

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**ANDERSON LUIS HELING**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE  
LEVEDURAS COMO AGENTES DE PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO  
AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2016**

**ANDERSON LUIS HELING**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE  
LEVEDURAS COMO AGENTES DE PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO  
AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

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

Orientador: Dr. Odair José Kuhn  
Coorientador: Dr. José Renato Stangarlin

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

H475i

Heling, Anderson Luis

Isolamento, identificação e avaliação do potencial de leveduras como agentes de proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum./Anderson Luis Heling. Marechal Cândido Rondon, 2016.

51 p.

Orientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn

Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,  
Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia

1. Controle biológico. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. *Xanthomonas axonopodis*  
*pv. phaseoli*. I. Kuhn, Odair José. II. Stangarlin, José Renato. III. Universidade  
Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

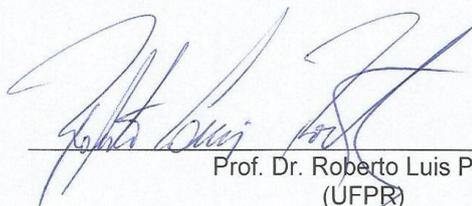
CDD 21.ed. 632.96  
CIP-NBR 12899

ANDERSON LUIS HELING

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE  
LEVEDURAS COMO AGENTES DE PROTEÇÃO DE PLANTAS DE  
FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM

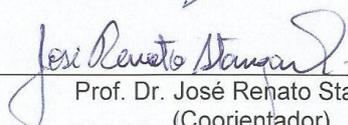
Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná, como parte das exigências  
do Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, para obtenção do título  
de Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2016



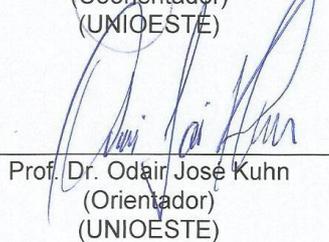
---

Prof. Dr. Roberto Luis Portz  
(UFPR)



---

Prof. Dr. José Renato Stangarin  
(Coorientador)  
(UNIOESTE)



---

Prof. Dr. Odair José Kuhn  
(Orientador)  
(UNIOESTE)

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Odair José Kuhn pela orientação e incentivos para o meu crescimento como profissional.

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.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, que através das professoras Dr<sup>a</sup>. Rosane Freitas Schwan e Dr<sup>a</sup>. Maria Gabriela C. P. Miguel auxiliaram na identificação dos isolados de leveduras.

Ao professor Dr. Élcio Silvério Klosowski pela disponibilização dos dados da estação meteorológica da Linha Guará.

Ao Marcelo Lange e demais funcionários do Núcleo de Estações Experimentais da Unioeste que sempre auxiliaram no desenvolvimento dos trabalhos de campo.

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, *Magister Scientiae*, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Fevereiro – 2016. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial de leveduras como agentes de proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum.** Orientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn. Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Diversos organismos podem ser utilizados para controle biológico de doenças e indução de resistência de plantas a patógenos, dentre estes, as leveduras. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras residentes do filoplano, testar o potencial destes isolados na produção de compostos voláteis e não voláteis que podem interferir no desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* *in vitro*, bem como em condições de casa de vegetação e a nível de campo, verificar seu efeito na severidade do crestamento bacteriano comum em feijoeiro, bem como outros fatores relacionados a produtividade. O isolamento das leveduras foi realizado a partir do filoplano e órgãos florais de plantas cultivadas em ambientes sem uso de agrotóxicos. A identificação dos isolados foi realizada com base em testes bioquímicos e cujo perfil foi comparado ao disponível no CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre. Para avaliar a capacidade dos isolados avaliou-se a produção de compostos voláteis e não voláteis e pareamento de culturas. Em casa de vegetação todos os isolados foram testados em plantas de feijoeiro onde se aplicou os tratamentos nas folhas primárias e inoculou-se o patógeno nestas folhas assim como no primeiro trifólio. Avaliou-se a severidade do crestamento bacteriano comum em ambas as folhas para se verificar se ocorreu o controle biológico da doença e/ou uma possível indução de resistência. Com base neste teste selecionou-se seis isolados para serem testados a campo na safra da seca (2014/2015) e também na safra das águas (2015/2016), para isto, foram realizadas três aplicações dos tratamentos em toda parte aérea das plantas tratadas, sendo avaliada a severidade do crestamento bacteriano comum além de fatores relacionados a produtividade. Obteve-se 54 isolados de leveduras, destes 42 foram identificados. Todos os isolados apresentaram, produção de compostos não voláteis capazes de reduzir o desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Dos 54 isolados, 47 apresentaram produção de compostos voláteis e foram capazes de reduzir o desenvolvimento do patógeno. Em casa de vegetação, 35 isolados apresentaram controle do crestamento bacteriano comum. Os isolados *Zygoascus hellenicus* AH 05-5 e

*Rhodotorula aurantiaca* AH12-3 promoveram uma indução de suscetibilidade a doença. Os isolados *Cryptococcus laurentii* AH 01-1, *Rhodotorula glutinis* AH 14-3 e *Sporidiobolus johnsonii* AH 16-1 apresentaram redução da área abaixo da curva de progresso da doença em plantas de feijoeiro cultivadas a campo, no entanto, o controle desta doença não resultou no incremento de produtividade.

Palavras-chave: Controle biológico. *Phaseolus vulgaris*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

## ABSTRACT

HELING, Anderson Luis, Magister Scientiae, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February – 2016. **Isolation, identification and evaluation of potential the yeast in bean crop agents to common bacterial blight.** Advisor: Dr. Odair José Kuhn. Co-Advisors: Dr. José Renato Stangarlin

Various organisms can be used for biological control and host plant resistance induction to pathogens, among them, the yeasts. This study aimed to insulate and identify yeasts residents of phyloplan, test the potential of these insulator in production of volatile and non-volatile compounds which can interfere with the development of colonies of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* *in vitro*, and test these insulators *in vivo* in a greenhouse, for its effect on the severity of the common bacterial blight in beans, and also evaluate other factors related to productivity. The insulation of the yeast was carried from leaf and floral tissues of plants grown in environments, free use of pesticides. The identification of the insulator was based on biochemical tests and whose profile was compared to CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre. To evaluate the aggression of the insulator, was evaluated the production of volatile and non-volatile pairing and cultures. In a greenhouse all insulators were tested on bean plants where applied treatments on leaves and inoculated the pathogen on all leaf as well as in the first trifoliolate. The severity of the common bacterial blight was evaluated in both sheets to verify that occurred the biological control of the disease and/or a possible induction of resistance. Based on this test was selected six insulators to be tested in the field in the dry season (2014/2015) and in rainy season (2015/2016), so that, there were three applications of treatments in all air part of the treated plants, and evaluated the severity of blight common bacterial as well as factors related to productivity. There was obtained 54 yeasts insulators, 42 of these were identified. All isolates showed *in vitro* production of non-volatile compounds capable of reducing the development of colonies of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Of the 54 isolates, 47 had production of volatile compounds, *in vitro*, and were able to reduce the development of pathogen colonies. In greenhouse, 35 isolates had control of common bacterial blight. The Isolates *Zygoascus hellenicus* AH 05-5 and *Rhodotorula aurantiaca* AH12-3 promoted an induction susceptibility to disease. The Isolates *Cryptococcus laurentii* AH 01-1, *Rhodotorula glutinis* AH 14-3 and *Sporidiobolus johnsonii* AH 16-1 had reduced AUDPC of common bacterial blight

in bean plants grown in the field, however, the control of this disease did not result in increased productivity.

Keywords: Biological control. *Phaseolus vulgaris*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Valores de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%), na casa de vegetação, no período de 06 de janeiro de 2015 a 09 de fevereiro de 2015. .... 18
- Figura 2.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra da seca (2014/2015), no período de 21 de março a 24 de junho de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR.....37
- Figura 3.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra das águas (2015/2016), no período de 1º de setembro a 30 de dezembro de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR.....38
- Figura 4.** Produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) de feijoeiro, inoculados com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra da seca (2014/2015), no período de 21 de março a 24 de junho de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR. ....41
- Figura 5.** Produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) de feijoeiro, inoculados com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra das águas (2015/2016), no período de 1º de setembro a 30 de dezembro de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR.....43

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Material vegetal a partir do qual se realizou o isolamento de leveduras e os respectivos isolados ..... 12
- Tabela 2.** Temperatura média (°C), precipitação pluviométrica acumulada (mm) e umidade relativa do ar média (%) coletadas em estação meteorológica, no município de Marechal Cândido Rondon – PR, nos períodos de 21 de Março a 24 de Junho de 2015 e 1º de Outubro a 30 de Dezembro de 2015. ....20
- Tabela 3.** Número de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em placas de Petri, submetidas ao teste de compostos voláteis com isolados de leveduras ....25
- Tabela 4.** Número de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em placas de Petri, submetidas a três diferentes testes de compostos não voláteis com isolados de leveduras.....27
- Tabela 5.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas primárias de feijoeiro tratadas com leveduras .....31
- Tabela 6.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em trifólios de feijoeiro de plantas tratadas com leveduras na folha primária .....33
- Tabela 7.** Vagens por planta, grãos por vagem e massa de mil grãos de feijoeiro cv. Iapar 81, na safra da seca (2014/2015), submetidos ao tratamento com leveduras, no município de Marechal Cândido Rondon – PR, 2015..... 40
- Tabela 8.** Vagens por planta, grãos por vagem e massa de mil grãos de feijoeiro cv. Iapar 81, na safra das águas (2015/2016), submetidos ao tratamento com leveduras, no município de Marechal Cândido Rondon – PR, 2015.....42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1	FEIJOEIRO ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	4
2.2	CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM .....	5
2.3	CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS .....	6
2.4	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS .....	7
2.5	LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	9
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1	ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	12
3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS.....	14
3.3	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR LEVEDURAS .....	15
3.4	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS POR LEVEDURAS	16
3.5	TESTE DE PAREAMENTO DE CULTURAS.....	17
3.6	EFEITO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	17
3.7	EFEITO DAS LEVEDURAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM PLANTAS DE FEIJOEIRO A CAMPO: SAFRA DA SECA (2014/2015) E SAFRA DAS ÁGUAS (2015/2016).....	19
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
4.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	23
4.2	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS POR LEVEDURAS E TESTE DE PAREAMENTO.....	24

4.3	EFEITO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	30
4.4	EFEITO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM A CAMPO: SAFRA DA SECA (2014/2015) E SAFRA DAS ÁGUAS (2015/2016).....	37
5	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma espécie da família das Fabaceas, com ampla distribuição geográfica e de grande importância social, econômica e cultural em diversos locais.

Esta cultura agrícola apresenta grande importância na alimentação humana, sendo uma importante fonte de proteína vegetal, vitaminas do complexo B, sais minerais, ferro, cálcio e fósforo.

O Brasil figura entre os principais produtores mundiais de feijão, sendo o Estado do Paraná o maior produtor nacional da cultura, no entanto, a maior produtividade é registrada no Estado de Goiás, devido principalmente, ao fato das medidas de cultivo empregadas pelos produtores de feijão deste estado serem mais tecnificadas.

Diversos fatores estão relacionados a produtividade da cultura, como por exemplo, práticas de rotação de culturas, cultivo dentro período adequado, manejo e fertilidade do solo adequados, um bom controle fitossanitário, manejando-se de maneira adequada as plantas daninhas, insetos praga e doenças e utilização de irrigação, dentre outros.

A cultura é suscetível a uma grande gama de doenças, as quais podem ter como agentes causais vírus, bactérias, fungos de parte aérea, fungos de solo e nematoides.

Dentre as doenças que afetam o feijoeiro, o crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* é de grande importância. Seus sintomas são observados em toda parte aérea da planta, no entanto, o mais característico pode ser observado nas folhas, onde surgem manchas aquosas que progridem para necróticas, podendo apresentar halo amarelado em seu entorno. Estas lesões reduzem a área fotossintética da planta, deste modo causando redução na sua produção.

Para o controle do crestamento bacteriano comum são recomendados uma gama de práticas culturais, além do controle químico, que também pode ser empregado, no entanto, para esta doença, são registrados para uso, na cultura do feijoeiro, apenas dois princípios ativos.

Deste modo, métodos de controle de doenças considerados como alternativos são de grande importância, e dentre estes métodos se destaca o controle biológico de doenças.

Diversos organismos podem ser utilizados como agentes de controle biológico de doenças, como estirpes fracas de vírus, bactérias e fungos, dentre os fungos se destacam as leveduras.

Leveduras são organismos unicelulares, não filamentosos, de formato tipicamente esférico ou ovais. Sua distribuição no ambiente é ampla, sendo encontrado principalmente em áreas onde o uso de agrotóxicos, em especial os fungicidas não é prática recorrente, podendo ser encontradas recobrando folhas, flores, frutos, dentre outros tecidos vegetais.

As leveduras são consideradas como sendo promissores agentes de controle biológico, visto que diversos gêneros estão sendo estudados para esta finalidade.

Estas podem promover o controle da doença por diferentes mecanismos, atuando diretamente sobre o patógeno, deste modo como agentes de controle biológico, ou indiretamente, atuando sobre a planta como agentes de indução de resistência de plantas a patógenos.

Vários estudos já foram desenvolvidos com o uso de leveduras para controle de doenças em diferentes patossistemas, tanto em condições controladas quanto em cultivo em condições de campo.

Para o controle do cretamento bacteriano comum na cultura do feijoeiro as principais leveduras estudadas como agentes de controle são do gênero *Saccharomyces*, como a *S. boulardii* e a *S. cerevisiae*. Estas tem sido estudadas como agentes de controle biológico de doenças de plantas e também como agentes de indução de resistência em plantas a patógenos.

Deste modo, este trabalho teve como objetivos isolar e identificar leveduras residentes do filoplano, testar o potencial destes isolados de leveduras sobre produção de compostos voláteis e não voláteis que podem interferir no desenvolvimento de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* *in vitro*, bem como testar estes isolados *in vivo* em casa de vegetação, observando se há redução na severidade do cretamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro tratadas com estas leveduras, e também avaliar em condições de campo o efeito de algumas

leveduras selecionadas no controle desta doença, bem como outros fatores relacionados a produtividade.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*)

De acordo com o sistema de classificação vegetal de Cronquist (1988) o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta pertencente a subclasse Rosidae, ordem Fabales, da família das Fabaceas, sendo a espécie *P. vulgaris* amplamente distribuída no mundo e apresenta grande importância social, econômica e cultural para diversas nações.

O feijão está entre os alimentos mais antigos consumidos pelo homem, remontando aos primeiros registros da história da humanidade, achados arqueológicos apontam para a existência de feijoeiros domesticados cerca de 10.000 anos A.C. As ruínas da antiga cidade de Tróia revelam que o feijão estava entre os alimentos preferidos dos guerreiros troianos, sendo que, a maioria dos historiadores atribui a disseminação do feijão em decorrência das guerras, visto que, esse alimento fazia parte essencial da alimentação dos guerreiros em marcha, além destes, também ajudaram a difundir a cultura do feijão pelo mundo os exploradores, que os levavam como fonte de alimento em suas expedições a regiões remotas do planeta (MAPA, 2015a).

No Brasil, o feijão é um alimento típico da culinária nacional, sendo que, de cada dez brasileiros, sete o consomem diariamente, o consumo médio per capita é de 19 quilogramas anuais. Este grão é uma importante fonte de proteínas vegetais, bem como de vitaminas do complexo B, sais minerais, ferro, cálcio e fósforo (MAPA, 2015a).

De acordo com os dados disponibilizados pela Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2015), considerando-se os três períodos de cultivo do feijoeiro, na safra 2014/2015 foram cultivados 3,034 milhões de hectares com a cultura do feijoeiro, apresentando redução de 10,9% na área de cultivo se comparado com a safra anterior (2013/2014) e a perspectiva para a safra seguinte (2015/2016) é que esta área reduza em 0,2%. A produção na safra 2014/2015 foi de 3,185 milhões de toneladas, apresentando redução de 8,4% na produção se comparado com a safra anterior e a perspectiva para a safra seguinte é que esta se

eleve 4,1%. Já a produtividade na safra 2014/2015 foi de 1050 kg ha<sup>-1</sup>, 2,3% superior a safras anterior e com perspectiva de crescimento de para a safra seguinte de 4,3%.

Na safra 2014/2015 o Estado da Bahia apresentou maior área de cultivo com a cultura do feijoeiro, considerando-se os três períodos de cultivo, foram 479,3 mil hectares cultivados com esta cultura, seguido do Estado do Paraná (405,9 mil ha) e do Estado do Ceará (400,1 mil ha). Para esta mesma safra, a maior produção foi registrada no Estado do Paraná, o qual produziu 720,4 mil toneladas de feijão, seguido do Estado de Minas Gerais (517,1 mil toneladas) e do Estado do Mato Grosso (489,0 mil toneladas). Nesta safra, a maior produtividade foi do Estado de Goiás, com produtividade de 2395 kg ha<sup>-1</sup>, seguido do Estado de São Paulo (2355 kg ha<sup>-1</sup>) e do Distrito Federal (2056 kg ha<sup>-1</sup>) (CONAB, 2015).

Diversos fatores estão relacionados a produtividade na cultura do feijoeiro, como por exemplo, práticas de rotação de culturas, cultivo dentro período adequado (zoneamento agrícola), manejo e fertilidade do solo adequados, um bom controle fitossanitário, manejando-se de maneira adequada as plantas daninhas, insetos praga e doenças, utilização de irrigação, dentre outros fatores.

## 2.2 CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM

As doenças causam grandes danos e conseqüentemente perdas na produtividade da cultura do feijoeiro, visto que, esta é suscetível a uma grande gama de doenças, que podem ter como agentes causais vírus, bactérias, fungos de parte aérea, fungos de solo e nematoides (BIANCHINI et al., 2005).

Dentre as doenças que afetam a parte aérea do feijoeiro, o crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) é de grande importância. Conforme Bianchini et al. (2005) esta doença ocorre principalmente em regiões quentes e úmidas, sendo que, no Brasil, tem sido problemática nas regiões sul, sudeste e centro-oeste.

De acordo com Paula Júnior et al. (2015) os sintomas típicos do crestamento bacteriano comum no feijoeiro são visíveis em toda a parte aérea da planta, sendo que, os sintomas mais característicos desta doença são observados nas folhas, onde inicialmente surgem manchas com aspecto encharcado, que aumentam de

tamanho e progridem para necróticas, podendo apresentar um halo amarelado ao seu redor.

As perdas ocasionadas por esta doença, sob as condições brasileiras de produção ainda não foram estimadas, no entanto, trabalhos desenvolvidos no exterior mostram que as perdas na produção podem chegar até 45% (BIANCHINI et al., 2005).

Para o controle do crestamento bacteriano comum, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2015b) recomenda algumas práticas culturais, como por exemplo, a utilização de sementes sadias e de boa qualidade fitossanitária, a rotação de culturas com espécies não hospedeiras do patógeno, a incorporação de restos culturais infectados, a eliminação de plantas voluntárias e de insetos que possam disseminar a bactéria, além do controle químico. Porém, para o controle desta doença, são registrados junto ao MAPA, para a cultura do feijoeiro, apenas cinco produtos, havendo somente dois diferentes ingredientes ativos, o acibenzolar-S-metílico e o hidróxido de cobre.

Devido a existência de apenas dois ingredientes ativos para o controle do crestamento bacteriano comum e também considerando a crescente preocupação da sociedade com os impactos negativos no meio ambiente e na 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).

### 2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS

Bedendo et al. (2011) definem o controle biológico de doenças de plantas como sendo o controle de um microrganismo através da ação de outro microrganismo, este controle pode ocorrer por meio de diversos mecanismos, tais como, a antibiose, a competição, o parasitismo e a pré-imunização.

Diversos organismos podem ser utilizados no controle biológico de doenças de plantas, como por exemplo, bactérias, estirpes fracas de vírus, nematoides predadores, fungos e dentre os fungos as leveduras.

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).

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 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, com é o caso das leveduras *Pichia* spp. e *Candida* spp.

Conforme Morandi e Bettiol (2009) no Brasil estão disponíveis vários produtos biológicos para controle de doenças em plantas, como estirpes fracas de CTV para pré-imunização contra a tristeza dos citros, estirpes fracas de PRSV-W para pré-imunização contra o mosaico da abobrinha, *Hansfordia pulvinata* para o controle do mal-das-folhas da seringueira, *Acremonium* sp. para o controle da lixa do coqueiro, *Clonostachys rosea* para o controle do mofo cinzento, *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças, *Trichoderma* spp. para o controle de patógenos de solo e substrato e também de parte aérea, dentre diversos outros agentes biológicos de controle de doenças.

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).

## 2.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM 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 resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência por meio da utilização de agentes externos, os indutores, sem qualquer alteração no genoma da planta, ocorrendo de maneira não-específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa (BONALDO et al., 2005).

Ainda conforme Bonaldo et al. (2005) o agente indutor pode ser qualquer composto ou fator capaz de ativar os mecanismos de defesa da planta, e eliciador é a molécula presente em um indutor responsável direto pela ativação dos mecanismos de defesa.

Já de acordo com Pascholati (2011) a indução de resistência 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.

A atividade do agente indutor não é devida a ação antimicrobiana ou a sua transformação em agentes microbianos, mas sim devida 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).

Dentre os vários indutores de resistência em plantas a patógenos relatados podemos citar o uso de 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.

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 benefícios são maiores quando utilizado mais de um microrganismo simultaneamente para o tratamento das plantas com a finalidade de se promover uma regulação gênica que resulte em ganho de funções para as plantas (MEDEIROS et al., 2014).

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, o que conseqüentemente resultará na redução dos pesticidas tradicionais (OLIVEIRA et al., 2016).

## 2.5 LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Conforme Tortora et al. (2012) as leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais, amplamente distribuídos na natureza, onde podem ser encontradas recobrimdo os tecidos vegetais, como folhas, flores e frutos.

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).

As leveduras apresentam uma enorme biodiversidade de espécies presentes no ambiente, sendo os seus potenciais biotecnológicos ainda desconhecidos pelo homem (FUENTEFRÍA, 2004).

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.

Conforme Mautone (2008) as leveduras apresentam enorme potencial para contribuir de modo efetivo para a inovação biotecnológica.

As leveduras se apresentam como agentes promissores no biocontrole de doenças de plantas, pois são integrantes da microbiota epifítica, endofítica e do solo onde se desenvolvem as plantas, competindo com os agentes patogênicos por nutrientes, colonizando ferimentos e até mesmo podendo induzir a resistência, sendo as principais leveduras biocontroladoras *Aureobasidium* spp., *Cryptococcus*

spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp. e *Sporobolomyces* spp. (MELLO et al., 2011).

No entanto os mecanismos de ação das leveduras no controle de patógenos de plantas ainda não está claramente elucidado.

Fialho et al. (2010) observaram que *Saccharomyces 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 o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa in vitro*, 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, servindo assim como agentes de controle biológico em diferentes patossistemas, como por exemplo, no controle da antracnose em sorgo, da mancha de dendrofoma em morangueiros, da antracnose em plântulas de pepino, de podridões em framboesa, da podridão-mole em couve-chinesa, da antracnose em frutos de pimentão, da mancha de micosfaerela em morangueiros, da mancha bacteriana em melão, dentre outros (PICCININ et al., 2005; GOUVEA et al., 2009; ZANARDO et al., 2009; ANTONIOLLI et al., 2011; MELLO et al., 2011; FRANÇA et al., 2015; HELING et al., 2015; MELO et al., 2015).

Com relação ao controle do crestamento bacteriano comum na cultura do feijoeiro, alguns estudos com leveduras para controle desta doença já vem sendo desenvolvidos, para isto, as leveduras podem ser utilizadas como agentes de controle biológico de doenças ou também como agentes de indução de resistência de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum.

Hoffmann et al. (2012), trabalhando em ambiente de cultivo convencional, observaram que as plantas de feijoeiro tratadas com células de *S. cerevisiae*

apresentavam menor severidade do cretamento bacteriano comum, porém o mesmo não ocorria quando se utilizava células de *S. boulardii*, demonstrando assim que, as leveduras, ainda que de um mesmo gênero, tem potenciais distintos para o controle biológico da doença na cultura do feijoeiro.

Conforme Spadaro e Droby (2016) o desempenho que uma levedura apresenta como agente de controle biológico de doenças de plantas é o resultado de diversas interações complexas que ocorrem envolvendo todos os componentes do sistema de controle biológico, incluindo a planta hospedeira, o antagonista, o agente patogênico e a microflora residente. Para que as leveduras apresentem um melhor desempenho como antagonistas, devem ser levados em consideração alguns aspectos como por exemplo a formulação, a embalagem e o modo de aplicação e armazenamento.

Além disto, ainda de acordo com Spadaro e Droby (2016) é necessário se ter uma profunda compreensão do modo de ação destes agentes antagonistas para o desenvolvimento de formulações e métodos de aplicação apropriados e que apresentem resultados satisfatórios no controle de patógenos de plantas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS

O isolamento das leveduras foi realizado a partir de folhas e flores de plantas, retiradas de ambientes onde não houve registro do uso de agrotóxicos em anos anteriores, seguindo-se a metodologia utilizada por Mautone (2008).

Foram coletados materiais vegetais de diversas espécies de plantas, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Material vegetal a partir do qual se realizou o isolamento de leveduras e os respectivos isolados

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> )	AH 06-1;
	<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2
Folha de Miho ( <i>Zea mays</i> )	<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 07-1;
	<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 07-2
Folha de Ficus ( <i>Ficus benjamina</i> )	AH 08-1;
	AH 08-2;
	AH 08-3
Flor de Beijinho ( <i>Impatiens walleriana</i> )	<i>Candida albicans</i> AH 09-1;
	AH 09-2
Folha de Nêspira ( <i>Eriobotrya japonica</i> )	AH 10-1;
	<i>Candida albicans</i> AH 10-3
Folha de Mandioquinha ornamental ( <i>Arracacia xanthorrhiza</i> )	AH 11-1;
	<i>Candida albicans</i> AH 11-2;
	<i>Candida albicans</i> AH 11-3

Continua...

...Continuação Tabela 1

Folha de Mamoeiro ( <i>Carica papaya</i> )	<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 12-1; AH 12-21; AH 12-22; <i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 12-3
Folha de Cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> )	AH 13-1; AH 13-2
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
Folha de Bananeira ( <i>Musa</i> sp.)	<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-1; <i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-2; <i>Rhodotorula glutinis</i> AH 17-3; <i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 17-4
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; AH 19-4
Folha de Pitangueira ( <i>Eugenia uniflora</i> )	<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-1; <i>Brettanomyces custersianus</i> AH 20-2; <i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 20-3; <i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-4

Estes materiais foram transportados em sacos plásticos para o Laboratório de Fitopatologia, onde primeiramente se efetuou um processo de lavagem com água destilada e esterilizada para a retirada da poeira acumulada.

Após esta primeira lavagem o tecido vegetal foi cortado com bisturi em fragmentos de 1 a 3 cm<sup>2</sup>, colocado em Erlenmeyer com 50 mL de água destilada e esterilizada e mantida em agitador mecânico do tipo orbital em 150 rpm por 10 minutos para uma segunda lavagem, sendo esta água descartada.

Em seguida os fragmentos de tecido vegetal foram colocados em outro Erlenmeyer com 50 mL de uma solução de Tween 20 (0,5%), o qual foi levado novamente ao agitador mecânico a 150 rpm por 30 minutos.

Após isto, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10<sup>-2</sup>. Estas diluições (10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>) foram semeadas em duplicata pela técnica de espalhamento em superfície em meio ágar-YM (0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1,0% glicose; 2,0% ágar) acrescido de 0,04% cloranfenicol, sendo estas placas incubadas em BOD a 25 °C por 5 dias.

Então foi realizado o isolamento das colônias de leveduras pelo método do esgotamento em placa duas vezes consecutivas em meio ágar-YEPG (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura; 2% ágar), deste modo, obtendo-se colônias puras, as quais foram preservadas.

Para a preservação dos isolados adotou-se armazenamento em tubos de ensaio contendo meio ágar-GYMP (2% glicose; 2% extrato de malte; 0,5% extrato de levedura; 0,2% fosfato de sódio monobásico; 2% ágar), cobertos por uma camada de óleo mineral estéril e mantidos em geladeira.

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS

Para a identificação dos isolados de leveduras seguiu-se a metodologia descrita por Dias e Schwan (2010), realizando-se testes bioquímicos de fermentação de carboidratos, assimilação de fontes de carbono, assimilação de fontes de nitrogênio, crescimento em temperaturas variadas, tolerância ao ácido acético e osmolaridade.

Os testes de fermentação de carboidratos se resumiram na fermentação de glicose.

A assimilação de fontes de carbono testadas foram: D-Glicose, D-Galactose, L-Sorbose, D-Glucosamina, D-Ribose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Arabinose, L-Rhamnose, Sacarose, Maltose, Trehalose, Metil LD-Glucoside, Cellobiose, Salicina,

Arbutina, Melibiose, Lactose, Raffinose, Meleiose, Inulina, Amido, Glicerol, Erythritol, Ribitol, Xylitol, L-Arabinitol, D-Glucitol, D-Mannitol, Galactitol, Meso-Inositol, D-Glucono 1,5 Lactonato, 2-Keto-D-Gluconate, 5-Keto-D-Gluconate, D-Gluconato, D-Gluconato, D-Galacturonato, DL-Lactato, Succinato e Citrato.

As fontes de nitrogênio que tiveram sua assimilação testadas foram: Nitrato, Nitrito, Etilamida, L-Lisina, Cadaverina e Creatina.

O crescimento em temperaturas variadas foi realizado a 28, 35 e a 45 °C. O teste de tolerância ao ácido acético foi realizado com a incubação das leveduras em placas contendo 1% de ácido acético glacial. E para os testes de osmolaridade as leveduras foram incubadas em placas contendo meios preparados com 50% e 60% de glicose e também com 10% e 16% de NaCl.

Os dados obtidos na caracterização bioquímica foram comparados com os disponíveis no CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre (CBS, 2016).

### 3.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR LEVEDURAS

Para a avaliação de produção de compostos voláteis, 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 AN (ágar-nutriente), na qual foi previamente espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky, solução salina (0,85%) contendo *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Estas placas ficaram fixadas e vedadas por filme plástico por um período de 36 horas em BOD a 27 °C, e após este período contabilizou-se o número de colônias de bactéria por placa.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo 55 tratamentos (54 isolados e uma testemunha, a qual não recebeu agente de controle, apenas o meio de cultivo) e quatro blocos para cada tratamento, totalizando 220 parcelas.

### 3.4 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS POR LEVEDURAS

A avaliação da produção de compostos não voláteis foi realizada através da média entre três metodologias distintas. Para a primeira, as leveduras foram postas para se desenvolverem sobre plástico celofane em placas de Petri contendo meio ágar-YEPG, em BOD a 27 °C e, após sete dias, o plástico celofane foi removido e com ele as colônias de leveduras. Assim, neste meio foram espalhadas, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, solução salina (0,85%) contendo *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, que foram cultivadas no meio por 36 horas, também em BOD a 27 °C e, após este período, se contabilizou o número de colônias por placa.

Para o segundo método, as leveduras foram cultivadas em caldo YEPG (2% glicose; 1% peptona; 0,5% extrato de levedura) por sete dias, mantidas sob agitação constante de 150 rpm em incubadora agitadora. Em seguida, o meio cultivado foi centrifugado a 1400g por 7 min, recolhendo-se o sobrenadante, o qual foi autoclavado por 20 min a 121 °C. Três discos de papel filtro com 0,5 cm de diâmetro foram encharcados com este sobrenadante e postos em placa de Petri com meio AN, no qual foi previamente espalhado solução salina contendo *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Após 36 horas em BOD a 27 °C contabilizou-se o número de colônias por placa.

Para o terceiro método, as leveduras também foram cultivadas em caldo YEPG e centrifugadas conforme realizado no método anterior. Em placas de Petri com meio AN, na qual foi previamente espalhada solução salina contendo *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, foram realizadas três perfurações circulares com 0,5 cm de diâmetro por placa, as quais foram preenchidas com o sobrenadante e após 36 horas em BOD a 27 °C, contabilizou-se o número de colônias por placa.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo 55 tratamentos (54 isolados e uma testemunha, a qual não recebeu agente de controle, apenas o meio de cultivo) e quatro blocos para cada tratamento, totalizando 220 parcelas.

### 3.5 TESTE DE PAREAMENTO DE CULTURAS

Para o teste de pareamento de culturas foram utilizadas placas de Petri com meio ágar-YEPG, nas quais cultivou-se os isolados de leveduras e da bactéria simultaneamente.

Este cultivo se deu em formato de semicírculos opostos, tanto para a levedura como para a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, de modo que o ponto médio entre as colônias de levedura e bactéria foram próximos, porém sem se tocarem.

Após um período de 36 horas em BOD a 27 °C avaliou-se a presença ou ausência de halo de inibição no ponto central.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo 55 tratamentos (54 isolados e uma testemunha, água destilada e esterilizada) e quatro blocos para cada tratamento, totalizando 220 parcelas.

### 3.6 EFEITO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM CASA DE VEGETAÇÃO

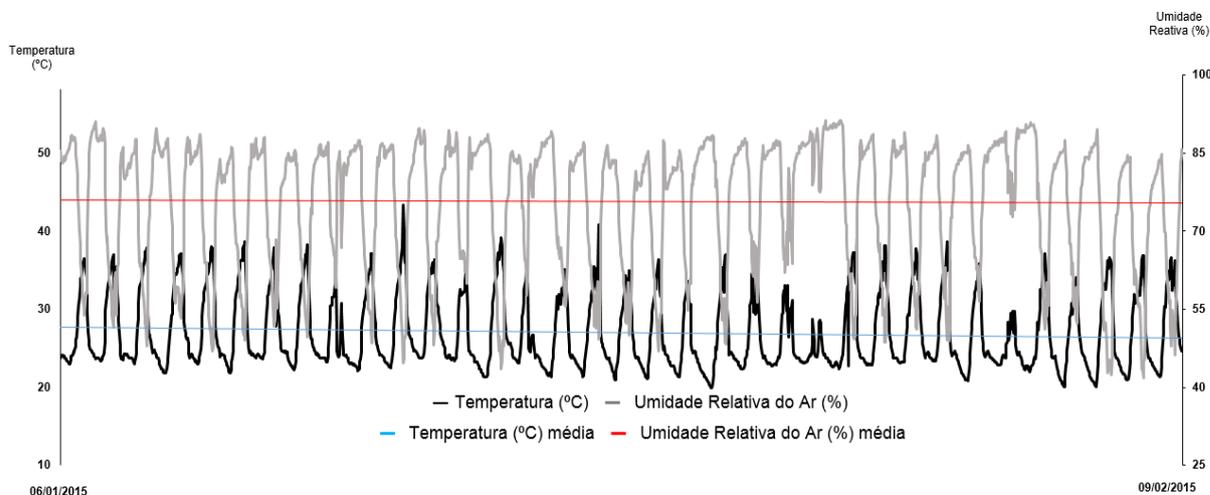
O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, no período de 06 de janeiro de 2015 a 09 de fevereiro de 2015.

Utilizou-se a cultivar de feijoeiro lapar 81, variedade esta suscetível ao crestamento bacteriano comum, semeada em vasos de polietileno de 2 dm<sup>3</sup>, contendo substrato obtido através de mistura homogênea entre LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (SANTOS et al., 2006), areia e matéria orgânica, na proporção de 2:2:1 (v:v:v).

Os valores de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) foram computados a cada 30 minutos com auxílio de armazenador de dados digital, cujos dados são apresentados na Figura 1. A temperatura média no período foi de 27,0 °C e a umidade relativa do ar de 75,7%. Para manter condição favorável à doença, com microclima próximo a superfície foliar com alta umidade relativa, borrifou-se água duas vezes ao dia até se atingir o ponto de escorrimento.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo 55 tratamentos e quatro blocos, totalizando 220 parcelas. Cada parcela foi constituída de um vaso contendo uma planta.

Os tratamentos utilizados foram 54 isolados de levedura e uma testemunha (água destilada). Os isolados, bem como sua origem, estão apresentados na Tabela 1.



**Figura 1.** Valores de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%), na casa de vegetação, no período de 06 de janeiro de 2015 a 09 de fevereiro de 2015.

O cultivo dos isolados se deu em placas de Petri contendo meio ágar-YEPG, mantidos em BOD a 27 °C por três dias. Após este cultivo foram preparadas suspensões na concentração de 10 g L<sup>-1</sup>, utilizando-se da colônia fresca e de água destilada.

O cultivo da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi efetuado em placas de Petri, contendo meio AN, mantidos em BOD a 27 °C por 48 horas. Após este cultivo preparou-se suspensão bacteriana em solução salina (0,85%) com concentração ajustada a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, com base em curva de concentração bacteriana previamente elaborada a 580 nm em espectrofotômetro.

Os tratamentos foram realizados no estágio fenológico V2, com o auxílio de um borrifador manual, aplicados nas folhas primárias da planta, até o ponto de molhamento total da folha, evitando-se chegar ao ponto de escorrimento.

Três dias após a aplicação dos tratamentos foi realizada a inoculação com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas folhas primárias e nas primeiras folhas trifolioladas. Para tal, a suspensão bacteriana foi borrifada sobre as plantas e mantidas em câmara úmida por 12 horas.

Avaliou-se a severidade do crestamento bacteriano comum nas folhas primárias, com a finalidade de determinar o efeito dos tratamentos no controle

biológico da doença. Adicionalmente, avaliou-se o primeiro trifólio, o qual não recebeu agente de controle, apenas a inoculação com o patógeno, com a finalidade de avaliar uma possível capacidade dos isolados em induzir resistência sistêmica da planta a esta doença.

As avaliações foram realizadas com o auxílio da escala diagramática para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, proposta por Diaz et al. (2001). Estas avaliações foram realizadas aos 6, 9, 12, 15 e 18 DAI (dias após inoculação), a partir do estágio fenológico V3 até o início do R5.

Com os valores de severidade do crestamento bacteriano comum, no período avaliado, foi construída a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pela metodologia proposta por Shaner e Finney (1977).

### 3.7 EFEITO DAS LEVEDURAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM PLANTAS DE FEIJOEIRO A CAMPO: SAFRA DA SECA (2014/2015) E SAFRA DAS ÁGUAS (2015/2016)

Utilizou-se a cultivar de feijoeiro Iapar 81, com densidade de 22,2 sementes m<sup>2</sup>, com espaçamento entre linhas de 0,45 m.

Os experimentos foram conduzidos na Estação Experimental Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos Pessoa, em LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (SANTOS et al., 2006), situado a latitude 24°31'56" S e longitude 54°01'07" O, no período de 21 de março de 2015 a 24 de junho de 2015, para a safra da seca (2014/2015) e situado a latitude 24°32'00" S e longitude 54°01'08" O, no período de 1º de setembro de 2015 a 30 de dezembro de 2015, para a safra das águas (2015/2016).

Os valores de temperatura (°C), precipitação pluviométrica (mm) e umidade relativa do ar (%) foram capturados em estação meteorológica localizada a 150 m do experimento da safra da seca (2014/2015) e a 25 m do experimento da safra das águas (2015/2016), cujos dados são apresentados na Tabela 2, no entanto, devido a falhas técnicas na estação meteorológica os dados referentes ao mês de setembro não estão apresentados.

**Tabela 2.** Temperatura média (°C), precipitação pluviométrica acumulada (mm) e umidade relativa do ar média (%) coletadas em estação meteorológica, no município de Marechal Cândido Rondon – PR, nos períodos de 21 de Março a 24 de Junho de 2015 e 1º de Outubro a 30 de Dezembro de 2015.

PERÍODO	Temperatura média(°C)	Precipitação pluviométrica acumulada (mm)	Umidade relativa do ar média (%)
21 a 31 de Março	22,5	46,6	79,9
1º a 30 de Abril	22,0	157,4	78,0
1º a 31 de Maio	18,8	221,6	82,3
1º a 24 de Junho	18,9	41,4	77,1
1º a 31 de Outubro	24,4	126,6	72,3
1º a 30 de Novembro	22,9	374,6	85,4
1º a 30 de Dezembro	23,8	414,2	86,4

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), contendo oito tratamentos (sendo seis isolados de leveduras, escolhidos com base no teste realizado em casa de vegetação) e quatro blocos, totalizando 32 parcelas. Cada parcela foi constituída de uma área de 15,75 m<sup>2</sup> (2,25 x 7,00 m) para a safra da seca (2014/2015) e de uma área de 13,5 m<sup>2</sup> (2,25 x 6,00 m) para a safra das águas (2015/2016).

Os tratamentos utilizados foram: seis isolados de leveduras (*Cryptococcus laurentii* AH 01-1; *Zygoascus hellenicus* AH 05-5; *Zygoascus hellenicus* AH 06-2; *Rhodotorula aurantiaca* AH 12-3; *Rhodotorula glutinis* AH 14-3; *Sporidiobolus johnsonii* AH 16-1), uma testemunha negativa (água) e uma testemunha positiva (piraclostrobina 130 g L<sup>-1</sup> + metconazole 80 g L<sup>-1</sup>).

O cultivo dos isolados foi realizado em caldo YEPG por sete dias, mantidos sob agitação constante de 150 rpm em agitador orbital, em seguida, o meio cultivado foi centrifugado a 1400g por 7 minutos, descartando-se o sobrenadante e recolhendo-se a massa de células. Após este cultivo foram preparadas suspensões na concentração de 10 g L<sup>-1</sup>, utilizando-se da massa de células fresca e de água destilada.

O cultivo da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi efetuado em placas de Petri, contendo meio AN, mantidos em BOD a 27 °C por 48 horas. Após este cultivo preparou-se suspensão bacteriana em solução salina (0,85%) com concentração ajustada a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, com base em curva de concentração bacteriana previamente elaborada a 580 nm em espectrofotômetro.

Os tratamentos foram aplicados três vezes, aos 31, 45 e 62 DAE (dias após emergência) para a safra da seca (2014/2015) e aos 31, 51 e 65 DAE para a safra das águas (2015/2016), com o auxílio de um borrifador manual, aplicando-se em toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total dos trifólios, evitando-se atingir o ponto de escorrimento.

As inoculações com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foram realizadas aos 46 DAE para a safra da seca (2014/2015) e aos 51 DAE para a safra das águas (2015/2016), com o auxílio de um borrifador manual, inoculando-se em toda parte aérea da planta, até o ponto de molhamento total dos trifólios, evitando-se atingir o ponto de escorrimento.

Avaliou-se a severidade do crestamento bacteriano comum e variáveis relacionadas a produção como número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de mil grãos e produtividade.

As avaliações de severidade do crestamento bacteriano comum foram realizadas em dez trifólios, escolhidos aleatoriamente, de diferentes plantas, com o auxílio da escala diagramática para crestamento bacteriano comum em feijoeiro, proposta por Diaz et al. (2001).

Estas avaliações foram realizadas aos 31, 38, 45, 52, 62, 72 e 80 DAE para a safra da seca (2014/2015) e aos 35, 46, 51, 60, 65 e 74 DAE para a safra das águas (2015/2016).

Com os valores de severidade do crestamento bacteriano comum, nos períodos avaliados, foi construída a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pela metodologia proposta por Shaner e Finney (1977).

Para avaliação do número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de mil grãos selecionou-se aleatoriamente 20 plantas após a colheita, a qual ocorreu aos 89 DAE para a safra da seca (2014/2015) e aos 113 DAE para a safra das águas (2015/2016), e se procedeu as devidas avaliações.

A produtividade foi obtida através da colheita da área útil, a qual compreendeu uma área de 6,75 m<sup>2</sup> para a safra da seca (2014/2015) e 5,40 m<sup>2</sup> para a safra das águas (2015/2016), utilizando-se as três linhas centrais de cada parcela, descartando-se 1,0 m de cada borda, e estimando-se a produtividade em kg ha<sup>-1</sup>.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

Para a avaliação de produção de compostos voláteis e não voláteis por leveduras e também para o efeito das leveduras sobre o desenvolvimento de crestamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro em casa de vegetação, os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e posteriormente agrupadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Para a avaliação do efeito das leveduras sobre o desenvolvimento de crestamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro a campo: safra da seca (2014/2015) e também da safra das águas (2015/2016), os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e posteriormente as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Foram obtidos 48 isolados a partir de tecidos foliares e seis a partir de tecidos florais. Foi possível a identificação de 42 dos 54 isolados, sendo identificados oito gêneros e dez espécies de leveduras. O gênero mais abundante foi o *Rhodotorula*, com 12 isolados. Os demais gêneros foram *Brettanomyces* (um isolado), *Candida* (cinco isolados), *Cryptococcus* (sete isolados) *Pichia* (cinco isolados), *Sporidiobolus* (cinco isolados), *Sporobolomyces* (um isolado) e *Zygoascus* (seis isolado).

As espécie mais abundante foi a *Rhodotorula glutinis*, com oito isolados identificados. As demais espécies identificadas foram *Brettanomyces custersianus* (um isolado), *Candida albicans* (cinco isolados), *Cryptococcus laurentii* (sete isolados), *Pichia guilliermondii* (três isolados), *Pichia pini* (dois isolados), *Rhodotorula aurantiaca* (quatro isolados) *Sporidiobolus johnsonii* (cinco isolados), *Sporobolomyces roseus* (um isolado) e *Zygoascus hellenicus* (seis isolados).

Fuentefria (2004), utilizando as técnicas de “Imprinting” e de isolamento de leveduras balistosporogênicas, obteve 84 isolados de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (yeast-like fungi), sendo estes isolados, obtidos a partir do filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.

Landell (2006) realizou o isolamento de leveduras a partir do filoplano de bromélias e endofíticas a estas, obtendo um total de 182 isolados, sendo estes, 178 provenientes do filoplano e quatro endofíticas. Destes isolados, 143 eram leveduras, 36 eram fungos leveduriformes e três eram algas do gênero *Prototheca*. Os 143 isolados de leveduras foram classificados como pertencentes a 58 espécies.

Realizando o isolamento de leveduras a partir de folhas de figueiras, Mautone (2008) obteve um total de 175 isolados, sendo estes, 125 leveduras verdadeiras e 50 fungos semelhantes a leveduras. Os 125 isolados de leveduras foram classificados como pertencentes a 42 espécies.

Deste modo podemos observar a abundância de espécies de leveduras presentes nos diferentes ecossistemas. Estas leveduras, bem como os demais

microrganismos, endofíticas ou presentes no filoplano, são responsáveis por manterem o equilíbrio natural da microbiota presente nas espécies vegetais. Quando estes têm seus níveis populacionais alterados como ocorre em sistemas de agricultura convencional pelo uso de pesticidas agrícolas, há redução da população e, por consequência, redução da competição neste ambiente, o que facilita o estabelecimento de população de patógenos nocivos aos tecidos vegetais permitindo a ocorrência de doenças.

#### 4.2 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS POR LEVEDURAS E TESTE DE PAREAMENTO

A produção de compostos voláteis pode ser observada em 47 dos 54 isolados. Destes 47 isolados que apresentaram produção de compostos voláteis e que foram capazes de reduzir, *in vitro*, o desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, os níveis de produção foram variados, sendo estes, divididos em oito grupos, conforme apresentado na Tabela 3.

No grupo “h” se encontra o tratamento testemunha, portanto, os demais isolados que se encontram neste grupo não apresentam produção de compostos voláteis com potencial de reduzir o desenvolvimento de colônias do patógeno. Neste grupo, além da testemunha, se encontram os isolados *C. laurentii* AH 07-1, *R. glutinis* AH 14-3, AH 10-1, AH 09-2, AH 06-1, AH 13-2 e AH 13-1.

Já no grupo “a” estão os isolados com produção de compostos voláteis com maior potencial de redução do desenvolvimento de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Neste grupo são encontrados seis isolados: *S. johnsonii* AH 16-1; *R. aurantiaca* AH 14-2; *R. aurantiaca* AH 15-4; *R. glutinis* AH 19-1; *R. glutinis* AH 17-3 e AH 19-4, os quais apresentaram redução de 84,87, 79,41, 78,99, 78,15, 77,31 e 76,89%, respectivamente.

Os demais isolados também produziram compostos voláteis com potencial de reduzir o desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, no entanto, em níveis variados, que vão desde uma redução de 12,18% até uma redução de 68,07%.

**Tabela 3.** Número de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em placas de Petri, submetidas ao teste de compostos voláteis com isolados de leveduras

Isolados de leveduras	Número de colônias	Redução (%) <sup>1</sup>
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 16-1	9,00 a <sup>2</sup>	84,87
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 14-2	12,25 a	79,41
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 15-4	12,50 a	78,99
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 19-1	13,00 a	78,15
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 17-3	13,50 a	77,31
AH 19-4	13,75 a	76,89
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 18-2	19,00 b	68,07
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 05-2	19,00 b	68,07
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-2	20,5 b	65,55
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 02-1	21,75 c	63,45
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-3	22,00 c	63,03
<i>Candida albicans</i> AH 11-2	22,50 c	62,18
<i>Pichia pini</i> AH 18-3	22,75 c	61,76
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-1	24,75 c	58,40
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 03-1	25,00 c	57,98
AH 12-22	26,75 d	55,04
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-4	27,75 d	53,36
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-2	28,00 d	52,94
<i>Candida albicans</i> AH 11-3	28,75 d	51,68
AH 08-2	29,25 d	50,84
<i>Candida albicans</i> AH 10-3	30,00 d	49,58
AH 08-3	30,00 d	49,58
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-4	32,35 d	45,63
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 05-5	33,75 d	43,28
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-3	34,75 e	41,60
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 12-3	36,00 e	39,50
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-2	36,25 e	39,08
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 12-1	37,25 e	37,39
<i>Candida albicans</i> AH 09-1	37,50 e	36,97
AH 11-1	38,50 e	35,29
<i>Pichia pini</i> AH 15-3	38,75 e	34,87
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 01-1	38,75 e	34,87
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-1	39,75 e	33,19
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2	41,00 f	31,09
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-1	41,00 f	31,09
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 07-2	42,25 f	28,99

Continua...

...Continuação Tabela 3

AH 08-1	43,50	f	26,89
<i>Sporobolomyces roseus</i> AH 15-5	43,75	f	26,47
<i>Brettanomyces custersianus</i> AH 20-2	44,50	f	25,21
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-2	44,75	f	24,79
AH 12-21	47,75	g	19,75
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 20-3	47,75	g	19,75
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-1	48,00	g	19,33
<i>Candida albicans</i> AH 05-3	50,25	g	15,55
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 04-1	50,75	g	14,71
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 18-1	50,75	g	14,71
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 17-4	52,25	g	12,18
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 07-1	53,50	h	10,08
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 14-3	54,50	h	8,40
AH 10-1	56,00	h	5,88
AH 09-2	56,25	h	5,46
AH 06-1	56,75	h	4,62
AH 13-2	57,00	h	4,20
AH 13-1	57,25	h	3,87
Testemunha	59,50	h	0,00
CV (%)	10,97		
Média geral	35,90		

<sup>1</sup>Redução (%) comparada com o tratamento testemunha; <sup>2</sup>Agrupamento realizado com base no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Com relação a produção de compostos não voláteis, pode observar-se que todos os isolados tiveram alguma produção deste compostos, porém, em níveis variados, e que estes possuem potencial para reduzir, *in vitro*, o desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Considerando-se a média dos três diferentes métodos de avaliação, estes isolados foram divididos em 13 grupos com diferentes níveis de atuação, conforme apresentado na Tabela 4.

No grupo “m” encontra-se apenas o tratamento testemunha. Por outro lado, na outra extremidade da Tabela 4, encontra-se o grupo “a”, o qual é representado apenas pelo isolado *R. glutinis* AH 20-1, sendo que este apresentou redução no número de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em 62,85%.



...Continuação Tabela 4

<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2	90,75	i	24,95
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-4	91,00	i	24,74
AH 08-2	91,83	i	24,06
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-2	92,34	i	23,64
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 20-3	93,92	i	22,33
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 14-2	94,08	i	22,20
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-2	99,34	j	17,85
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 18-1	100,42	j	16,95
<i>Candida albicans</i> AH 11-2	101,92	j	15,71
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 17-4	105,33	k	12,89
AH 06-1	108,92	l	9,92
AH 12-21	111,17	l	8,06
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 07-2	111,34	l	7,92
AH 13-1	111,75	l	7,58
AH 10-1	112,00	l	7,38
AH 09-2	112,25	l	7,17
AH 13-2	113,58	l	6,07
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-4	114,00	l	5,72
Testemunha	120,92	m	0,00
CV (%)	3,16		
Média geral	80,66		

<sup>1</sup>Redução (%) comparada com o tratamento testemunha; <sup>2</sup>Agrupamento realizado com base no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância, considerando-se a média dos três métodos.

Os demais isolados também apresentam a produção de compostos não voláteis com potencial de redução no desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, no entanto, em níveis variados, que vão desde uma redução de 5,72% até uma redução de 59%.

Com relação ao teste de pareamento de culturas, não foi observada presença de halo de inibição para nenhum dos isolados. Este fato pode ser explicado pelo crescimento pouco expressivo de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e das colônias das leveduras.

Não há relato na literatura utilizando método de pareamento de culturas concomitantemente com leveduras e com bactérias, desta forma, o resultado não pôde ser comparado.

Conforme Rezende et al. (2010) os compostos orgânicos voláteis são produtos do metabolismo de microrganismos, que se apresentam na forma gasosa

ou possuem alta pressão de vapor. Estes compostos geralmente possuem baixa massa molecular, são ativos em baixas concentrações e podem pertencer a diversas classes químicas como hidrocarbonetos, terpenos, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, cetonas, derivados de enxofre e compostos aromáticos. A diversidade de compostos orgânicos voláteis é muito grande, devido a grande diversidade de microrganismos e produção em proporções variadas.

Fialho et al. (2010), estudando a produção de compostos voláteis pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, concluíram que a mesma produz compostos orgânicos voláteis antimicrobianos, constituídos principalmente por álcoois.

Toffano (2010), pesquisando sobre compostos voláteis que inibem o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, *in vitro*, 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.

De acordo com Fialho et al. (2010), um dos possíveis mecanismos de ação dos compostos orgânicos voláteis atuantes sobre o patógeno é a redução da síntese de proteínas e 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 potencial no controle de organismos de importância agrônômica.

Assim sendo, pode se determinar que leveduras que produzem compostos voláteis e não voláteis são capazes de reduzir o desenvolvimento de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* *in vitro*, podendo assim, ser consideradas como promissoras agentes de controle biológico deste patógeno.

No entanto, conforme Silva (2008), a inexistência de correlação entre resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* é amplamente relatada, deste modo, levando a possibilidade de que a indução de resistência possa ser, em alguns casos, um mecanismo ocorrente nos trabalhos que buscam o biocontrole de doenças, inclusive as que ocorrem no feijoeiro.

Sendo assim, isto não significa necessariamente que o efeito obtido *in vitro* se repetirá no patossistema feijoeiro - *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, visto que, neste caso, há interferência do substrato onde os microrganismos se desenvolvem, de um meio de cultivo rico em nutrientes para o filoplano da planta.

Além disto, em um campo de produção, a influência do ambiente é de extrema importância, bem como o sistema de produção empregado e os manejos e produtos utilizados neste sistema.

#### 4.3 EFEITO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM CASA DE VEGETAÇÃO

Os resultados observados nas folhas primárias das plantas, onde houve a aplicação das leveduras como agentes de biocontrole, e a inoculação do patógeno, indicam um grupo de leveduras que apresentaram redução na severidade da doença, indicando que seus mecanismos de ação podem estar relacionados a antibiose e/ou competição.

Ao observar a AACPD nestas folhas primárias (Tabela 5), os isolados foram divididos em dois grupos, “a” com 32 isolados e “b” com 22 isolados mais a testemunha.

Deste modo, pode se inferir que os isolados que se encontram no grupo “b” não apresentaram efeito no controle do crestamento bacteriano comum na folha primária, com a inoculação do patógeno.

Alguns dos isolados que integram o grupo “b” apresentaram AACPD maior que o tratamento testemunha, sendo a maior elevação do isolado *C. laurentii* AH 04-1, o qual elevou em 102,70% a AACPD. Ainda no grupo “b” o isolado que apresentou menor AACPD foi o isolado AH 13-1, o qual apresentou AACPD 5,99% menor que o tratamento testemunha, para esta variável.

Todos isolados que se encontram no grupo “a” apresentaram redução na AACPD, em condições de casa de vegetação. *Rhodotorula glutinis* AH14-3 apresentou a maior redução na AACPD, reduzindo esta em 79,57%.

O isolado do grupo “a” que apresentou menor redução da AACPD foi o AH 11-1, o qual reduziu em 11,60% esta variável. Os demais isolados presentes neste grupo apresentaram redução da AACPD que variou de 12,41% até 57,38%.

**Tabela 5.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas primárias de feijoeiro tratadas com leveduras

Tratamento	AACPD	Variação (%) <sup>1</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 14-3	5,76 a <sup>2</sup>	79,57 <sup>R</sup>
<i>Candida albicans</i> AH 05-3	12,02 a	57,38 <sup>R</sup>
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 16-1	13,23 a	53,09 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2	13,28 a	52,91 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-1	13,28 a	52,91 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 18-1	13,81 a	51,03 <sup>R</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 18-2	15,21 a	46,06 <sup>R</sup>
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-2	15,88 a	43,69 <sup>R</sup>
<i>Sporobolomyces roseus</i> AH 15-5	17,81 a	36,84 <sup>R</sup>
<i>Candida albicans</i> AH 09-1	18,29 a	35,14 <sup>R</sup>
<i>Pichia pini</i> AH 15-3	18,30 a	35,11 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 14-2	18,49 a	34,43 <sup>R</sup>
AH 12-22	18,82 a	33,26 <sup>R</sup>
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 20-3	19,06 a	32,41 <sup>R</sup>
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 01-1	19,91 a	29,40 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 07-2	20,63 a	26,84 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-4	20,80 a	26,24 <sup>R</sup>
AH 06-1	20,95 a	25,71 <sup>R</sup>
AH 12-21	21,08 a	25,25 <sup>R</sup>
AH 19-4	21,78 a	22,77 <sup>R</sup>
AH 08-3	22,68 a	19,57 <sup>R</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-3	22,98 a	18,51 <sup>R</sup>
AH 09-2	23,20 a	17,73 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-2	23,46 a	16,81 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-1	23,48 a	16,74 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-4	23,51 a	16,63 <sup>R</sup>
<i>Candida albicans</i> AH 10-3	23,91 a	15,21 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-1	23,98 a	14,96 <sup>R</sup>
<i>Brettanomyces custersianus</i> AH 20-2	24,12 a	14,47 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 12-1	24,47 a	13,23 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 17-3	24,70 a	12,41 <sup>R</sup>
AH 11-1	24,93 a	11,60 <sup>R</sup>
AH 13-1	26,51 b	5,99
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 03-1	27,49 b	2,52
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-3	27,68 b	1,84
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 15-4	27,82 b	1,35

Continua...

...Continuação Tabela 5

Testemunha	28,20	b	0,00
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-1	28,25	b	0,18
<i>Candida albicans</i> AH 11-3	28,30	b	0,35
AH 08-1	28,66	b	1,63
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 19-1	28,80	b	2,13
<i>Candida albicans</i> AH 11-2	30,03	b	6,49
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 07-1	31,57	b	11,95
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-2	32,64	b	15,74
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 12-3	33,48	b	18,72
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-2	33,63	b	19,26
<i>Pichia pini</i> AH 18-3	33,71	b	19,54
AH 10-1	33,87	b	20,11
AH 13-2	34,55	b	22,52
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 02-1	34,77	b	23,30
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 05-5	35,25	b	25,00
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 05-2	36,31	b	28,76
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 17-4	37,39	b	32,59
AH 08-2	40,22	b	42,62
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 04-1	57,16	b	102,70
CV (%)	46,29		
Média geral	25,09		

<sup>1</sup>Varição (%) comparada com o tratamento testemunha; <sup>2</sup>Agrupamento realizado com base no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; <sup>R</sup>Redução (%) da AACPD comparada com o tratamento testemunha.

Com relação aos resultados observados no primeiro trifólio (Tabela 6), onde não houve aplicação das leveduras, apenas do patógeno, os resultados demonstram haver uma gama de isolados de levedura promissores para serem utilizados como possíveis agentes indutores de resistência em plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum, visto que, como não há contato entre as leveduras e o patógeno, o modo de ação para o controle foi, possivelmente, a indução de resistência sistêmica da planta.

Neste trifólio, considerando a AACPD, os isolados foram divididos em três grupos, “a” com 35 isolados, “b” com 17 isolados mais a testemunha e “c” com dois isolados.

Os isolados do grupo “b” não apresentaram resultados satisfatórios para uma possível indução de resistência de plantas de feijoeiro ao crestamento

bacteriano comum, porém, estes isolados também não propiciaram uma indução de suscetibilidade da doença.

**Tabela 6.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em trifólios de feijoeiro de plantas tratadas com leveduras na folha primária

Tratamento	AACPD	Varição (%) <sup>1</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 14-3	4,34 a <sup>2</sup>	86,10 <sup>R</sup>
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 16-1	7,96 a	74,50 <sup>R</sup>
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 01-1	8,21 a	73,70 <sup>R</sup>
AH 12-22	9,91 a	68,26 <sup>R</sup>
<i>Brettanomyces custersianus</i> AH 20-2	11,53 a	63,07 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-1	12,22 a	60,86 <sup>R</sup>
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-2	12,56 a	59,77 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-1	12,94 a	58,55 <sup>R</sup>
<i>Candida albicans</i> AH 05-3	14,17 a	54,61 <sup>R</sup>
AH 08-3	14,42 a	53,81 <sup>R</sup>
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-2	14,50 a	53,56 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 15-2	15,20 a	51,31 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-1	15,57 a	50,13 <sup>R</sup>
<i>Pichia pini</i> AH 15-3	16,46 a	47,28 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 18-1	16,48 a	47,21 <sup>R</sup>
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 07-1	17,06 a	45,36 <sup>R</sup>
AH 10-1	17,15 a	45,07 <sup>R</sup>
<i>Candida albicans</i> AH 10-3	17,15 a	45,07 <sup>R</sup>
<i>Sporobolomyces roseus</i> AH 15-5	17,30 a	44,59 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 07-2	17,63 a	43,53 <sup>R</sup>
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 12-1	17,87 a	42,76 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 19-1	18,39 a	41,10 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 17-3	18,40 a	41,06 <sup>R</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-3	18,78 a	39,85 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 14-2	19,92 a	36,19 <sup>R</sup>
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 05-2	20,08 a	35,68 <sup>R</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 16-2	20,51 a	34,30 <sup>R</sup>
AH 12-21	20,59 a	34,05 <sup>R</sup>
AH 09-2	20,94 a	32,93 <sup>R</sup>
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 17-4	21,02 a	32,67 <sup>R</sup>
AH 11-1	21,03 a	32,64 <sup>R</sup>

Continua...

...Continuação Tabela 6

<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 15-4	21,39	a	31,49 <sup>R</sup>
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 17-1	21,43	a	31,36 <sup>R</sup>
<i>Pichia pini</i> AH 18-3	21,59	a	30,85 <sup>R</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> AH 18-2	21,73	a	30,40 <sup>R</sup>
AH 13-2	22,69	b	27,32
<i>Candida albicans</i> AH 09-1	23,34	b	25,24
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2	23,85	b	23,61
AH 13-1	24,04	b	23,00
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 14-4	24,43	b	21,75
<i>Candida albicans</i> AH 11-2	24,47	b	21,62
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 20-3	24,55	b	21,36
<i>Candida albicans</i> AH 11-3	25,16	b	19,41
AH 08-1	25,94	b	16,91
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 03-1	26,79	b	14,19
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 19-3	26,85	b	14,00
AH 06-1	27,04	b	13,39
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 04-1	28,12	b	9,93
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 20-4	28,99	b	7,14
AH 19-4	29,12	b	6,73
Testemunha	31,22	b	0,00
AH 08-2	31,27	b	0,16
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 02-1	32,85	b	5,22
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 05-5	38,74	c	24,09 <sup>E</sup>
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 12-3	48,67	c	55,89 <sup>E</sup>
CV (%)	43,81		
Média geral	20,81		

<sup>1</sup>Varição (%) comparada com o tratamento testemunha; <sup>2</sup>Agrupamento realizado com base no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância; <sup>R</sup>Redução (%) da AACPD comparada com o tratamento testemunha; <sup>E</sup>Elevação (%) da AACPD comparada com o tratamento testemunha.

Neste grupo “b” a variação da AACPD foi desde uma elevação desta em 5,22%, até uma redução de 27,32%, no entanto, todos os isolados presentes neste grupo não apresentaram efeito na variável em questão, visto que, neste grupo está presente a testemunha, sem nenhum agente de controle, portanto, sem nenhum efeito na redução da doença.

Os isolados que se encontram no grupo “a” apresentaram resultado positivo quanto a uma possível indução de resistência das plantas no controle desta doença,

sendo que, neste trifólio, *Rhodotorula glutinis* AH14-3 apresentou a maior redução na AACPD, reduzindo em 86,10% esta variável.

O tratamento com menor redução da AACPD, porém presente no grupo “a”, ou seja, com uma possível indução de resistência foi o *Pichia guilliermondii* AH 18-2, o qual apresentou redução da variável em 30,40%. Os demais tratamentos presentes neste grupo apresentaram redução da AACPD que variou de 30,85% até 74,50%.

O grupo “c”, onde estão presentes os isolados *Zygoascus hellenicus* AH 05-5 e *Rhodotorula aurantiaca* AH12-3 apresentaram uma elevação da AACPD, possivelmente induzindo a suscetibilidade da planta ao patógeno. O isolado *Z. hellenicus* AH 05-5 elevou a AACPD em 24,09% enquanto que *Rhodotorula aurantiaca* AH12-3 apresentou uma elevação de 55,89% na variável.

O potencial das leveduras como agentes de controle biológico já vem a algum tempo sendo demonstrado, principalmente, em estudos conduzidos com *S. cerevisiae*.

Piccinin et al. (2005), trabalhando com a *S. cerevisiae* observaram que, na cultura do sorgo, o tratamento com esta levedura mostrou-se protetor contra *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose, reduzindo em mais de 90% a AACPD.

Em outro estudo com esta levedura, Mello et al. (2011) observaram que o uso desta leveduras para controle da podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em couve-chinesa era ocorrente, e que a aplicação de *S. cerevisiae* reduziu a AACPD desta doença em 39,3% em casa de vegetação e 15,7% a campo.

No entanto, Gouvea et al. (2009), trabalhando com a cultura do morangueiro, observaram que aplicação de *S. cerevisiae* não resultou no controle da mancha de micosphaerela (*Micosphaerella fragariae*), porém, para a mancha de dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) as aplicações de *S. cerevisiae* se mostraram eficientes no controle, reduzindo em 31% a AACPD da incidência desta doença.

Zanardo et al. (2009) observaram que a levedura *S. cerevisiae* apresenta eliciadores que induzem a resistência em plântulas de pepino a antracnose, no entanto, para que se apresente tal efeito, o extrato bruto desta levedura necessita passar por uma autoclavagem para extração destas moléculas eliciadoras de

resistência, deste modo reduzindo em aproximadamente 75% a severidade desta doença.

França et al. (2015) observaram que as leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula aurantiaca* reduziram as lesões causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão, com redução de aproximadamente 35% no diâmetro da lesão.

Os resultados encontrados por França et al. (2015) corroboram com os resultados observados no presente trabalho, visto que, determinados isolados de *R. glutinis* e de *R. aurantiaca* foram capazes de reduzir a severidade do cretamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro.

No entanto, a aplicação de *R. aurantiaca* AH 12-3 na folha unifoliada da planta elevou a severidade da doença no primeiro trifólio, o que indica que esta pode deixar a planta mais suscetível ao ataque dos patógenos, possivelmente, por reduzir a produção de mecanismos de defesa da planta ou por ter papel associativo com a bactéria na colonização dos tecidos vegetais e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença.

Também corroboram com o presente trabalho os resultados encontrados por Melo et al. (2015), onde cepas de *R. aurantiaca* e *R. glutinis* apresentaram eficiência na proteção de mudas de melão a mancha bacteriana dos frutos, causadas por *Acidovorax citrulli*, sendo que, esta primeira levedura teve eficiência na redução da AACPD em 58,6%.

Deste modo, pode-se evidenciar que microrganismos, em especial as leveduras, tem grande potencial para serem utilizadas como agentes de controle biológico de doenças em plantas e como indutoras de resistência, no entanto, ainda devem ser melhor estudadas, principalmente no que diz respeito a influência destas em condições de campo, visto que o ambiente exerce grande influência na interação das leveduras com a planta, podendo ou não causar efeito de controle biológico ou a indução de resistência contra o cretamento bacteriano comum.

Com base neste teste realizado em casa de vegetação foram selecionados seis isolados de leveduras para serem testado a campo.

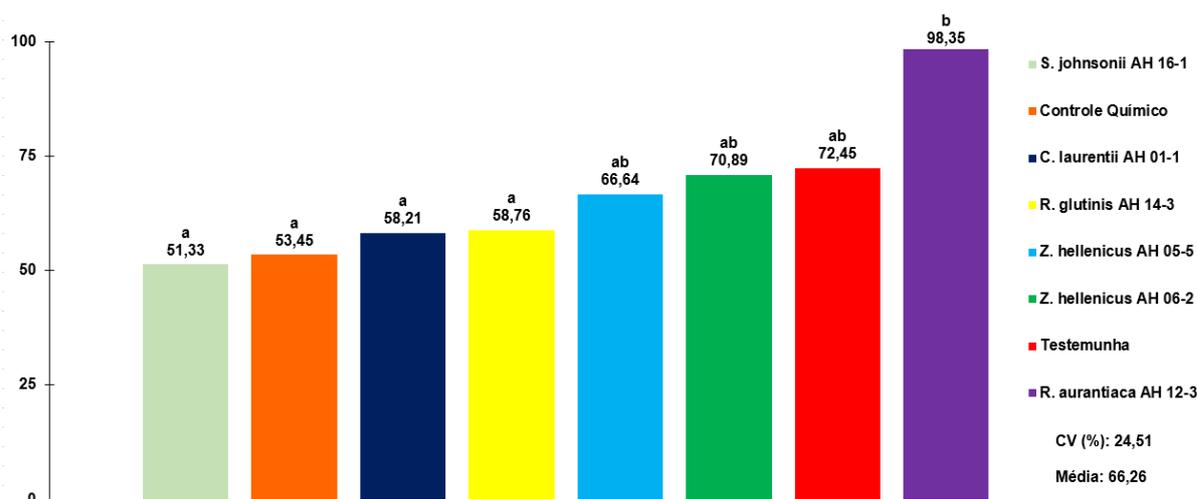
Selecionou-se os três isolados com maior redução da AACPD no primeiro trifólio (com possível ação de indução de resistência), o isolado com maior redução da AACPD na folha primária, porém, sem redução desta variável no primeiro trifólio

(atuando diretamente sobre o patógeno) e também dois isolados que apresentaram indução de suscetibilidade do feijoeiro ao patógeno.

Deste modo, foram selecionados os isolados *Rhodotorula glutinis* AH 14-3, *Sporidiobolus johnsonii* AH 16-1, *Cryptococcus laurentii* AH 01-1, *Zygoascus hellenicus* AH 06-2, *Zygoascus hellenicus* AH 05-5 e *Rhodotorula aurantiaca* AH 12-3.

#### 4.4 EFEITO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM A CAMPO: SAFRA DA SECA (2014/2015) E SAFRA DAS ÁGUAS (2015/2016)

Na safra da seca (2014/2015) pode-se observar que o tratamento com *Rhodotorula aurantiaca* AH 12-3 apresentou elevação da AACPD de 35,75% em relação a testemunha, no entanto, esta diferença não foi significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância (Figura 2), fato semelhante ao ocorrido em casa de vegetação, visto que nesta a elevação da AACPD foi superior ao encontrado a campo, porém, demonstrando o efeito que este isolado possui em ser um indutor de suscetibilidade ao cretamneto bacteriano comum em plantas de feijoeiro.



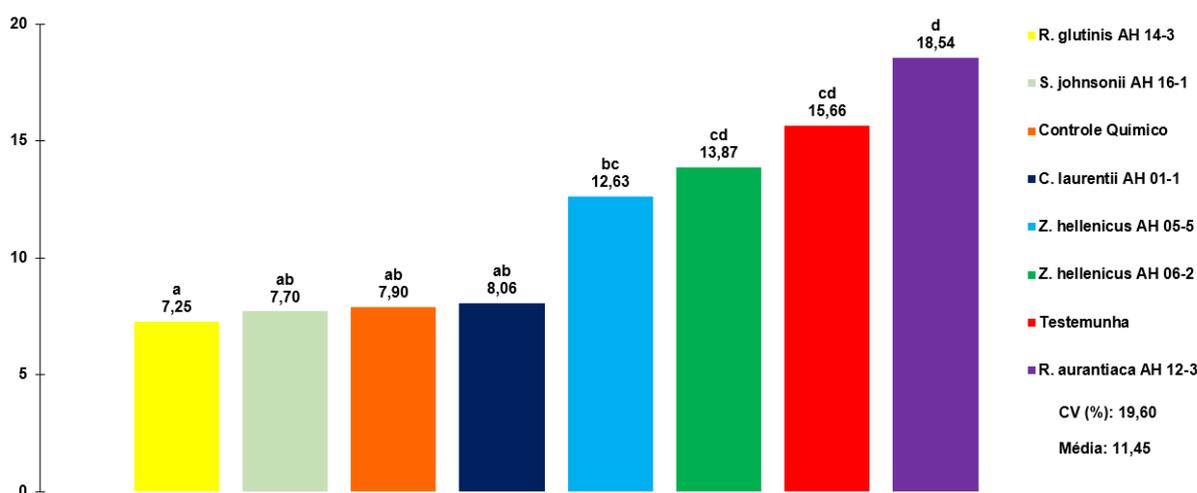
**Figura 2.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra da seca (2014/2015), no período de 21 de março a 24 de junho de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR.

Já *S. johnsonii* AH 16-1 foi o tratamento que apresentou a menor AACPD, reduzindo em 29,15% a AACPD, no entanto, esta diferença também não foi significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância (Figura 2), fato também semelhante ao ocorrido em casa de vegetação, apesar de que nesta a redução da AACPD foi mais elevada.

Pode-se observar nestes resultados que *R. aurantiaca* AH 12-3 apresenta elevação da AACPD quando comparada com os tratamentos *S. johnsonii* AH 16-1, Controle Químico, *C. laurentii* AH 01-1 e *R. glutinis* AH 14-3, no entanto, esta não difere dos tratamentos testemunha, *Z. hellenicus* AH 06-2 e *Z. hellenicus* AH 05-5, conforme apresentado na Figura 2.

No entanto, no cultivo da seca, os valores de temperatura e umidade relativa do ar foram baixos, o que não propicia uma elevada severidade da doença, pois estas condições ambientais não são favoráveis ao patógeno e consequentemente há uma baixa incidência e severidade da doença.

Na safra das águas (2015/2016) o tratamento com *R. aurantiaca* AH 12-3 também apresentou maior AACPD, confirmando-se assim que este isolado apresenta efeito de promotor do crescimento bacteriano comum, elevando a AACPD das plantas tratadas com este isolado, conforme observado na Figura 3.



**Figura 3.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra das águas (2015/2016), no período de 1º de setembro a 30 de dezembro de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR.

O isolado *R. glutinis* AH 14-3 foi o tratamento que apresentou a menor AACPD, novamente demonstrando que este isolado, assim como em casa de

vegetação e na safra da seca (2014/2015), apresenta efeito positivo no controle do crestamento bacteriano comum, reduzindo a AACPD das plantas de feijoeiro tratadas.

O tratamento com *R. glutinis* AH 14-3 foi semelhante aos tratamentos *S. johnsonii* AH 16-1, Controle Químico e *C. laurentii* AH 01-1, conforme apresentado na Figura 3, sendo que estes apresentaram redução da AACPD em 53,70, 50,83, 49,55 e 48,53%, respectivamente, em relação à testemunha, indicando deste modo, efeito positivo no controle do crestamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro.

Os tratamentos com os isolados *Z. hellenicus* AH 05-5 e *Z. hellenicus* AH 06-2 apresentaram redução de 19,35 e 11,43% na AACPD, respectivamente, e o tratamento com *R. aurantiaca* AH 12-3 apresentou elevação de 18,39% na AACPD, sendo que, estes três tratamentos foram semelhantes a testemunha, portanto, demonstrando não haver efeito de controle da doença. O efeito de suscetibilidade ao crestamento bacteriano comum, nas plantas tratadas com estes isolados, também não foi observado.

Ao se analisar os dados referentes aos dois estudos pode-se constatar que as plantas de feijoeiro tratadas com os isolados *R. glutinis* AH 14-3, *S. johnsonii* AH 16-1 e *C. laurentii* AH 01-1 apresentam tendência de redução da AACPD do crestamento bacteriano comum, apesar disto ter sido demonstrado de maneira mais expressiva na safra das águas, justamente onde o patógeno encontra condições mais favoráveis para o seu desenvolvimento, assim, conseqüentemente apresentando uma maior incidência e severidade da doença.

Hoffmann et al. (2012) observaram que plantas de feijoeiro cultivadas na safra das águas (2011/2012) e tratadas com a levedura *S. cerevisiae* apresentaram redução na severidade do crestamento bacteriano comum em aproximadamente 40% para a cultivar IPR-139 e em aproximadamente 45% para a cultivar IAPAR 81, porém, isto não refletiu na produtividade, sendo que esta foi semelhante a testemunha.

Já Müller (2011), trabalhando com *Saccharomyces boulardii*, não observou redução na severidade do crestamento bacteriano comum em feijoeiros em nenhuma das épocas de cultivo estudadas, sendo que este trabalhou na safra da seca (2008/2009), safra das águas (2009/2010) e também na safra da seca (2009/2010). Porém, este desenvolveu sua pesquisa em sistema agroecológico,

sendo considerado ambiente equilibrado, deste modo, mesmo a testemunha (água) teve baixa severidade da doença.

Corroboram com os resultados encontrados pelo autor acima citado o trabalho de Machado e Bettioli (2010) onde estes observaram que o manejo de lírios sem o uso de agrotóxicos propicia uma elevada população de leveduras, em especial *Sporidiobolus pararoseus*, sendo esta, um potencial agente para a redução da incidência e severidade de *Botrytis cinerea*, sendo que, em sistemas de produção com o uso de agrotóxicos a população de leveduras tende a zero.

Sendo assim, pode-se evidenciar que as leveduras são organismos de grande potencial a serem empregados no controle biológico do cretamento bacteriano comum em feijoeiros.

Com relação as variáveis relacionadas a produção, referentes a safra da seca (2014/2015), as quais são apresentadas na Tabela 7, pode-se observar que ocorreram pequenas alterações nestas, conforme a aplicação dos tratamentos.

**Tabela 7.** Vagens por planta, grãos por vagem e massa de mil grãos de feijoeiro cv. Iapar 81, na safra da seca (2014/2015), submetidos ao tratamento com leveduras, no município de Marechal Cândido Rondon – PR, 2015

TRATAMENTO	Vagens planta <sup>-1</sup>	Grãos vagem <sup>-1</sup>	Massa de mil grãos (g)
Testemunha	8,58 a <sup>*</sup>	3,34 b	239,33 a
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 01-1	5,35 b	3,13 b	206,58 ab
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 05-5	7,71 a	3,75 ab	197,24 ab
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2	8,25 a	3,68 ab	204,58 ab
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 12-3	7,86 a	3,65 ab	199,50 ab
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 14-3	8,20 a	3,48 ab	201,56 ab
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 16-1	7,75 a	4,05 a	194,40 ab
Controle químico	7,33 ab	3,73 ab	192,15 b
CV (%)	12,37	7,32	9,63
Média Geral	7,63	3,60	204,42

\*Média seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

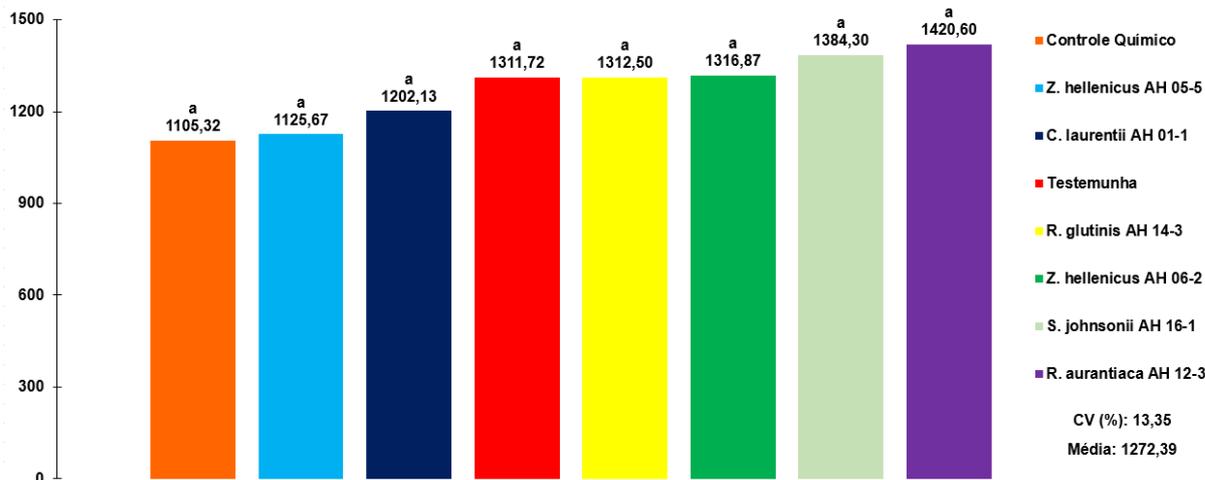
Com relação ao número de vagens por planta, o tratamento Controle Químico foi o único que apresentou redução desta variável quando comparado a testemunha, esta redução foi de 14,57%, os demais tratamentos foram semelhantes

a testemunha. Portanto, nenhum dos tratamentos aplicados apresentou elevação no número de vagens por planta.

Para a variável grãos por vagem, o tratamento *S. johnsonii* AH 16-1 foi o único que apresentou elevação desta variável, quando comparado com a testemunha, com elevação de 21,26%, os demais tratamentos foram semelhantes a testemunha, deste modo, nenhum dos tratamentos aplicados apresentou redução no número de grãos por vagens.

Com relação a massa de mil grãos, o tratamento Controle Químico foi o único que apresentou redução desta variável quando comparado a testemunha, esta redução foi de 19,71%, os demais tratamentos foram semelhantes a testemunha. Sendo assim, nenhum dos tratamentos aplicados apresentou elevação no número de vagens por planta.

Estas alterações nas variáveis acima citadas não interferiram na produtividade dos feijoeiros tratados com leveduras na safra da seca (2014/2015), conforme apresentado na Figura 4.



**Figura 4.** Produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) de feijoeiro, inoculados com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra da seca (2014/2015), no período de 21 de março a 24 de junho de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR.

O tratamento Controle Químico apresentando produção 15,74% menor que a testemunha, já o tratamento *R. aurantiaca* AH 12-3 apresentou elevação de 8,30% em comparação com a testemunha, no entanto, nenhum dos tratamentos aplicados apresentou diferença de produtividade pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Ao se relacionar a variável produtividade com a AACPD, para a mesma safra, pode observar-se que o tratamento *R. aurantiaca* AH 12-3 foi o que apresentou a maior produtividade e também a maior AACPD. Deste modo, indicando que a planta possa ter deixado de investir energia na defesa ao crescimento bacteriano comum para usar esta em produção.

O tratamento com *S. johnsonii* AH 16-1 foi o que apresentou a menor AACPD e obteve a segunda maior produtividade, isto indica que, o custo metabólico para a planta se defender do patógeno foi inferior ao ganho em produção gerado, possivelmente pelo fato da planta apresentar maior área fotossintética e conseqüentemente maior geração de energia.

A menor produtividade foi observada no tratamento controle, o qual apresentou a segunda menor AACPD, demonstrando assim que nem sempre o controle da doença significa incremento na produção.

Com relação as variáveis relacionadas a produção, referentes a safra das águas (2015/2016), as quais são apresentadas na Tabela 8, pode-se observar que ocorreram alterações apenas na variável grãos por vagem, conforme a aplicação dos tratamentos.

**Tabela 8.** Vagens por planta, grãos por vagem e massa de mil grãos de feijoeiro cv. Iapar 81, na safra das águas (2015/2016), submetidos ao tratamento com leveduras, no município de Marechal Cândido Rondon – PR, 2015

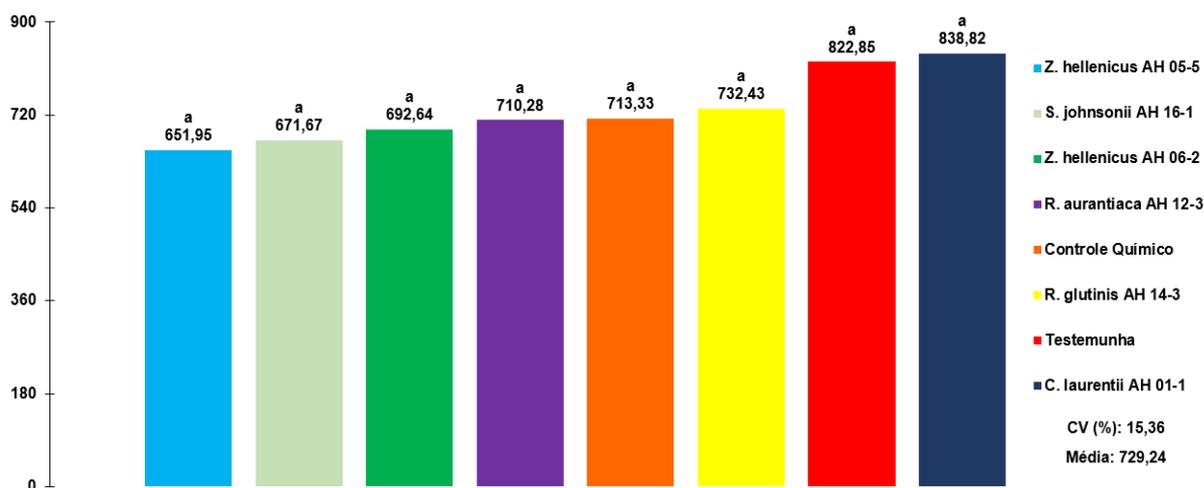
TRATAMENTO	Vagens planta <sup>-1</sup>	Grãos vagem <sup>-1</sup>	Massa de mil grãos (g)
Testemunha	8,74 a*	1,27 ab	303,70 a
<i>Cryptococcus laurentii</i> AH 01-1	9,03 a	1,32 a	294,91 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 05-5	8,39 a	1,08 b	293,89 a
<i>Zygoascus hellenicus</i> AH 06-2	7,93 a	1,18 ab	305,12 a
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> AH 12-3	8,21 a	1,19 ab	302,24 a
<i>Rhodotorula glutinis</i> AH 14-3	8,49 a	1,18 ab	305,60 a
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> AH 16-1	7,58 a	1,22 ab	297,95 a
Controle	8,18 a	1,19 ab	303,19 a
CV (%)	10,45	7,82	5,56
Média Geral	8,32	1,20	300,82

\*Média seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

O número de vagens por planta e a massa de mil grãos não foram alterados devido a aplicação dos tratamentos, sendo todas as médias semelhantes de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

O tratamento das plantas com a aplicação do isolado de leveduras *C. laurentii* AH 01-1 apresentou maior número de grãos por vagem que as plantas tratadas com *Z. hellenicus* AH 05-5, no entanto, ambas foram semelhantes a testemunha. O tratamento com *C. laurentii* AH 01-1 elevou em 3,94% o número de grãos por vagem quando comparado com a testemunha, já *Z. hellenicus* AH 05-5 reduziu em 14,96% esta variável.

A produtividade de plantas de feijoeiro tratadas com leveduras na safra das águas (2015/2016) não sofreu alteração devido a aplicação das leveduras, conforme apresentado na Figura 5.



**Figura 5.** Produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) de feijoeiro, inoculados com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, cultivados na safra das águas (2015/2016), no período de 1º de setembro a 30 de dezembro de 2015, no município de Marechal Cândido Rondon – PR.

O tratamento com *Z. hellenicus* AH 05-5 obteve a menor produtividade, apresentando redução de 20,77% em relação a testemunha, já o tratamento com *C. laurentii* AH 01-1 foi o que apresentou a maior produtividade, com elevação de 1,94% em comparação com a testemunha, no entanto, nenhum dos tratamentos aplicados apresentou diferença de produtividade pelo teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância.

Ao se relacionar a variável produtividade com a AACPD, para a mesma safra, pode observar-se que o tratamento testemunha apresentou a segunda maior

AACPD, no entanto, também apresentou a segunda maior produtividade, demonstrando assim que mesmo sobre altos níveis de doença a cultura do feijoeiro pode apresentar boas produtividades.

Já o tratamento *S. johnsonii* AH 16-1 foi o que apresentou a segunda menor AACPD e obteve também a segunda menor produtividade, demonstrando assim, que em algumas situações o controle da doença pode implicar em menor produção, visto que a planta utiliza energia para seu sistema de defesa e deixa de utilizar esta para a produção de grãos.

Conforme Kuhn et al. (2006) as plantas possuem um sistema de defesa latente, que pode ser ativado, com a finalidade de economizar energia, deste modo, a defesa contra fitopatógenos apresentará custo energético apenas na presença deste, no entanto, o uso de indutores de defesa por repetidas vezes, em doses mais elevadas e principalmente na ausência do patógeno pode apresentar efeito negativo no que se refere a produção.

As plantas que utilizam seus recursos energético em uma situação onde estas tem seu sistema de defesa ativado na ausencia do agente patogenico arcarão com os custos energéticos, o que pode refletir na redução da sua produtividade (KUHN et al., 2010).

Hoffmann et al (2012) observaram que plantas de feijoeiro da cultivar Iapar 81, quando submetidas ao tratamento com células das leveduras *S. cerevisiae* ou *S. boulardii* apresentavam maior massa de mil grãos em relação a testemunha, no entanto outras variáveis relacionadas a produção se mantiveram inalteradas em função do uso de leveduras, inclusive a produtividade, a qual não sofreu alteração tanto para a cultivar Iapar 81 quanto para a cultivar IPR 139, ambas avaliadas neste estudo.

Já Müller (2011) não observou nenhuma alteração nas variáveis relacionadas a produção, incluindo-se a produtividade, com o uso da *S. boulardii* em plantas de feijoeiro, em nenhuma das três safras estudadas (safra da seca 08/09, safra das águas 09/10 e safra da seca 09/10).

Deste modo, podemos observar que as leveduras apresentam grande potencial como agentes de controle biológico do cretamento bacteriano comum, no entanto este ainda deve ser melhor estudado, para que assim se possa melhorar o seu desempenho e evitar que estes organismos causem redução nas produtividades em condições de baixas severidades de doença.

Alguns pontos que ainda devem ser melhor estudados para que se possa empregar as leveduras como agentes de controle do crescimento bacteriano comum são, a espécie a ser utilizada, o isolado da espécie em questão, modos de aplicação, concentração e volume de aplicação, formas de armazenamentos, dentre outros pontos que ainda estão por serem elucidados.

Outro fator de grande importância a ser levado em consideração no uso de leveduras como agentes de controle biológico é o clima e o ambiente onde estas serão aplicadas, se é possível sobreviver nestas condições e se este favorece o desenvolvimento tanto do patógeno como também das leveduras.

## 5 CONCLUSÕES

Todos os 54 isolados apresentaram, *in vitro*, produção de compostos não voláteis capazes de reduzir o desenvolvimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Dos 54 isolados, 47 apresentaram produção de compostos voláteis, *in vitro*, e foram capazes de reduzir o desenvolvimento de colônias do patógeno. Já no teste de pareamento de culturas não foi observada presença de halo de inibição para nenhum dos isolados.

Em casa de vegetação, 35 isolados apresentaram controle do crestamento bacteriano comum. Os isolados *Zygoascus hellenicus* AH 05-5 e *Rhodotorula aurantiaca* AH12-3 promoveram uma indução de suscetibilidade a doença.

Os isolados *Cryptococcus laurentii* AH 01-1, *Rhodotorula glutinis* AH 14-3 e *Sporidiobolus johnsonii* AH 16-1 apresentaram redução da AACPD de crestamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro cultivadas a campo, no entanto, o controle desta doença não resultou no incremento de produtividade.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Brasília, v.46, n.9, p.979-984, 2011.

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: princípios e conceitos**. Quarta edição. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2011. v.1, cap.9, p. 367-388.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. Quarta edição. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap.37, p.333-349.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Editora FEALQ, 2005. v.13, cap.1, p.11-28.

CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre. On-line. Disponível em <<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BiolomicsID.aspx?IdentScenario=Yeast%20species%20online%20ID>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

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**, Londrina, 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.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. On-line. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&ordem=produto&Pagina\\_objcmsconteudos=2#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&ordem=produto&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos)>. Acesso em: 22 dez. 2015.

CRONQUIST, A. **Devolution and classification of flowering plants**, New York: Botanical Garden, 555p. 1988.

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.

DIAZ, C.G.; BASSANEZI, R.B.; BERGAMIM FILHO, A. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, n.1, p.35-39, 2001.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 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**, Uberlândia, v.31, n.2, p.451-459, 2015.

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

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**, Vitoria da Conquista, v.27, n.4, p.527-533, 2009.

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

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**, Cascavel, v.5, n.4, p.8-23, 2012.

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.; 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**, Botucatu, 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.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; CARDOSO FILHO, J.A.; PORTZ, R.L.; OSSWALD, W. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.251-302, 2006.

LANDELL, M. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã-Viamão/RS**. 2006. 127 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. On-line. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 22 dez. 2015a.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. On-line. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 22 dez. 2015b.

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. 113 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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.

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**, Vitória da Conquista, 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**, Brasília, v.40, p.56-64, 2015.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap.1, p. 07-14.

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

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. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem do patógeno. In AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. 2011.

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.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; LOBO JÚNIOR, M.; WENDLAND, A. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In CARNEIRO, J.E.S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. cap.7, p. 270-299.

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

REZENDE, D.C.; FIALHO, M.B.; SARRIA, G.A.; BLUMER, S.; TOFFANO, L.; PASCHOLATI, S.F. Compostos orgânicos voláteis fúngicos no controle de fitopatógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.18, p.276-302, 2010.

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.; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C.; OLIVEIRA, V.A.; OLIVEIRA, J.B.; COELHO, M.R.; LUMBRERAS, J.F.; CUNHA, T.Y.F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Segunda edição. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v.67, p.1051-1056, 1977.

SILVA, E.G.; MOURA, A.B.; DEUNER, C.C.; FARIAS, D.R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Ceres**, Viçosa, v.55, n.5, p.377-383, 2008.

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 e Technology**, v.47, p.39-49, 2016.

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.

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. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba.

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

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**, Brasília, v.44, n.11, p.1499-1503, 2009.