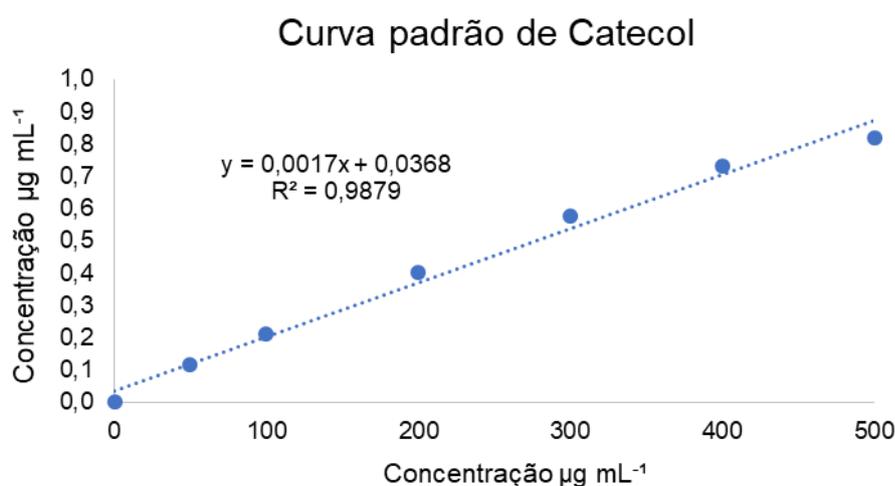


Figura 5. Curva padrão de catecol

3.5.5. Lignina

A determinação de lignina foi realizada adicionando-se 1,5 mL de água destilada ao resíduo proveniente da centrifugação do extrato metanólico, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo seco a 65 °C por 24 horas.

O resíduo seco insolúvel em álcool, contendo lignina e ácidos fenólicos esterificados da parede celular, foi utilizado para determinação de lignina, conforme metodologia de Barber e Ride (1988).

Para tanto, 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e ácido clorídrico 2M, na proporção de 1:10, foi adicionada ao resíduo. Os microtubos foram levemente agitados para hidratar o resíduo e então levados a banho-maria a 100 °C por 4 horas.

Após este período os microtubos foram colocados em gelo para resfriarem rapidamente por 10 min e então centrifugados a 12.000g por 10 min. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água destilada e novamente centrifugada a 10.000g por 10 min.

Após isto, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M, sendo a mistura agitada em agitador rotativo por 18 horas em temperatura ambiente.

A mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min e o sobrenadante foi transferido para outro microtubos e neste adicionado 200 μ L de HCl concentrado ao sobrenadante e mantido em câmara fria (4 °C) por quatro horas para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de NaOH 0,5 M.

A absorbância desta solução foi determinada a 280 nm e os valores calculados com base na curva padrão de lignina ($y = 0,0112x + 0,0136$, onde “y” é a absorbância a 280 nm e “x” a concentração de lignina) (Figura 6), sendo expressos em mg de lignina por grama de tecido fresco (RODRIGUES et al., 2005).

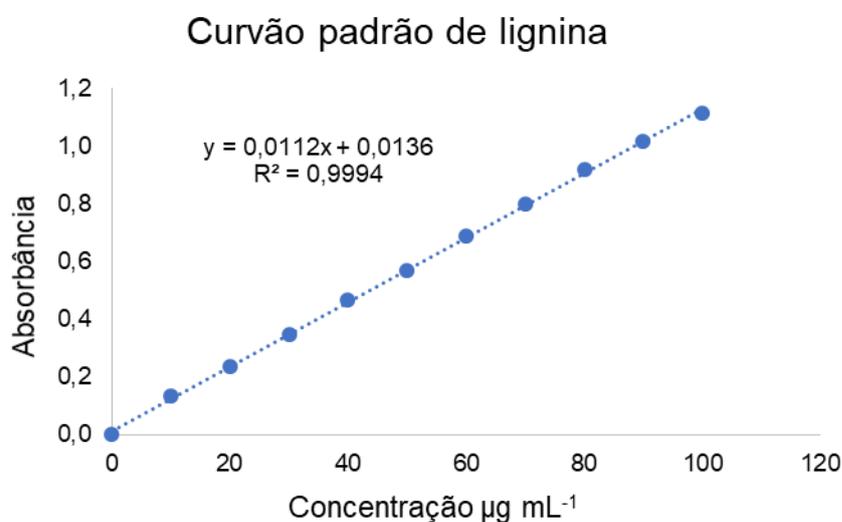


Figura 6. Curva padrão de lignina

3.5.6. Proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), sendo que para cada amostra se utilizou 750 μ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 20 μ L de extrato proteico e 200 μ L de reagente Bradford (composto pó 250 mg de corante Comassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 125 mL de água destilada).

O reagente Bradford foi adicionado sob agitação e posteriormente às amostras foram incubadas por 5 min, então se efetuou a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

Cada amostra foi composta por três réplicas. Na prova em branco, utilizada para calibração do espectrofotômetro, se utilizou 770 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL de reagente Bradford.

A absorbância foi plotada em curva padrão para proteínas ($y = 0,0279x + 0,0101$, onde “y” é a absorbância a 595 nm e “x” a concentração de proteína (µg)) (Figura 7).

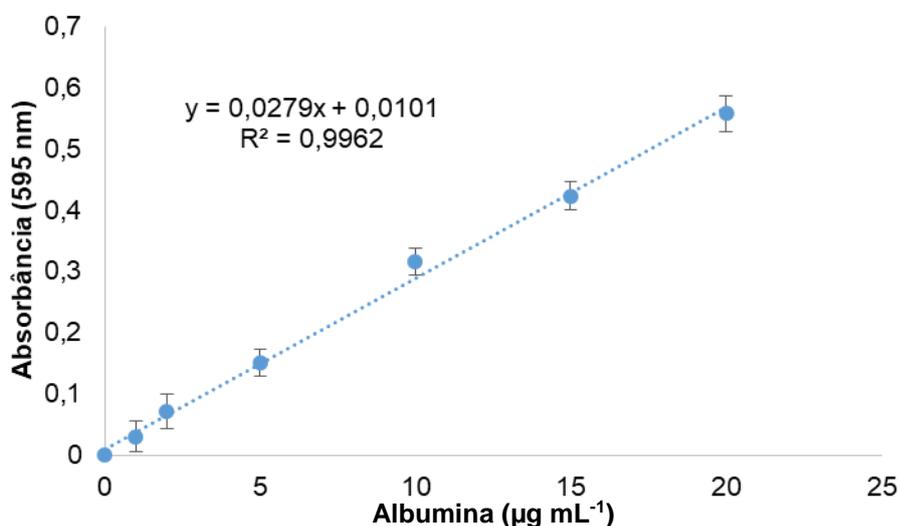


Figura 7. Curva padrão para proteínas

3.5.7. Atividade de peroxidases

A determinação da atividade de peroxidases foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (HAMMERSCHMIDT et al., 1982).

A mistura da reação foi composta de 1,4 mL de substrato composto pela mistura de 12,5 mL de guaiacol (2%) e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 0,1 mL de extrato proteico.

A cubeta de referência continha 1,5 mL do substrato contendo 12,5 mL de guaiacol (2%) e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0).

A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm pelo período de 2 min, anotando-se a absorbância a cada 15 segundo, sendo a atividade expressa como atividade específica (unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína).

3.5.8. Atividades de β -1,3-glucanases

A determinação de β -1,3-glucanases foi realizada conforme a metodologia de Stangarlin, Pascholati e Labate (2000) adaptada de Abeles e Forrence (1970).

Para tanto as amostras foram preparadas com 100 μL de extrato proteico, 50 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 150 μL de laminarina na concentração de 2 mg mL^{-1} . O controle foi composto por 100 μL de extrato enzimático e 50 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A prova em branco foi constituída de 150 μL de laminarina e de 150 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0).

As soluções (amostra, controle e prova em branco) foram deixadas em banho-maria a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, em seguida se adicionou 150 μL de laminarina no controle, então 30 μL das soluções foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 1,5 mL de PAHBAH (0,5%).

Deixou-se os tubos de ensaio em banho-maria a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min, em seguida estes foram resfriados no gelo, para realizar-se a leitura em espectrofotômetro

O espectrofotômetro foi previamente calibrado com a prova em branco. A atividade de β -1,3-glucanase constituiu na diferença ente a média de absorbância das duplicatas da mistura contendo amostra e do controle.

Sendo então plotadas na curva padrão para glicose ($y = 0,002x + 0,0046$, onde “y” é a absorbância a 410 nm e “x” a concentração de açúcares redutores (μg)) (Figura 8) e expressa em equivalente μg de glicose por minuto por mg de proteína.

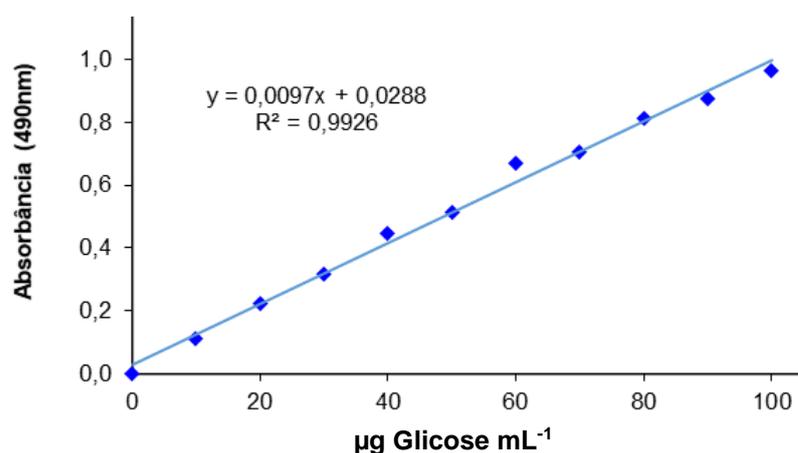


Figura 8. Curva padrão para glicose

3.5.9. Atividades de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006).

A mistura da reação, incubada 40 °C por duas horas, continha 100 µL do extrato proteico, 400 µL do tampão Tris-HCL (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris-HCl, pH 8,8).

O controle correspondia a uma mistura 100 µL do extrato proteico e 900 µL de tampão Tris-HCl (pH 8,8). A prova em branco constituía-se apenas do tampão de extração.

A absorbância da amostra foi determinada em espectrofotômetro a 290 nm, contra a prova em branco, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle.

As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico ($y = 0,1141x - 0,0476$, onde “y” é a absorbância a 290 nm e “x” a concentração de ácido *trans*-cinâmico) (Figura 9) e a atividade enzimática expressa em µg de ácido *trans*-cinâmico min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

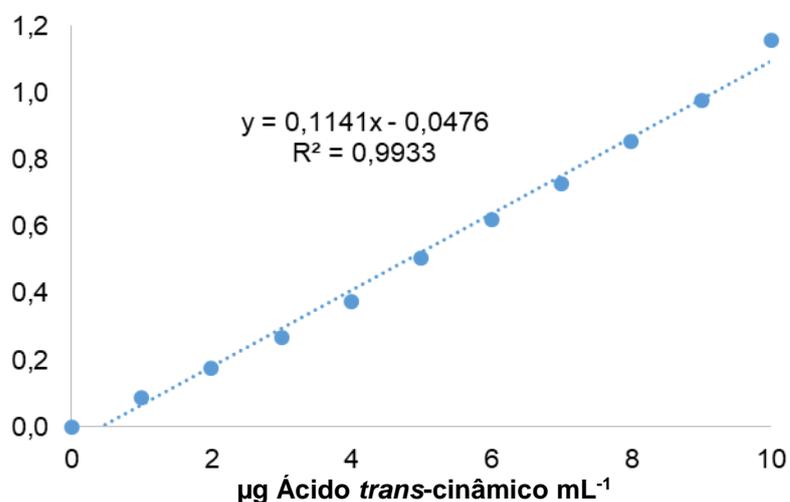


Figura 9. Curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os testes de seleção em casa de vegetação, produção de compostos voláteis e produção de compostos não voláteis, os resultados obtidos foram submetidos a análise de discrepância, posteriormente, submetidos a análise de variância e agrupadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Na avaliação de crescimento das plantas, os resultados obtidos foram submetidos a análise de discrepância e teste Q, posteriormente, submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância.

Com relação as avaliações bioquímicas, após os dados serem plotados nas respectivas curvas padrão e tabulados, estes submetidos a análise de discrepância e teste Q, posteriormente, submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Com a avaliação de seleção em casa de vegetação foi possível dividir os isolados de leveduras em três grupos, de acordo com a AACPD apresentada pelos mesmos (Tabela 4).

Tabela 4. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cercosporiose (*Cercospora beticola*) de plantas de beterraba tratadas com isolados de leveduras

ISOLADOS	AACPD
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 02-1	7,54 a*
<i>Candida albicans</i> (AH 11-2)	8,31 a
<i>Candida albicans</i> (AH 11-3)	8,96 a
<i>Candida albicans</i> (AH 10-3)	9,94 a
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	10,16 a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 07-1)	11,93 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	12,01 a
JRS Amarela	12,55 a
<i>Candida albicans</i> (AH 05-3)	14,34 a
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 18-2)	14,46 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	15,25 a
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	15,36 a
Isolado não identificado AH 09-2	15,50 a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 01-1)	15,60 a
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	16,12 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-4)	16,37 a
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 14-2)	16,68 a
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 15-2)	16,80 a
<i>Pichia pini</i> (AH 18-3)	17,21 a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 03-1)	17,28 a
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 20-3)	17,41 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 12-1)	17,58 a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-1)	18,82 a
<i>Sporobolomyces roseus</i> (AH 15-5)	19,29 a
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 19-1)	21,54 a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-2)	21,86 a

Continua...

Continuação...

<i>Candida albicans</i> (AH 09-1)	22,23	a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22,95	a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 07-2)	23,28	a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 04-1)	23,32	a
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 05-2)	24,11	a
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 19-2)	27,01	b
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 19-3)	27,13	b
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 12-3)	27,97	b
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 18-1)	28,54	b
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-1)	28,73	b
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 17-3)	28,87	b
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 17-4)	29,32	b
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-4)	29,81	b
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 15-1)	30,91	b
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 16-1)	32,42	b
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-1)	37,89	c
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3)	40,67	c
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 15-4)	40,95	c
Água destilada	43,11	c
CV (%)	36,31	
Média Geral	21,29	

* Agrupamento realizado com base no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

O tratamento testemunha, o qual recebeu apenas água destilada, foi agrupado no grupo “c”, logo os demais tratamentos que se encontram neste grupo também não apresentaram efeito positivo no controle da cercosporiose.

Os tratamentos agrupados no grupo “b” apresentaram reduções na AACPD que variaram de 24,8%, para o isolado de *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1), até 37,3%, para o isolado de *S. johnsonii* (AH 19-2). Os isolados de leveduras compreendidos neste grupo apresentaram uma redução significativa da AACPD, no entanto, foram selecionados apenas os isolados contidos no grupo “a” para a próxima etapa de avaliação, que trata-se da avaliação da produção de compostos voláteis com efeito na redução da AACCM, onde apenas os isolados do grupo “a” foram avaliados.

Todos os isolados compreendidos no grupo “a” foram selecionados para avaliação da produção de compostos voláteis com efeito na redução da AACCM.

Este grupo foi composto por 31 isolados de leveduras, sendo estes isolados pertencentes a oito gêneros e dez espécies. Este grupo apresentou redução da AACPD que variou de 44,1%, para o isolado de *Rhodotorula aurantiaca* (AH 05-2), até 82,5%, para o isolado de *Cryptococcus laurentii* (AH 02-1).

Outros estudos também apontam que a levedura *C. laurentii* é um promissor agente de controle de doenças em diversas espécies vegetais. Zhang et al. (2017) observaram que esta levedura pode reduzir a incidência e severidade de *Penicillium expansum* em frutos de pêsego, em 35% e 50%, respectivamente, após o período de cinco dias. Zeng et al. (2015) concluíram que a adição de β -glucano no meio de cultivo desta espécie de levedura eleva em até 80% a eficiência desta no controle de *P. expansum* em frutos de pera. Lai et al. (2018) observaram que tomates cereja quando tratados com esta levedura apresentam redução de 38% na incidência de *Botrytis cinerea* e 50% na incidência de *Alternaria alternata*.

Além deste, outras espécies de leveduras apresentam eficiência no controle de doenças de plantas. Machado (2018) concluiu que a aplicação da levedura *Sporobolomyces koalae*, em frutos de tangor Murcott, se mostrou eficiente no controle da podridão azeda dos frutos (*Geotrichum citri-aurantii*), quando o tratamento foi aplicado de forma preventiva, reduzindo em 30% a AACPD.

França et al. (2015) observaram que a utilização de *R. glutinis* é eficiente no controle da antracnose do pimentão, reduzindo em 34% o diâmetro da lesão nos frutos, além de tratar-se de uma alternativa promissora, uma vez que seu uso pode prevenir o aparecimento de resistência de fungos fitopatogênicos a fungicidas sintéticos.

4.2. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Os isolados avaliados quanto a produção de compostos voláteis com potencial de redução da área de colônia de *C. beticola* foram agrupados em quatro grupos, conforme Tabela 5, sendo classificado no grupo “d” a testemunha e o isolado de *Cryptococcus laurentii* (AH 04-1), este portanto, não apresentou a produção de compostos voláteis que ocasionam a redução do crescimento de colônias do patógeno.

Tabela 5. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de colônias de *Cercospora beticola*, submetidas ao teste de compostos voláteis, produzidos por isolados de leveduras

ISOLADOS	AACCM	
<i>Candida albicans</i> (AH 05-3)	15,00	a*
<i>Candida albicans</i> (AH 09-1)	25,02	a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 07-1)	40,80	a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	41,10	a
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 19-1)	50,67	a
<i>Candida albicans</i> (AH 11-3)	51,16	a
<i>Candida albicans</i> (AH 11-2)	54,67	a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 07-2)	56,94	a
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	64,67	a
<i>Candida albicans</i> (AH 10-3)	69,56	a
<i>Pichia pini</i> (AH 18-3)	73,53	a
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 18-2)	73,99	a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 12-1)	74,19	a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-4)	75,19	a
Isolado não identificado AH 09-2	77,60	a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 02-1)	84,31	a
JRS Amarela	84,38	a
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 05-2)	85,75	a
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-2)	90,76	a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100,84	b
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	103,89	b
<i>Sporobolomyces roseus</i> (AH 15-5)	104,65	b
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 14-2)	106,55	b
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-1)	107,18	b
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 01-1)	114,32	b
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	133,29	b
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	137,48	b
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 15-2)	155,36	b
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 03-1)	158,93	b
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 20-3)	188,62	c
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 04-1)	278,78	d
CV (%)	46,32	
Média Geral	99,48	

* Agrupamento realizado com base no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

O isolado *Sporidiobolus johnsonii* (AH 20-3) foi o único a ser agrupado no grupo “c”, este apresentou uma redução de 39,5% na AACCM.

No grupo “b” foram agrupados 10 isolados de leveduras, sendo estes, pertencentes a seis gêneros e sete espécies de leveduras. A redução da AACCM variou de 49,0%, para o isolado *C. laurentii* (AH 03-1), até 67,6%, para o tratamento com *S. cerevisiae*.

O grupo “a” foi composto por 19 isolados de leveduras, sendo estes isolados pertencentes a cinco gêneros e sete espécies. Este grupo apresentou redução da AACCM que variou de 70,9%, para o isolado de *C. laurentii* (AH 17-2), até 95,2%, para o isolado de *Candida albicans* (AH 05-3).

Considerando-se o fato de que busca-se selecionar isolados com maior quantidades de modos de atuação, que atuem tanto na competição, como na ação direta pela produção de compostos voláteis e não voláteis e na indução de resistência, deste modo, todos os isolados compreendidos no grupo “a” foram selecionados para avaliação da produção de compostos não voláteis com efeito na redução da AACCM.

Estes resultados corroboram com o trabalho de Fujimoto (2017), onde se constatou que a levedura *C. albicans* (AH 11-2) apresenta alto potencial na produção de compostos voláteis, que no estudo em questão reduziram o número de colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em 92,9%.

No entanto, o gênero *Candida* está relacionado ao desenvolvimento de candidíase vulvovaginal em humanos, uma infecção da vulva e da vagina, onde a espécie *C. albicans* é a mais comum, como foi reportada em estudo por Holanda et al. (2007).

Deste modo, o uso desta espécie em cultivos de alimentos que podem ser consumidos *in natura*, como é o caso da beterraba, não seria adequado, porém, esta espécie merece maiores estudos no que se refere a produção de compostos voláteis antipatogênicos, sendo que estes podem ser empregados no controle de doenças de plantas sem o uso direto da levedura patogênica a humanos, deste modo, sendo seguro o consumo *in natura* dos alimentos tratados com estes.

Os compostos orgânicos voláteis produzidos pelas leveduras são, principalmente álcoois e ésteres (FIALHO et al., 2010), sendo os dois principais compostos voláteis produzidos por leveduras o 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol (TOFFANO, 2010). Estes compostos ocasionam no patógeno a redução da

síntese de proteínas e a redução da atividade de enzimas envolvidas na morfogênese, além de que a exposição aos voláteis desencadeia processos de estresse oxidativo (FIALHO et al., 2010).

Além destes, as leveduras também são produtoras de ácido-indol-acético (IAA). O IAA produzido por levedura está envolvido na competição entre as leveduras, mas também promove o crescimento e desenvolvimento das plantas habitadas por estas (FU et al., 2017).

Além disto, as leveduras apresentam grande interação com as plantas e seus respectivos polinizadores. O néctar floral oferece um nicho que serve como habitat para diversos microrganismos, como as leveduras. Assim estes microrganismos podem afetar seu ambiente alterando a química do néctar, o cheiro, a temperatura da flor e, como resultado, até mesmo o comportamento dos polinizadores (HAUSMANN, 2019).

Estes compostos podem ser eliciadores, desencadeando o processo de indução de resistência das plantas a patógenos, deste modo, o estudo mais aprofundado destes compostos é de grande importância, podendo nestes estar presente um eliciador que pode dar origem a um indutor.

As leveduras estão associadas a processos fermentativos, sendo encontradas em substratos contendo açúcares, logo, devido a síntese de açúcares simples, polissacarídeos e outros compostos de carbonos, produtos estes oriundos da fotossíntese, o tecido vegetal torna-se ótimos habitat para leveduras (SPERANDIO, 2012). Consequentemente, o tecido vegetal ocupado por leveduras oferece maior resistência ao ataque de patógenos, seja pela ocupação dos espaços no tecido, seja pelo controle biológico promovido pelas leveduras, ou ainda pela indução de resistência das plantas hospedeiras aos patógenos.

4.3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Os isolados avaliados quanto a produção de compostos não voláteis com potencial de redução da área de colônia de *C. beticola* foram agrupados em dois grupos, conforme Tabela 6, sendo classificado no grupo “b” a testemunha e nove isolados, pertencentes a cinco gêneros e seis espécies, portanto, estes não apresentaram produção de compostos não voláteis que ocasionam a redução do crescimento de colônias do patógeno.

Tabela 6. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de colônias de *Cercospora beticola*, submetidas ao teste de compostos não voláteis, produzidos por isolados de leveduras

ISOLADOS	AACCM
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-2)	168,76 a*
Isolado não identificado AH 09-2	173,16 a
<i>Candida albicans</i> (AH 11-3)	185,90 a
<i>Candida albicans</i> (AH 11-2)	192,96 a
JRS Amarela	208,80 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 07-2)	213,21 a
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 18-2)	224,01 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 12-1)	225,87 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	233,28 a
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	237,16 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-4)	277,72 b
<i>Pichia pini</i> (AH 18-3)	279,44 b
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 05-2)	280,18 b
<i>Candida albicans</i> (AH 10-3)	283,10 b
<i>Candida albicans</i> (AH 05-3)	293,55 b
Água destilada	313,54 b
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 02-1)	336,56 b
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 07-1)	341,70 b
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 19-1)	342,14 b
<i>Candida albicans</i> (AH 09-1)	363,28 b
CV (%)	24,65
Média Geral	257,16

* Agrupamento realizado com base no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Dez isolados ficaram compreendidos no grupo “a”, portanto, apresentam a produção de compostos não voláteis com efeito na redução da AACCM de *C. beticola*. Estes isolados pertencentes a quatro gêneros e cinco espécies, os quais apresentaram redução da AACCM que variou de 24,4%, para o isolado *Pichia pini* (AH 15-3), até 46,2%, para o isolado *C. laurentii* (AH 17-2). Além destas duas, as espécies *C. albicans*, *Zygoascus hellenicus* e *Pichia guilliermondii* também foram classificadas neste grupo “a”.

Estes quatro gêneros já são estudados como agentes de controle de doenças de plantas, como já relatado anteriormente para os gêneros *Cryptococcus* e *Candida*.

Conforme Lahlali et al. (2014) a espécie *P. guilliermondii* é eficaz no controle do bolor azul dos citros, causado por *P. italicum*, podendo reduzir em até 75% as infecções dos frutos. De acordo com Zhao e Yin (2018) esta levedura em associação com ar quente apresentou controle total sobre *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Colletotrichum gloeosporioides* em pós-colheita da maçã Fuji.

A denominação *Zygoascus* refere-se a fase sexual (Teleomórfica) desta levedura e *Candida* refere-se a fase assexual (Anamórfica) (SMITH, 1986). Conforme Fujimoto (2017) o tratamento de plantas de repolho com *Zygoascus hellenicus* apresenta redução da severidade de podridão negra das crucíferas.

Leveduras apresentam capacidade de sintetizar compostos antibióticos (PICCININ et al., 2005), estes compostos antibióticos podem ser empregados no controle biológico de doenças de plantas, ou ainda, podem ser sintetizados para o desenvolvimento de novas substâncias antibióticas.

4.4. ANÁLISE DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS

Para avaliação de crescimento das plantas, selecionou-se as três espécies com melhor desempenho no teste em casa de vegetação e que foram classificadas no grupo “a” nos testes de produção de compostos voláteis e produção de compostos não voláteis com potencial de inibição de desenvolvimento de *C. beticola*. Além destes foram adicionados como referência os tratamentos Acibenzolar-S-metil, água destilada e fungicida.

O número de folhas (Tabela 7) apresentou variação apenas aos 14 DAT, onde o tratamento com filtrado de cultura de *Candida albicans* apresentou maior número de folhas (11,25 folhas) em relação ao tratamento com acibenzolar-S-metil (6,5 folhas), nas avaliações anteriores e posteriores não houve diferença.

A massa seca de folhas (Tabela 8) apresentou diferença apenas na última avaliação (28 DAT), onde os tratamentos com células de JRS Amarela e acibenzolar-S-metil apresentaram redução de 43,2% e 37,6%, respectivamente.

Tabela 7. Número de folhas de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle da *Cercospora beticola*

Tratamento	0 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
Células <i>Candida albicans</i>		9,25 ^{NS}	9,50 ^{ab}	7,50 ^{NS}	7,25 ^{NS}
Filtrados <i>Candida albicans</i>		8,25	11,25 ^a	9,75	8,75
Células <i>Pichia pini</i>		8,75	8,50 ^{ab}	7,25	6,50
Filtrados <i>Pichia pini</i>		9,25	8,25 ^{ab}	7,75	8,25
Células JRS Amarela		8,75	9,00 ^{ab}	9,00	7,25
Filtrados JRS Amarela		7,00	8,75 ^{ab}	8,25	8,75
Água destilada	5,25	8,25	8,50 ^{ab}	8,75	8,00
Fungicida*		7,75	8,75 ^{ab}	9,50	9,50
Acibenzolar-S-metil		7,50	6,50 ^b	9,00	8,00
CV (%)		16,08	14,89	17,21	20,74
Média Geral	5,25	8,31	8,78	8,53	8,03

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Tabela 8. Massa seca (g) de folhas de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de *Cercospora beticola*

Tratamento	0 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
Células <i>Candida albicans</i>		2,47 ^{NS}	3,75 ^{NS}	3,12 ^{NS}	2,46 ^{abcd}
Filtrados <i>Candida albicans</i>		2,60	3,18	2,86	2,62 ^{abc}
Células <i>Pichia pini</i>		2,00	3,15	3,02	1,96 ^{bcd}
Filtrados <i>Pichia pini</i>		2,33	2,75	3,27	2,44 ^{abcd}
Células JRS Amarela		2,29	2,85	2,71	1,54 ^d
Filtrados JRS Amarela		1,88	3,21	2,83	2,47 ^{abcd}
Água destilada	0,96	1,91	3,04	3,97	2,71 ^{ab}
Fungicida*		2,15	3,65	3,59	3,04 ^a
Acibenzolar-S-metil		1,65	2,22	2,42	1,69 ^{cd}
CV (%)		26,83	21,70	21,62	16,85
Média Geral	0,96	2,14	3,09	3,09	2,32

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Nenhum tratamento apresentou alteração da massa seca de pecíolo (Tabela 9) em relação a testemunha, no entanto, ao 14 DAT o tratamento com acibenzolar-S-metil apresentou massa seca de pecíolo 35,0%, 36,1% e 39,8% menor que os

tratamentos com Células *C. albicans*, filtrado de *P. pini* e Fungicida, respectivamente. Já nas avaliações com 21 DAT e 28 DAT essa redução foi observada apenas em relação ao tratamento fungicida, em que o tratamento com acibenzolar-S-metil reduziu em 40,6% e 33,2%, respectivamente, a massa seca dos pecíolos.

Tabela 9. Massa seca de pecíolos (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de *Cercospora beticola*

Tratamento	0 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
Células <i>Candida albicans</i>		1,17 ^{NS}	2,40 a	2,24 ab	2,29 ab
Filtrados <i>Candida albicans</i>		1,23	2,34 ab	1,85 ab	2,09 ab
Células <i>Pichia pini</i>		1,02	2,22 ab	2,21 ab	1,81 ab
Filtrados <i>Pichia pini</i>		1,12	2,44 a	1,95 ab	2,23 ab
Células JRS Amarela		1,21	2,31 ab	2,08 ab	1,96 ab
Filtrados JRS Amarela		1,00	2,05 ab	2,05 ab	1,96 ab
Água destilada	0,34	1,32	2,00 ab	2,15 ab	2,22 ab
Fungicida*		0,90	2,59 a	2,78 a	2,65 a
Acibenzolar-S-metil		0,89	1,56 b	1,65 b	1,77 b
CV (%)		27,75	15,24	19,04	16,67
Média Geral	0,34	1,10	2,21	2,11	2,11

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

A massa seca do hipocótilo (Tabela 10) apresentou apenas duas variações pontuais. Aos 14 DAT o tratamento com células *C. albicans* apresentou elevação de 71,1%, e aos 28 DAT o tratamento com acibenzolar-S-metil reduziu em 47,1% a massa seca do hipocótilo em relação ao tratamento testemunha.

Quando analisamos a massa seca de parte aérea (Tabela 11) observamos que apenas aos 28 DAT o tratamento com acibenzolar-S-metil reduziu em 41,1% a massa seca de parte aérea.

A massa seca de raiz (Tabela 12) também só sofreu alteração aos 28 DAT, onde o tratamento com células de JRS Amarela e acibenzolar-S-metil reduziram em 52,4% e 45,6%, respectivamente, quando comparados com o tratamento testemunha.

Tabela 10. Massa seca de hipocótilos (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de *Cercospora beticola*

Tratamento	0 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
Células <i>Candida albicans</i>		0,97 ^{NS}	4,50 ^a	7,68 ^{NS}	9,73 ^a
Filtrados <i>Candida albicans</i>		1,20	3,53 ^{ab}	6,86	10,18 ^a
Células <i>Pichia pini</i>		0,89	3,25 ^{ab}	7,43	8,64 ^{ab}
Filtrados <i>Pichia pini</i>		0,79	2,34 ^b	7,52	8,18 ^{ab}
Células JRS Amarela		0,92	3,07 ^{ab}	6,08	6,85 ^{ab}
Filtrados JRS Amarela		0,85	2,48 ^b	5,78	9,58 ^a
Água destilada	0,14	0,97	2,63 ^b	5,35	9,52 ^a
Fungicida*		0,84	3,20 ^{ab}	6,60	8,99 ^{ab}
Acibenzolar-S-metil		1,13	3,10 ^{ab}	4,98	5,04 ^b
CV (%)		33,03	24,42	19,19,	19,57
Média Geral	0,14	0,95	3,12	6,48	8,52

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Tabela 11. Massa seca de parte aérea (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de *Cercospora beticola*

Tratamento	0 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
Células <i>Candida albicans</i>		4,61 ^{NS}	10,65 ^a	13,03 ^{NS}	14,47 ^{ab}
Filtrados <i>Candida albicans</i>		5,02	9,04 ^{ab}	11,57	14,89 ^a
Células <i>Pichia pini</i>		3,92	8,62 ^{ab}	12,65	12,41 ^{abc}
Filtrados <i>Pichia pini</i>		4,24	7,53 ^{ab}	12,74	12,84 ^{ab}
Células JRS Amarela		4,42	8,22 ^{ab}	10,88	10,34 ^{bc}
Filtrados JRS Amarela		3,73	7,72 ^{ab}	10,67	14,01 ^{ab}
Água destilada	1,43	4,20	7,66 ^{ab}	11,47	14,44 ^{ab}
Fungicida*		3,89	9,44 ^{ab}	12,96	14,67 ^a
Acibenzolar-S-metil		3,67	6,88 ^b	9,03	8,50 ^c
CV (%)		22,21	16,83	14,86	13,90
Média Geral	1,43	4,19	8,42	11,67	12,95

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Quanto a área foliar (Tabela 13), nenhum tratamento diferiu da testemunha, no entanto aos 28 DAT o tratamento com fungicida apresentou área foliar 101,1%, 77,5% e 83,1% maior que os tratamentos com células de *P. pini*, JRS Amarela e acibenzolar-S-metil, respectivamente.

Tabela 12. Massa seca de raiz (g) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de *Cercospora beticola*

Tratamento	0 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
Células <i>Candida albicans</i>		0,14 ^{NS}	0,46 ^{NS}	0,84 ^{NS}	1,17 ab
Filtrados <i>Candida albicans</i>		0,24	0,42	0,71	0,62 cde
Células <i>Pichia pini</i>		0,24	0,54	0,99	0,83 abcde
Filtrados <i>Pichia pini</i>		0,21	0,47	0,72	1,26 a
Células JRS Amarela		0,27	0,64	0,71	0,49 e
Filtrados JRS Amarela		0,23	0,59	0,99	0,94 abcd
Água destilada	0,12	0,14	0,53	0,74	1,03 abc
Fungicida*		0,20	0,38	0,85	0,81 bcde
Acibenzolar-S-metil		0,18	0,45	0,57	0,56 de
CV (%)		33,57	34,66	34,78	21,40
Média Geral	0,12	0,21	0,50	0,79	0,86

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Tabela 13. Área foliar (cm²) de beterrabas, submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de *Cercospora beticola*

Tratamento	0 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
Células <i>Candida albicans</i>		1137,61 ns	1562,38 ns	892,59 ns	859,46 ab
Filtrados <i>Candida albicans</i>		1038,12	1170,71	870,61	814,46 ab
Células <i>Pichia pini</i>		949,34	1362,39	917,94	565,75 b
Filtrados <i>Pichia pini</i>		946,71	1183,27	1049,99	943,15 ab
Células JRS Amarela		1108,65	1247,63	903,71	640,85 b
Filtrados JRS Amarela		920,59	1304,08	943,93	1016,72 ab
Água destilada	279,37	955,56	1279,25	1124,99	1003,96 ab
Fungicida		749,41	1229,61	1073,97	1137,65 a
Acibenzolar-S-metil		725,76	983,84	611,43	621,21 b
CV (%)		25,58	20,49	25,93	23,86
Média Geral	279,37	947,97	1258,13	932,13	844,80

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Ao analisarmos a severidade final (Tabela 14) observamos que, apenas os tratamentos com células *C. albicans* e filtrado de cultura de *C. albicans* não apresentaram redução da severidade final de cercosporiose, sendo que as maiores reduções ocorreram nos tratamento com acibenzolar-S-metil e (Tebuconazol

(Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹), estes apresentaram redução de 82,2% e 79,0%, respectivamente, da doença.

Quando consideramos a AACPD (Tabela 14) esta redução da doença fica mais evidente, de modo que, todos os tratamentos apresentaram redução da AACPD, novamente as reduções mais expressivas foram dos tratamentos com acibenzolar-S-metil e (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹), que reduziram em 87,0% e 79,5%, respectivamente.

A produção (Tabela 14) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, apesar da tendência de maior produção no tratamento com (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹), com produção 15,9% maior e de menor produção no tratamento com acibenzolar-S-metil que apresentou 7,6% menos produção que o tratamento testemunha.

Tabela 14. Severidade final de *Cercospora beticola*, AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) e produção de beterrabas submetidas a diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle de *Cercospora beticola*

Tratamento	Sev. Final (%)	AACPD	Produção (g)
Células <i>Candida albicans</i>	1,39 ab	12,73 ab	106,32 ^{NS}
Filtrados <i>Candida albicans</i>	1,28 ab	14,22 b	107,99
Células <i>Pichia pini</i>	0,97 a	15,56 b	112,83
Filtrados <i>Pichia pini</i>	0,77 a	13,93 b	110,13
Células JRS Amarela	0,52 a	11,87 ab	103,97
Filtrados JRS Amarela	0,67 a	14,53 b	100,14
Água destilada	2,19 b	31,16 c	102,45
Fungicida*	0,46 a	6,93 ab	118,79
Acibenzolar-S-metil	0,39 a	4,04 a	94,62
CV (%)	51,32	26,80	11,96
Média Geral	0,96	13,88	106,36

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

A levedura *C. albicans* é patógeno para humanos, causando infecção da vulva e vagina, bem como outras espécies do gênero. Devido a este fato, poucos são os estudos envolvendo esta levedura no controle de doenças de plantas e promoção de crescimento vegetal.

O uso deste gênero de leveduras no controle biológico de doenças de plantas foi estudado por Droby et al. (2002), sendo que este utilizou-se da espécie *Candida oleophila*, e observou redução da severidade do bolor verde em frutos de laranja em até 65%, além do aumento da síntese do etileno e atividade de fenilalanina amônia-liase.

Esperava-se que *C. albicans* formasse um microbioma competitivo sobre o tecido vegetal que dificultasse a penetração de *C. beticola*, no entanto, este resultado não foi satisfatório, visto que a severidade em plantas tratadas com esta levedura e seus filtrados foram semelhantes ao tratamento testemunha.

No entanto, a capacidade de formar um microbioma competitivo pode estar relacionado a capacidade de se nutrir, o que pode ser difícil para leveduras que habitam a superfície foliar, visto que, nesta a disponibilidade de nutrientes é bem menor quando comparada ao desenvolvimento de colônias de leveduras em meio de cultura, onde a disponibilidade de nutrientes é mais ampla.

Conforme Fujimoto (2017), *C. albicans* teve efeito direto *in vitro* na redução do número de colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, bem como efeito indireto, quando avaliou-se a produção de compostos voláteis desta levedura.

As leveduras do gênero *Pichia* também são pouco expressivas quanto a estudos destas envolvendo controle biológico de doenças de plantas, sendo que, alguns relatos encontrados referem-se a espécie *Pichia guilliermondii*.

Conforme Lahlali et al. (2014) a espécie *P. guilliermondii* é eficaz no controle do bolor azul dos citros, causado por *P. italicum*. E de acordo com Zhao & Yin (2018) esta levedura em associação com ar quente apresentou controle de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Colletotrichum gloeosporioides* em pós-colheita da maçã Fuji.

De acordo com Kuhn e Pascholati (2010) a resistência induzida pelo Acibenzolar-S-metil apresenta elevado custo associado. No presente experimento isto pode ser observado, visto que, apesar de não reduzir a produção, houve uma tendência de redução desta, além da redução de massa seca. No entanto, plantas tratadas com Acibenzolar-S-metil foram as que apresentaram menor severidade final de cercosporiose e também menor AACPD.

Com base nos resultados apresentados, pode-se observar que as leveduras testadas influenciaram de modo significativo no desenvolvimento das plantas, estas também promoveram o controle da doença, no entanto, não alteraram a

produtividade obtida, deste modo, sugere-se que o custo energético da indução de resistência por leveduras tenha sido compensado pela promoção de crescimento das plantas provocado pelo efeito das leveduras testadas.

4.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.5.1. Fenóis totais

Após a aplicação dos tratamentos, apenas as plantas tratadas com células de *Pichia pini* apresentaram elevação nos teores de fenóis totais, sendo que após a inoculação com *C. beticola* todos os tratamentos apresentaram níveis de fenóis totais semelhantes aos do tratamento testemunha, conforme pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 15. Fenóis totais (mg g⁻¹ tecido fresco) de plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com *Cercospora beticola*)

Tratamento	0 DAT	3 DAT	6 DAT (3 dias após inoculação)
Células <i>Candida albicans</i>	3,97 ^{NS}	5,06 ^{ab}	6,25 ^{NS}
Filtrados <i>Candida albicans</i>	3,42	4,58 ^{ab}	6,33
Células <i>Pichia pini</i>	3,52	6,03 ^a	4,60
Filtrados <i>Pichia pini</i>	2,84	4,63 ^{ab}	4,46
Células JRS Amarela	4,12	4,24 ^{ab}	4,86
Filtrados JRS Amarela	4,17	4,62 ^{ab}	5,61
Água destilada	3,84	3,53 ^b	4,06
Fungicida*	2,95	4,02 ^{ab}	4,07
Acibenzolar-S-metil	3,43	4,38 ^{ab}	6,35
CV (%)	15,71	20,34	20,21
Média Geral	3,58	4,57	5,17

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹)).

Os compostos fenólicos constituem um grupo diverso de metabólitos secundários que apresentam atividade antioxidante, como flavonoides e taninos. Estes compostos constituem a classe mais abundante de metabólitos secundários

nas plantas e compartilham uma origem em comum na via biossintética dos fenilpropanoides. O maior conteúdo de compostos fenólicos ocorre como forma de defesa de tecidos vegetais a condições que favoreçam o aumento de radicais livres, como por exemplo, o ataque de patógenos (DIAS, et al., 2015).

Conforme Kuhn (2007), os compostos fenólicos podem ser tóxicos aos microrganismos, deste modo, serem considerados como mecanismos de defesa das plantas aos agentes patogênicos. Em alguns casos, os produtos da oxidação dos compostos fenólicos pela polifenoloxidasas podem ser mais tóxicos, apresentando assim, maior eficiência. Dentre esses, os compostos fenólicos são utilizados na produção de ésteres, cumarinas, flavonoides e ligninas, além de que, a presença de compostos fenólicos inibe metabólitos do patógeno (STANGARLIN et al., 2011).

Além disso, os compostos fenólicos são substrato para a síntese de lignina, a qual também trata-se de um mecanismo de defesa das plantas à patógenos. Os compostos fenólicos são substratos da polifenoloxidase, que atua na hidroxilação de monofenóis a *o*-difenóis e destes a *o*-quinonas (compostos antimicrobianos), bem como no acoplamento oxidativo de radicais monolignóis, para produção da lignina. Fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase são enzimas envolvidas na rota de síntese da lignina a partir de compostos fenólicos, na via dos fenilpropanoides (MATTEI, 2019).

Sendo assim, a toxicidade dos compostos fenólicos e maior disponibilidade de substrato para síntese de lignina podem explicar a redução da AACPD e severidade de cercosporiose em plantas de beterraba tratadas com células de *P. pini*.

4.5.2. Lignina

Após a aplicação dos tratamentos, apenas as plantas tratadas com filtrado de cultura de JRS Amarela apresentaram elevação nos teores de lignina, sendo que após a inoculação com *C. beticola* apenas o tratamento com filtrados de *P. pini* apresentou níveis de lignina semelhantes aos do tratamento testemunha, conforme pode ser observado na Tabela 16.

A lignificação de uma célula vegetal torna as paredes mais rígida, tendo como principal função a sustentação da planta, o que as confere maior resistência à penetração e exige do invasor a expressão de enzimas específicas que degradam lignina para continuar o avanço da colonização, este processo, é uma importante proteção celular contra insetos, além de, frequentemente, estar associada ao

bloqueio do crescimento de agentes patogênicos (KUHN, 2007; STANGARLIN, et al., 2011).

Tabela 16. Lignina (mg g⁻¹ tecido fresco) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com *Cercospora beticola*)

Tratamento	0 DAT	3 DAT	6 DAT (3 dias após inoculação)
Células <i>Candida albicans</i>	0,2832 ^{NS}	0,1288 d	0,3700 ab
Filtrados <i>Candida albicans</i>	0,2837	0,2033 bcd	0,4833 a
Células <i>Pichia pini</i>	0,2285	0,2866 b	0,3422 b
Filtrados <i>Pichia pini</i>	0,2385	0,2532 b	0,1710 c
Células JRS Amarela	0,2831	0,2910 b	0,3347 b
Filtrados JRS Amarela	0,2890	0,5327 a	0,3619 b
Água destilada	0,2748	0,2122 bcd	0,1937 c
Fungicida*	0,2837	0,1512 cd	0,3930 ab
Acibenzolar-S-metil	0,2336	0,2492 bc	0,4471 ab
CV (%)	15,37	16,51	13,80
Média Geral	0,2665	0,2565	0,3441

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

O processo de lignificação representa um mecanismo de defesa que gera um grande gasto de fotoassimilados, que por sua vez, não apresentam retorno ao metabolismo para serem reutilizados em outros processos. Uma unidade de lignina é extremamente complexa e demanda uma grande atividade metabólica para sua síntese, sendo necessário um grande número de enzimas responsáveis por diferentes passos metabólicos, o que significa maior demanda por nitrogênio e aminoácidos, podendo ser responsável por grande parcela do custo da metabólico e consequente redução da produtividade (KUHN, 2007).

Resultados deste experimento demonstram que plantas de beterraba tratadas com filtrados da levedura JRS Amarela aumentaram a lignificação da parede celular vegetal, o que pode ter contribuído com a redução da AACPD de plantas que receberam este tratamento.

No entanto, as plantas tratadas com esse filtrados de cultura não apresentaram redução na produtividade, o que possivelmente pode ter ocorrido pois trata-se de um indutor de origem biótica e pode apresentar efeito promotor de crescimento vegetal, no entanto, necessitam-se maiores estudos nesta linha para confirmar ou descartar esta hipótese.

Conforme pode ser observado aos 6 DAT, não há incremento nos teores de fenóis totais para os tratamentos aplicados, no entanto, há incremento nos teores de lignina, isso pode ser explicado pelo fato dos compostos fenólicos terem sido utilizados como substrato para produção de lignina.

Kuhn e Pascholati (2010) observaram que plantas de feijoeiro tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) apresentaram elevação na síntese de lignina enquanto que houve redução no teor de fenóis totais, enquanto que plantas tratadas com *Bacillus cereus* não apresentaram alteração na síntese de lignina e nem alterações nos teores de fenóis totais.

4.5.3. Proteínas totais

Após a aplicação dos tratamentos, apenas as plantas tratadas com filtrados de *P. pini* apresentaram elevação nos teores de proteínas totais, sendo que após a inoculação com *C. beticola* os tratamentos com células e filtrados de *C. albicans*, células de *P. pini*, filtrados de JRS Amarela e o tratamento com Acibenzolar-S-metil apresentaram níveis de proteínas totais maiores que aos do tratamento testemunha, conforme pode ser observado na Tabela 17.

Conforme Meinerz (2013), o conteúdo de proteínas no tecido vegetal desafiado com o patógeno ou tratado com eliciador indica a ativação dos mecanismos de defesa.

Para que uma planta possa expressar a resistência à patógenos, os mecanismos latentes, devem ser expressos no momento certo, com velocidade e magnitudes adequadas, contudo, para isto é preciso receptores (proteínas de membrana), que percebam rapidamente as mudanças no exterior da célula, bem como, a existência de uma via de sinalização eficiente, executados por proteínas citoplasmáticas, que faça com que a informação chegue rapidamente ao núcleo, para se iniciar o processo de expressão dos mecanismos de defesa (KUHN, 2007).

Tabela 17. Proteínas totais (mg g⁻¹ tecido fresco) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com *Cercospora beticola*)

Tratamento	0 DAT	3 DAT	6 DAT (3 dias após inoculação)
Células <i>Candida albicans</i>	7,9018 ^{NS}	8,0541 bc	8,1148 ab
Filtrados <i>Candida albicans</i>	7,5000	8,5254 ab	9,4261 a
Células <i>Pichia pini</i>	7,6952	8,5987 ab	8,2357 ab
Filtrados <i>Pichia pini</i>	7,5393	9,5410 a	6,2336 bc
Células JRS Amarela	7,9191	7,8950 bc	5,4425 c
Filtrados JRS Amarela	7,7198	7,3375 c	7,9274 ab
Água destilada	8,1807	8,3409 bc	5,6176 c
Fungicida*	7,6329	8,4933 ab	5,7446 c
Acibenzolar-S-metil	7,8394	7,8579 bc	7,9764 ab
CV (%)	7,36	5,79	11,80
Média Geral	7,7698	8,2937	7,1910

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Nas plantas tratadas com filtrados de *P. pini* foi observado aumento de proteínas totais, esta elevação pode envolver a síntese de proteínas-RP, além de outras proteínas relacionadas a defesa vegetal ou mecanismo de comunicação.

Estes foram diferente dos encontrados por Heling et al. (2015), onde estes observaram que, plantas de morangueiro tratadas com as leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* não alteraram os teores de proteínas totais presentes nos tecidos foliares destas.

4.5.4. Atividade de peroxidases

As peroxidases têm sua atividade elevada em resposta ao processo infeccioso de um patógeno, e ao estresse oxidativo e ambiental. Deste modo, são utilizadas como indicadores de resposta de defesa das plantas. As peroxidases são responsáveis pela catálise da redução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio e água. Também fazem parte de vias metabólicas envolvidas na oxidação de compostos fenólicos, entre eles o fenilpropano, formando unidades de polímeros que são constituintes da lignina (SILVA, 2018).

As peroxidases são classificadas como proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999) apresentam várias funções na defesa celular, pela sua participação na lignificação, suberização e metabolismo de parede celular (KUHN, 2007).

A atividade de peroxidases não apresentou nenhuma alteração após a aplicação dos tratamentos, demonstrando que nenhum dos tratamentos aplicados foi eficiente em induzir ou inibir esta atividade. O mesmo também se manteve após a inoculação das plantas com *C. beticola*, conforme pode ser observado na Tabela 18.

Tabela 18. Atividade de peroxidases (absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com *Cercospora beticola*)

Tratamento	0 DAT	3 DAT	6 DAT (3 dias após inoculação)
Células <i>Candida albicans</i>	0,4452 ab	0,1765 NS	0,2439 NS
Filtrados <i>Candida albicans</i>	0,3434 ab	0,0776	0,2775
Células <i>Pichia pini</i>	0,3581 ab	0,2101	0,2201
Filtrados <i>Pichia pini</i>	0,3677 ab	0,2312	0,2007
Células JRS Amarela	0,4671 ab	0,1460	0,2747
Filtrados JRS Amarela	0,4731 ab	0,1930	0,2845
Água destilada	0,4560 ab	0,1260	0,2289
Fungicida*	0,2490 b	0,2033	0,3714
Acibenzolar-S-metil	0,5553 a	0,1750	0,3730
CV (%)	27,98	39,48	30,67
Média Geral	0,4128	0,1709	0,2750

NS Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L^{-1}) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L^{-1})).

Boava et al. (2010) observaram que plantas de eucalipto com 60 dias, que foram submetidas ao tratamento com a leveduras *S. cerevisiae* apresentaram elevação na atividade das peroxidases, plantas moderadamente resistentes, sem nenhum tratamento, apresentavam atividade de 0,6 unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg} \text{proteína}^{-1}$, enquanto que plantas suscetíveis apresentavam atividade de 0,8 unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg} \text{proteína}^{-1}$, valor este que se elevava para 2,5 unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg} \text{proteína}^{-1}$ quando se tratavam estas plantas com

S. cerevisiae e para 3,5 unidades de absorvância.min⁻¹.mg proteína⁻¹ quando além da levedura também se realizava inoculação com *Puccinia psidii*.

Silva (2018) também observou que o tratamento à base de leveduras (181 e i6) não apresentou efeito no alteração da atividade de peroxidases em plantas de milho, resultados estes que corroboram com os encontrados neste estudo, o mesmo ocorreu com Heling et al. (2015), onde estes observaram que plantas de morangueiro tratadas com *S. cerevisiae* e *S. boulardii* para controle biológico de *Mycosphaerella fragariae* não apresentaram alteração na atividade de peroxidases.

4.5.5. Atividade de β -1,3-glucanases

As enzimas com atividade de β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, composto esse, que juntamente com a quitina, são os principais componentes que dão resistência a parede celular dos fungos (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993; citado por KUHN, 2007).

Conforme Bertoldo e Mazaro (2018) as β -1,3 glucanases de plantas são enzimas abundantes e comumente encontradas no reino vegetal, estando envolvidas em vários processos fisiológicos, especialmente na defesa vegetal.

No entanto, neste experimento, a atividade de β -1,3-glucanases não sofreu alteração em função dos tratamentos aplicados sob as plantas de beterraba, o mesmo ocorreu após a inoculação de *C. beticola*, conforme pode ser observado na Tabela 19.

O mesmo ocorreu com Heling et al. (2015), onde estes observaram que plantas de morangueiro tratadas com *S. cerevisiae* e *S. boulardii* para controle biológico de *M. fragariae* não apresentaram alteração na atividade de as β -1,3-glucanases.

Tabela 19. Atividade de β -1,3-glicanases (mg de glicose min^{-1} mg^{-1} de proteína) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com *Cercospora beticola*)

Tratamento	0 DAT	3 DAT	6 DAT (3 dias após inoculação)
Células <i>Candida albicans</i>	0,2255 ^{NS}	0,3645 ^{NS}	0,2334 ^{NS}
Filtrados <i>Candida albicans</i>	0,2974	0,1837	0,4182
Células <i>Pichia pini</i>	0,2152	0,2869	0,3239
Filtrados <i>Pichia pini</i>	0,1974	0,3776	0,2694
Células JRS Amarela	0,2121	0,2213	0,3006
Filtrados JRS Amarela	0,2994	0,2159	0,3457
Água destilada	0,3283	0,4046	0,2652
Fungicida*	0,2039	0,2926	0,2791
Acibenzolar-S-metil	0,4411	0,2623	0,3306
CV (%)	40,30	43,15	36,38
Média Geral	0,2689	0,2899	0,3074

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L^{-1}) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L^{-1})).

4.5.6. Atividade de fenilalanina amônia-liase

A enzima fenilalanina amônia-liase apresenta importância chave no metabolismo secundário das plantas. Sua função é catalisar a eliminação não oxidativa da amônia da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico, o qual é o primeiro produto formado na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores (KUHN, 2007).

A fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima que atua na síntese de compostos fenólicos, e sua atividade está diretamente envolvida na resposta à infecção por fitopatógenos (SILVA, 2018).

Após a aplicação dos tratamentos, nenhum tratamento diferiu dos demais, como pode ser observado na Tabela 20.

Após a inoculação das plantas com *C. beticola*, aquelas que haviam sido tratadas previamente com filtrados da levedura JRS Amarela apresentaram maior atividade de fenilalanina amônia-liase em relação ao tratamento testemunha (Tabela 20).

Tabela 20. Atividade de Fenilalanina amônia-liase (mg de ác. *trans*-cinâmico hora⁻¹ g⁻¹ tecido fresco) em plantas de beterrabas aos 0 DAT (dias após tratamento), 3 DAT e 6 DAT (três dias após inoculação com *Cercospora beticola*)

Tratamento	0 DAT	3 DAT	6 DAT (3 dias após inoculação)
Células <i>Candida albicans</i>	5,1041 ^{NS}	6,5438 ^{NS}	8,0729 bc
Filtrados <i>Candida albicans</i>	4,8252	6,6134	12,3494 ab
Células <i>Pichia pini</i>	4,2790	5,0820	8,4540 bc
Filtrados <i>Pichia pini</i>	4,7307	7,4353	8,6305 bc
Células JRS Amarela	5,7774	6,5090	8,1150 bc
Filtrados JRS Amarela	5,2486	7,9528	13,6846 a
Água destilada	4,4902	8,4165	7,8540 bc
Fungicida*	3,3251	4,8484	4,2546 c
Acibenzolar-S-metil	5,5863	5,8794	6,0514 c
CV (%)	37,36	31,33	24,27
Média Geral	4,8185	6,5867	8,6074

^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DAT: Dias após tratamento. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹)).

Conforme Silva (2018) a levedura 181 tem capacidade de elevar as atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas de milho tratadas com esta, de 0,6 nmol de ácido *trans*-cinâmico mg proteína⁻¹ para 0,9 nmol de ácido *trans*-cinâmico mg proteína⁻¹, dessa maneira, possuindo potencial como indutoras de mecanismos de resistência em plantas de milho.

De acordo com Kamida (1998) a leveduras *S. cerevisiae* não induziu a expressão gênica da fenilalanina amônia-liase em tecidos de sorgo, bem como não alterou o acúmulo de compostos fenólicos nos esocótilos.

4.5.7. Severidade final e AACPD

Nesta etapa do experimento, apenas os tratamentos com células de *C. albicans* e filtrados de JRS Amarela não reduziram a severidade final de cercosporiose (Tabela 21).

Quando analisamos a variável AACPD, percebe-se que todos os tratamentos aplicados reduziram a AACPD, conforme pode ser observado na Tabela 21.

Tabela 21. Severidade final e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de beterrabas tratadas com diferentes tratamentos bióticos e abióticos para controle da cercosporiose

Tratamento	Sev. Final (%)	AACPD
Células <i>Candida albicans</i>	0,9075 ab	12,23 a
Filtrados <i>Candida albicans</i>	0,5700 a	10,50 a
Células <i>Pichia pini</i>	0,6450 a	13,58 a
Filtrados <i>Pichia pini</i>	0,5925 a	12,75 a
Células JRS Amarela	0,5100 a	11,71 a
Filtrados JRS Amarela	0,9075 ab	13,67 a
Água destilada	1,4700 b	27,86 b
Fungicida*	0,2975 a	4,50 a
Acibenzolar-S-metil	0,3150 a	4,89 a
CV (%)	38,61	36,02
Média Geral	0,6906	12,41

Letras diferentes na coluna indicam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. * (Tebuconazol (Triazol) (100 g L⁻¹) + Trifloxistrobina (Estrobilurina) (200 g L⁻¹).

Filtrados de *C. albicans* possivelmente atuam reduzindo a severidade final e também a AACPD por elevarem a atividade de lignina e proteínas totais aos 6 DAT, conseqüentemente, ativando mecanismos de defesa que estavam latentes nas plantas antes do tratamento. Por outro lado, as células de *C. albicans* apenas elevaram os teores de proteínas totais aos 6 DAT.

Em plantas tratadas com células de *P. pini* ocorre a elevação dos teores de fenóis totais aos 3 DAT e de lignina e proteínas totais aos 6 DAT, o que confere as plantas tratadas maior toxicidade aos microrganismos, como pode ser observado nesses resultados, após a inoculação do patógeno houve aumento de lignina nas plantas tratadas com células de *P. pini*, além de um meio de sinalização mais eficiente.

Já o tratamento com as leveduras JRS Amarela elevaram a lignificação das plantas tratadas aos 6 DAT, o que pode explicar a redução da severidade final de cercosporiose e AACPD, enquanto que filtrados de cultura da levedura JRS Amarela elevaram os teores de proteínas totais e atividade de fenilalanina amônia-liase, o que possivelmente resultou na redução da severidade final e da AACPD da cercosporiose.

Resultado semelhante ao encontrado por Fujimoto (2017) em outro patossistema, onde, esta observou que, *C. albicans* reduz o número de colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, em testes *in vitro*.

Estes resultados corroboram com os encontrados por outros autores em outros patossistemas, como Zhang et al. (2017) que observaram que *C. laurentii* reduziu a incidência e severidade de *Penicillium expansum* em frutos de pêssego, em 35% e 50%, respectivamente, França et al. (2015) observaram redução de 34% no diâmetro da lesão de antracnose em frutos de pimentão com utilização de *R. glutinis*, Droby et al. (2002), observaram que *C. oleophila*, reduziu a severidade do bolor verde em frutos de laranja em até 65%, Lahlali et al. (2014) observaram que *P. guilliermondii* é eficaz no controle do bolor azul dos citros, causado por *P. italicum*

5. CONCLUSÃO

Foram selecionadas as leveduras *C. albicans*, *P. pini* e JRS Amarela como potenciais para o controle de cercosporiose (*C. beticola*) em plantas de beterraba.

Possivelmente ocorreu indução de resistência das plantas tratadas com as leveduras selecionadas ou seus exsudatos presentes em filtrado de cultura, visto que, as plantas tratadas apresentaram alteração nos teores de lignina, fenóis totais e proteínas totais, indicando uma possível indução de resistência, no entanto, necessita-se de maiores estudos para poder confirmar ou descartar a indução de resistência.

Os tratamentos com as leveduras selecionadas apresentaram custo energético, no entanto, não impactando na produção das plantas tratadas com estes microrganismos.

6. REFERÊNCIAS

ABELES, F. B.; FORRENCE, L. E. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.45, p. 395-400, 1970.

AGUIAR, T.; LEMOS-BLAINSKI, J. M.; LUIZ, C.; FELIPINI, R. B.; DI PIERO, R. M. Polissacarídeos na ativação de mecanismos de defesa latentes das plantas. In: SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SILVA, C.M.; MAIA, A.J.; FARIA, C.M.D.R.; COLELLA, J.C.T. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA, 2014. v.7, cap.11, p.187-208.

ALVES, E.; PERINA, F. J. Extratos vegetais e óleos essenciais na indução de resistência em plantas contra patógenos. In: SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SILVA, C.M.; MAIA, A.J.; FARIA, C.M.D.R.; COLELLA, J.C.T. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA, 2014. v.7, cap.3, p.55-72.

ANTONIOLLI, L. R.; SILVA, G. A.; ALVES, S. A. M.; MORO, L. Controle alternativo de podridões pós-colheita de framboesas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.9, p.979-984, 2011.

ASSIS, A. M. P.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, A. J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E. A. A. Antagonism of yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* of cabbage phylloplane in field. **Revista de Microbiologia**, v.30 p.191-195, 1999.

BARBER, M. S.; RIDE, J. P. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.32, p.185-197, 1988.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p. 231-239, 2010.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIN

FILHO, A. **Manual de Fitopatologia (Vol.1): princípios e conceitos**. Ed 4. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2011. v.1, cap.9, p.367-388.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. Jaboticabal: Funep, 2003. 41 p.

BERTOLDO, E; MAZARO, S. M. β -1,3 glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.17, n.1, p.1-13, 2018.

BETTIOL, W.; MAFFIA, L. A.; CASTRO, M. L. M. P. de. Control biológico de enfermedades de plantas en Brasil. In BETTIOL, W.; RIVERA, M. C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE, J. R.; COLMENÁREZ, Y. C. **Control Biológico de Enfermedades de Plantas em América Latina y el Caribe**. Jaguariúna, 2014, cap. 3, p.91-138.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Usos e perspectivas**. Jaguariúna, 2009, 341 p.

BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO R. M.; FURTADO, E. L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.168-172, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAMELO-GARCÍA, V. M.; REZENDE, J. A. M.; BRUNELLI-BRAGA, K. R.; GIORIA, R. Doenças da beterraba. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. Quinta edição. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2016. v.2, cap.18, p.159-163.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. da S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRGIO, A. C. **Dossiê ABRASCO um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro / São Paulo, 2015, 623 p.

CARVALHO, D. O., POZZA, E. A.; CASELA, C. R.; COSTA, R. V.; POZZA, A. A. A.; CARVALHO, C. O. Adubação nitrogenada e potássica na severidade da antracnose em dois cultivares de milho. **Ceres**, v.60, n.3, p.380-387, 2013.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; FU, X.; LI, Y.; WANG, Q. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biology and Technology**, v.115, p.113-121, 2016.

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

COLARES, M. R. N.; BONALDO, S. M. Uso de biofertilizantes na indução de resistência em plantas a patógenos. In: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA, 2014. v.7, cap.3, p.55-72.

CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant physiology**, v.101, p.709-712, 1993.

DERAL. **Olericultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. 2016. On-line. <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/Olericultura_2015_16>. Acesso em 14 de Julho de 2016.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais**. Lavras: Editora UFLA, 2010. cap.10, p.227-278.

DIAS, T.; MELO, H. C.; ALVES, F. R. R.; CARVALHO, R. F.; CARNEIRO, K. S.; SOUSA, C. M. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfogênicos. **Ciência Rural**, v.45, n.5, p.782-787, 2015.

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; PORAT, R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v.92, n.4, p.393-399, 2002.

FERNANDES FILHO, E. I.; VALE; F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; LIBERATO, J. R.. 2002. **Software QUANT v.1.0.0.22 – Quantificação de Doenças de Plantas**. Universidade Federal de Viçosa, CD-ROM.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIALHO, M. B.; TOFFANO, L.; PEDROSO, M. P.; AUGUSTO, F.; PASCHOLATI, S. F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.5, p.925-932, 2010.

FRANÇA, G. S.; CARVALHO, R. R. C.; NEVES, R. P.; ARAUJO, E. R.; LARANJEIRA, D. Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. **Bioscience Journal**, v.31, n.2, p.451-459, 2015.

FREITAS, A. D. G.; SOUZA, A. Q. L.; MAKI, C. S.; PEREIRA, J. O.; SILVA, N. M. Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o fungo simbiote *L. gongylophorus*, e dos fungos associados presentes nos ninhos de *Atta sexdens*. **Scientia Amazonia**, v.5, n.1, p.1-14, 2016.

FU, S. F., CHEN, H. W., WEI, J. Y., LEE, Y. I., CHOU, J. Y. Yeast-produced IAA is not only involved in the competition among yeasts but also promotes plant growth and development. **Nova Hedwigia**, v.105, n.1, p.135-150, 2016.

FUENTEFRIA, A. M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. 2004. 122p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FUJIMOTO, J. Y. H. **Controle biológico de podridão negra das crucíferas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) por leveduras do filoplano**. 2017. 34p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

GOUVEA, A.; KUHN, O. J.; MAZARO, S. M.; MIO, L. L. M.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A.; FONSECA, V. C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.4, p.527-533, 2009.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82. 1982.

HAUSMANN, S. L. **Interactions of pollinators and nectar-occupying yeast communities**. 2018. 101p. Tese (Department of Biology, Chemistry, Pharmacy) - Universität Berlin, Berlin.

HELING, A. L.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Controle biológico de *Mycosphaerella fragariae* na cultura do morangueiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.14, n.4, p.221-228, 2015.

HELING, A. L.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R.; HENKEMEIER, N. P.; RONCATO, S. C.; GONÇALVES, E. D. V. Controle biológico de antracnose em pós-colheita de banana "Maçã" com *Saccharomyces* spp. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.1, p. 49-51, 2017.

HOFFMANN, M. R. B.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R.; BATTISTUS, A. G.; STÜLP, J. L.; MEINERZ, C. C. Controle do cretamento bacteriano comum por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e óleo essencial de laranja em feijoeiro suscetível e moderadamente resistente. **Cultivando o Saber**, v.5, n.4, p.8-23, 2012.

HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M. R. R.; HOLANDA, J. C. P.; MILAN, E. P. Candidíase vulvovaginal: Sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.1, p.3-9, 2007.

KAMIDA, H. M. **Influência de *Saccharomyces cerevisiae* na expressão gênica da enzima fenilalanina amônia-iase e no metabolismo fenólico de tecidos de sorgo (*Sorghum bicolor*) protegidos contra *Colletotrichum sublineolum***. 1998. 59 p. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KRIAA, M.; HAMMAMI, I.; SAHNOUN, M.; AZEBOU, M. C.; TRIKI, M. A.; KAMMOUN, R. Biocontrol of tomato plant diseases caused by *Fusarium solani* using a new isolated *Aspergillus tubingensis* CTM 507 glucose oxidase. **Comptes Rendus Biologies**, v.338, n.10, p.666-677, 2015.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.107-114, 2010.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da resistência induzida no controle de fitopatógenos. In RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. v.3. Viçosa: UFV, 2007. cap.4, p.67-90.

LAHLALI, R.; HAMADI, Y.; DRIDER, R.; MISSON, C.; GUILLI, M.; JIJAKLI, M. H. Control of citrus blue mold by the antagonist yeast *Pichia guilliermondii* Z1: Compatibility with commercial fruit waxes and putative mechanisms of action. **Food Control**, v.45, p.8-15, 2014.

LAI, J.; CAO, X.; YU, T.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; LU, H. Effect of *Cryptococcus laurentii* on inducing disease resistance in cherry tomato fruit with focus on the expression of defense-related genes. **Food Chemistry**, v.254, p.208-216, 2018.

LOPES, M. R.; KLEIN, M. N.; FERRAZ, L. P.; SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. *Saccharomyces cerevisiae*: A novel and efficient biological control agent for *Colletotrihum acutatum* during pré-harvest. **Microbiological Research**, v.175, p.93-99, 2015.

MACHADO, B. I. **Controle da podridão azeda em frutos cítricos através de métodos alternativos**. 2018. 61 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Carlos, Araras.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. On-line. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 out. 2019.

MARQUES, L. F.; MEDEIROS, D. C.; COUTINHO, O. L.; MARQUES, L. F.; MEDEIROS, C. B.; VALE, L. S. Produção e qualidade da beterraba em função da adubação com esterco bovino. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.5, n.1, p.24-31, 2010.

MATTEI, D. **Alterações bioquímica e física da soja tratada com silicato de potássio visando o controle de *Meloidogyne incognita***. 2019. 115p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do parque de Itapuã, RS, Brasil.** 2008. 113p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAY DE MIO, L. L.; OLIVEIRA, R. A.; FLORIANI, A. M. V.; SCHUBER, J. M.; POLTRONIERI, A. S.; ARAUJO, M. A.; TRATCH, R. Proposta de escala diagramática para quantificação da cercosporiose da beterraba. **Scientia Agraria**, v.9, n.3, p.331-337, 2008.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia (Vol.1): princípios e conceitos**, 5a ed. Ouro Fino: Ed. Agronômica Ceres, 2018. p.261-274.

MEDEIROS, F. H. V.; MONTEIRO, F. P.; FREITAS, M. A.; MARTINS, S. J.; RODRIGUEZ, G. A.; LABORDE, M. C. F.; FARIA, M. R.; PEREIRA, P. F.; NOGUEIRA, C. C. A. Ganho de função em plantas mediadas por bactérias e fungos. In: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. **Indução de resistência em plantas a patógenos.** Maringá: UEM/MPA, 2014. v.7, cap.6, p.93-120.

MEINERZ, C. C. **Aspectos bioquímicos, fisiológicos e de crescimento de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) tratado com extratos vegetais e fúngico.** 2013. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

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

MELO, E. A.; MARIANO, R. L. R.; LARANJEIRA, D.; SANTOS, L. A.; GUSMÃO, L. O.; SOUZA, E. B. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. **Tropical Plant Pathology**, v.40, p.56-64, 2015.

MORALES, R. G. F.; SANTOS, I.; TOMAZELI, V. N. Influência da nutrição mineral foliar sobre doenças da parte aérea da cultura do trigo. **Ceres**, v.59, n.1, p.71-76, 2012.

MÜLLER, S. F. **Custo adaptativo da indução de resistência por *Saccharomyces boulardii* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2011. 43p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

NASCIMENTO, W. M. **Perspectivas de produção de sementes de beterraba no Brasil**. 2012. On-line. <<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=2400>>. Acesso em 11 Junho de 2012.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, v.15, p.152-158, 2016.

PALAZZINI, J. M.; ALBERIONE, E.; TORRES, A.; DONAT, C.; KÖHL, J.; CHULZE, S. Biological control of *Fusarium graminearum sensu stricto*, causal agent of Fusarium head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina. **Biological Control**, v.94, p.56-61, 2016.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem do patógeno. In AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. RESENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Quinta edição. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2018. v.1, cap.35, p.423-452.

PASCHOLATI, S. F.; TOFFANO, L.; Indução de resistência contra fitopatógenos em espécies arbóreas. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. v.3. Viçosa: Editora UFV, 2007. cap.3, p.59-66.

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

PITTNER, E.; PIVA, R.; SANTOS, J. C.; SANTOS, L. A.; FARIA, C. M. D. R. Análise do desenvolvimento de *Cercospora beticola* frente ao fungicida tebuconazol. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v.9, n.3, p.53-60, 2016.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.3, p.85-91, 2011.

RODRIGUES, F. A.; JURICK, W. M.; DATNOFF, L. E.; JONES, J. B.; ROLLINS, J. A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice – *Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.66, p.144-159, 2005.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; VILLALOBOS, M. C.; CALLE, A.; SERRADILLA, M. J.; CÓRDOBA, M. G.; HERNÁNDEZ, A. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, v.57, p.45-53, 2016.

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBREAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; ARAUJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília-DF: Embrapa Solos, 2018. E-book (ePub). <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181677/1/SiBCS-2018-ISBN-9788570358172.epub>.

SCHWAN, R. S.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Editora UFLA, 2008. p.585-620.

SILVA, P. A. G. **Leveduras para o controle da helmintosporiose em milho (*Zea mays*)**. 2018. 103 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SMITH, M.; *Zygoascus hellenicus* gen. nov., sp. nov., the teleomorph of *Candida hellenica* (*C. inositophila*= *C. steatolytica*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.52, n.1, p.25-37, 1986.

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

SPERANDIO, E .M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do cerrado**. 2012. 90p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília.

STANGARLIN, J. R.; SCHULZ, D. G., FRANZENER, G., ASSI, L., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., KUHN, O. J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.91-98, 2010.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18–46, 2011.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; LABATE, C. A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**. v.25, p.59-66, 2000.

STANGARLIN, J. R.; TOLEDO, M. V. Indução de resistência em plantas à patógenos por soluções ultradiluídas. In: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA, 2014. v.7, cap.12, p.209-232.

TEDFORD, S. L., BURLAKOTI, R. R., SCHAAFSMA, A. W., TRUEMAN, C. L. Relationships among airborne *Cercospora beticola* conidia concentration, weather variables and cercospora leaf spot severity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.40, n.1, p.1–10, 2018.

TIVELLI, S. W.; FACTOR, T. L.; TERAMOTO, J. R. S.; FABRI, E. G.; MORAES, A. R. A.; TRANI, P. E.; MAY, A. **Beterraba: do plantio à comercialização**. Boletim Técnico IAC. Campinas, 210, 45p. 2011.

TIVELLI, S. W.; TRANI, P. E. **Hortaliças: Beterraba (*Beta vulgaris* L.)**. 2008. On-line. <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/beterraba/index.htm>. Acesso em: 26 de Dezembro de 2018.

TOFFANO, L. **Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros**. 2010. 78p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba.

TOMIĆ, A., MILOŠEVIĆ, D., BODIROGA, R., (2018): Efikasnost fungicida u suzbijanju pegavosti lišća cvekle (*Cercospora beticola*), **Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem**, v.23, p.9-10, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Eucariotos: Fungos, Algas, Protozoários e Helminthos. In: **Microbiologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2012. Cap.12, p.329-366.

TRANI, P. E.; TIVELLI, S. W.; FACTOR, T. L.; BREDA JÚNIOR, J. M. **Calagem e adubação da beterraba**. Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, 15p. 2013.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1499-1503, 2009.

ZENG, L.; YU, C.; FU, D.; LU, H.; ZHU, R.; LU, L.; ZHENG, X.; YU, T. Improvement in the effectiveness of *Cryptococcus laurentii* to control postharvest blue mold of pear by its culture in β -glucan amended nutrient broth. **Postharvest Biology and Technology**, v.104, p.26-32, 2015.

ZHANG, Z.; CHEN, J.; LI, B.; HE, C.; CHEN, Y.; TIAN, S. Influence of oxidative stress on biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against blue mold on peach fruit. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-10, 2017.

ZHAO, Y.; YIN, J. Effects of *Pichia guilliermondii* and hot air treatment on the postharvest preservation of red fuji apple quality attributes. **Journal of Food Protection**, v.81, p.186-194, 2018.