

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

**JEFERSON CARLOS CARVALHO**

**POTENCIAL DAS LEVEDURAS *RHODOTORULA GLUTINIS* E *SPORIDIOBOLUS JOHNSONII* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PHASEOLI*, NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO E NA ATIVAÇÃO DE ROTAS METABÓLICAS LIGADAS À INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2020**

**JEFERSON CARLOS CARVALHO**

**POTENCIAL DAS LEVEDURAS *RHODOTORULA GLUTINIS* E *SPORIDIOBOLUS JOHNSONII* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. PHASEOLI*, NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO E NA ATIVAÇÃO DE ROTAS METABÓLICAS LIGADAS À INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA**

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

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

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2020**

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

Carvalho, Jeferson Carlos  
POTENCIAL DAS LEVEDURAS *Rhodotorula glutinis* E  
*Sporidiobolus johnsonii* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE  
*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, NA PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO E NA ATIVAÇÃO DE ROTAS METABÓLICAS  
LIGADAS A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA / Jeferson Carlos  
Carvalho; orientador(a), Odair José Kuhn; coorientador(a),  
José Renato Stangarlin, 2020.  
85 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências  
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Fitopatologia. 2. Controle Biológico de Doenças em  
Plantas. 3. Indução de Resistência. 4. Promoção de  
Crescimento de Plantas. I. Kuhn, Odair José. II.  
Stangarlin, José Renato . III. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

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

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

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

Marechal Cândido Rondon - PR.



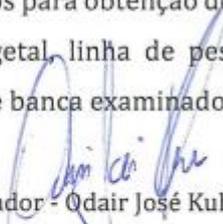
**PARANÁ**

GOVERNO DO ESTADO

## JÉFERSON CARLOS CARVALHO

Potencial das leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii* no controle biológico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, na promoção do crescimento do feijoeiro e na ativação de rotas metabólicas ligadas a indução de resistência

Tese apresentada à distância, de forma síncrona e por videoconferência, conforme Resolução nº 052/2020 – CEPE, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle Alternativo, APROVADO pela seguinte banca examinadora:

  
Orientador - Odair José Kuhn

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

Gilberto Costa Braga

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

Vandeir Francisco Guimarães

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

Sérgio Florentino Pascholati

Universidade de São Paulo (USP)

Clair Aparecida Vicelli

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)



A Deus, pelo dom da vida, pois sem ele nada seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e iluminar em cada passo para construção do conhecimento.

A minha esposa Maria Cristina Carvalho, por me ajudar, apoiar e sempre estar ao meu lado.

Aos meus filhos Ana Letícia Carvalho e Gabriel Augusto Carvalho, grande fonte de inspiração, para buscar melhorar e chegar mais longe a cada dia.

Aos meus pais Paulo Roberto Carvalho e Beatriz Scain Carvalho, que sempre me apoiaram, incentivando e ajudando nos estudos.

Aos meus avós Vergilino Scain (*in memoriam*), Ondina Scain e Ana (*in memoriam*), que sempre deram forças para seguir a caminhada.

A minha irmã Josiane, cunhado Cristiano e afilhado Miguel, pelo incentivo e ajuda em toda a caminhada acadêmica.

Aos meus sogros Arciso Feiten (*in memoria*) e Ilse Rifel Feiten, por sempre incentivar e apoiar.

Aos meus cunhados Affonso Celso Gonçalves Junior, Rosmarina Feiten Gonçalves e sobrinhas Isabela e Cecilia que sempre ajudaram nesta caminhada.

Ao prof. Dr. Odair José Kuhn, pela valiosa orientação, sempre bem preparado a ajudar, dando conselhos valiosos, pelas correções e incentivo.

Ao prof. Dr. José Renato Stangarlin, por aconselhar, indicar o caminho do conhecimento e aconselhando para melhorar o trabalho.

Ao prof. Dr. Gilberto Costa Braga, pelo auxílio e conhecimentos valiosos com a cromatografia, ao contrário não seria capaz de realizar este trabalho.

A profa. Dra. Clair Aparecida Viecegli, por todos os seus ensinamentos, conselhos e incentivo para eu trilhar este caminho.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Unioeste, por fornecer o conhecimento necessário.

Aos amigos Guilherme, Anderson, Nicanor, Livia, Eloisa, Danielle, Marta, Tatiane, Noelle, Shirlene, Gabriela, Letícia, Ana, Renata, Rayssa e Gustavo, por incentivar, pelas conversas, conselhos e toda a ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelo apoio e auxílio nesta caminhada.

A Unioeste pelo suporte de estrutura, material e colaboradores, que auxiliaram nesta caminhada, que não seria possível sem estes.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A Faculdade de Ensino Superior de Marechal Cândido Rondon – ISEPE Rondon, representados pelo Diretor Geral Prof. João César Silveira Portela e diretor acadêmico Prof. Me. Tiago Fernando Hansel, pela oportunidade de iniciar a carreira na docência como coordenador e professor do curso de Engenharia de Produção.

Enfim. Obrigado a cada um que auxiliou de alguma forma, para que este momento se concretizasse.

**A todos o meu muito obrigado!**

Cada momento é único, e ao lado da nossa família e amigos, cada passo em direção de nossos sonhos se torna mais sólido e especial.

## RESUMO

CARVALHO, Jeferson Carlos, M. S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, março– 2020. **POTENCIAL DAS LEVEDURAS *Rhodotorula glutinis* E *Sporidiobolus johnsonii* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO E NA ATIVAÇÃO DE ROTAS METABÓLICAS LIGADAS À INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.** Orientador: Odair José Kuhn. Coorientador: José Renato Stangarlin.

A presente pesquisa teve por objetivo identificar os mecanismos atuantes no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* por *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii*. Para verificar ação direta contra o fitopatógeno, foi avaliado o efeito da produção de compostos voláteis e não voláteis antimicrobianos pelas leveduras *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii* (AH 16-1) sobre o crescimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* *in vitro*. Para avaliar o efeito na promoção de crescimento do feijoeiro, foi realizado experimento com o cultivar de feijão IPR Tuiuiú, em câmara de crescimento. Foram testadas as leveduras *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *S. johnsonii* (AH 16-1) através de suspensão de células (5 g L<sup>-1</sup>) e os respectivos filtrados de cultura, aplicando-se água como controle. Também foi realizada análise de teores de fitohormônios sintetizados pelas leveduras, em HPLC-MS. Além da avaliada a indução de resistência pela determinação da concentração de ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico por HPLC-PAD. Amostras foram coletadas em 0, 3, 6, 24, 27 e 30 horas após o tratamento. Os resultados evidenciaram redução da multiplicação de células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em 50,9%, 45,7% e 28,3%, em função de compostos voláteis de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii* (AH 16-1), respectivamente. Obteve-se incremento de 39,7% na altura de planta, com aplicação de filtrado de cultura de *S. johnsonii* (AH 20-1) e 42,7% de incremento na área foliar em plantas tratadas com células de *R. glutinis* (AH 14-3). Para a massa seca de parte aérea os tratamentos que apresentaram maior acúmulo foram com aplicação de células de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de *R. glutinis* (AH 14-3) e células *R. glutinis* (AH 20-1), apresentando incremento de 33,1%, 33,5% e 29,5% respectivamente. O incremento de massa seca de raiz foi de 27,8% em plantas tratadas com células de *R. glutinis* (AH 14-3). A massa seca total foi incrementada em plantas tratadas com suspensão de células de *R.*

*glutinis* (AH 14-3), filtrado de *R. glutinis* (AH 14-3) e suspensão de células *R. glutinis* (AH 20-1), com 31,8%, 31,3% e 25,4% respectivamente. Os três isolados produziram os fitohormônios ácido 3-indolacético, ácido 3-indol butírico e giberelina (GA4). Os tratamentos com filtrado de *R. glutinis* (AH 20-1), suspensão de células de *S. johnsonii* (AH 16-1) e filtrado de *S. Johnsonii* (AH 16-1) apresentaram incremento de ácido jasmônico, com 169,4, 183,1 e 175,9  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco após 3 horas. Por outro lado, o incremento do ácido salicílico ocorreu somente 30 horas após a aplicação do tratamento com células de *R. glutinis* (AH 14-3) na concentração de 5,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco. Conclui-se que os isolados de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *S. johnsonii* (AH 16-1) atuam pelos mecanismos de antibiose, através da produção de compostos voláteis, pela promoção de crescimento através da produção e síntese dos fitohormônios auxina e giberelina e induzem à resistência na cultura do feijoeiro, apresentando-se com grande potencial para o controle biológico de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

**Palavras-chave:** Antagonista. Antibiose. Biocontrole. Fitohormônios. *Fabaceae*. *Phaseolus vulgaris*.

## ABSTRACT

CARVALHO, Jeferson Carlos, M.S. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Mês em Inglês – 2020. **BEAN GROWTH PROMOTION, BIOLOGICAL CONTROL OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* AND RESISTANCE INDUCTION METABOLIC PATHWAYS TRIGGERED BY *Rhodotorula glutinis* AND *Sporidiobolus johnsonii* YEASTS STRAINS.** Advisor: Titulação Nome do orientador. Co-Advisors: José Renato Stangarlin.

**Abstract:** Hereupon research aimed at identifying working mechanisms related to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* restrain by *Rhodotorula glutinis* and *Sporidiobolus johnsonii*. Upon identifying a direct action against the pathogen, we evaluated volatile compounds as well as the ones antimicrobials-none volatiles from *R. glutinis* (isolates AH 14-3 e AH 20-1), *S. johnsonii* (isolate AH 16-1) over *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* in vitro growth. In order to evaluate growth promotion on bean plants (IAPAR Tuiuiú) they were leaded under chamber growth conditions. For each isolate it was performed cell suspension (5 g L<sup>-1</sup>) as well as the respective culture filtrates, having water as control. Also, Analysis on phytohormone levels synthesized by yeasts was performed using HPLC-MS beyond resistance induction through determination of jasmonic acid, methyl jasmonate and salicylic acid concentration using HPLC-PAD technique. Samples were collected after 0, 3, 6, 24, 27 and 30 hours from treatment establishment. Results stand for cell multiplication decrease at 50,9%, 45,7% and 28,3% due to volatile compounds from *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) and *S. johnsonii*, respectively. Beyond an increase around 40% on plants height under the influence of culture filtrates from *S. johnsonii* and over 40% of foliar area extent under *R. glutinis* (AH 14-3) cells appliance. Concerning to dry matter of the aerial part cell appliance of *R. glutinis* (AH 14-3), culture filtrates from *R. glutinis* (AH 14-3) and cell appliance of *R. glutinis* (AH 20-1) got the best results which were 33,1%, 33,5% and 29,5%, respectively. Root dry matter increase was around 27% for bean plants treated with cells of *R. glutinis* (AH 14-3). In turn, total dry matter was increased in plants treated under cell suspension of *R. glutinis* (AH 14-3), culture filtrates from *R. glutinis* (AH 14-3) and cell suspension of *R. glutinis* (AH 20-1), reaching 31,8%, 31,3% e 25,4%, respectively. All isolates were able to produce 3-indolacetic acid, 3-indole butyric acid and gibberellin (GA4). Culture filtrate from *R. glutinis* (AH 20-1), cell suspension of *S. johnsonii* and culture filtrate from *S. Johnsonii* displayed jasmonic

acid increment of 169,4, 183,1 and 175,9  $\mu\text{g g}^{-1}$  fresh tissue passed three hours from treatments apply. On the other hand, salicylic acid increase only took place after 30 hours from *R. glutinis* (AH 14-3) cell suspension at 5,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  fresh tissue concentration. In short, the isolates *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) and *S. johnsonii* acted in conformity with antibiosis mechanisms once they produced volatiles substances, induced resistance in bean crop besides phytohormones production and synthesis of auxin and gibberellin. For all these reasons such strains presented an outstanding ability over biological control of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

**Keywords:** Antagonist; Antibiosis; Biocontrol; Phytormone; Fabaceae; *Phaseolus vulgaris*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito de compostos não voláteis sintetizados pelas leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1), *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1), sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, com 48 horas.....35
- Figura 2.** Cromatografia de camada delgada para separação de compostos presentes em filtrados de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1), *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1), revelada com luz ultra violeta (UV, onda longa 400 – 320 nm) (A) e pelo método biológico utilizando suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em 0,100 de absorbância, a 580 nm (B).....36
- Figura 1.** Parâmetros de crescimento na última avaliação para o de número de folhas (A), Altura (B), Área Foliar (C), Massa Seca de Parte Aérea (D), Massa Seca de Raiz (E) e Massa Seca Total (F) de plantas de feijoeiro tratados com células de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), células *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1), filtrado de cultura de *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1), células de *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1), filtrado de cultura de *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) e controle (H<sub>2</sub>O).....48
- Figura 1.** Cromatogramas, com os tempos de retenção dos padrões de ácido salicílico (5,707 min) (A), ácido jasmônico (7,524 min) (C) e metil jasmonato (8,291 min) (E). Espectros de absorção, com o pico máximo, dos padrões de ácido salicílico (220 nm) (B), ácido jasmônico (216 nm) (D) e metil jasmonato (216 nm) (F).....68
- Figura 2.** Cromatogramas dos extratos de folhas de *Phaseolus vulgaris* evidenciando os picos de ácido salicílico (1), ácido jasmônico (2) e metil jasmonato (3). Figura A refere-se ao comprimento de onda 220 nm; Figura B refere-se ao comprimento de onda 216 nm.....69
- Figura 3.** Síntese de ácido jasmônico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em folha de feijoeiro tratada com células e filtrado de cultura das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) (↑). Aplicação dos tratamentos no tempo 0 e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 24 horas após (↑).....71
- Figura 4.** Síntese de metil jasmonato ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em folha de feijoeiro tratada com células e filtrados de cultura das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) (↑). Aplicação dos tratamentos

no tempo 0 e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 24 horas após (↑).....74

**Figura 5.** Síntese de ácido salicílico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em folha de feijoeiro tratada com células e filtrado de cultura das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) (↑). Aplicação dos tratamentos no tempo 0 e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 24 horas após (↑).....75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de células de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em atmosfera contendo compostos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3), <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-1) e <i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 16-1).....	32
<b>Tabela 1.</b> Área abaixo da curva de crescimento vegetal do feijoeiro, para as variáveis altura de plantas, área foliar (AF), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST), de plantas tratadas com células de <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3), filtrado de cultura de <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3), células <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-1), filtrado de cultura de <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-1), células de <i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 16-1), filtrado de cultura de <i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 16-1).....	47
<b>Tabela 2.</b> Produção de fitohormônios pelas leveduras <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3), <i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-1), <i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 16-1).....	49
<b>Tabela 1.</b> Parâmetros de validação para determinação de ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico em folhas de feijoeiro.....	70
<b>Tabela 2.</b> Recuperação dos analitos, ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico pelo método proposto empregando HPLC-PDA.....	70

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO: CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS MEDIADO POR LEVEDURAS E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO .....</b>	<b>3</b>
2.1	INTRODUÇÃO .....	4
2.2	CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS .....	6
<b>2.2.1</b>	<b>Mecanismos de controle biológico .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Indução de resistência .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Promoção de crescimento de plantas.....</b>	<b>10</b>
2.3	LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE .....	11
<b>2.3.1</b>	<b>Leveduras no controle de fungos .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Leveduras no controle de nematoides.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Leveduras no controle de vírus.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Leveduras no controle de bactérias.....</b>	<b>15</b>
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	16
2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1: COMPOSTOS VOLÁTEIS ANTIMICROBIANOS SOBRE <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>PHASEOLI</i> PRODUZIDOS POR <i>RHODOTORULA GLUTINIS</i> E <i>SPORIDIOBOLUS JOHNSONII</i> .....</b>	<b>26</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	27
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
3.4	CONCLUSÃO .....	35
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2: MEDIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO ATRAVÉS DE FITOHORMÔNIOS PRODUZIDOS POR <i>RHODOTORULA GLUTINIS</i> E <i>SPORIDIOBOLUS JOHNSONII</i>. .....</b>	<b>39</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	41
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
<b>4.2.1</b>	<b>Ensaio de promoção de crescimento.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Aplicação dos tratamentos, coletas e variáveis analisadas .....</b>	<b>43</b>

4.2.3	<b>Produção de fitohormônio por <i>Rhodotorula glutinis</i> e <i>Sporidiobolus johnsonii</i></b>	<b>44</b>
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4.4	CONCLUSÃO .....	53
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
<b>5</b>	<b>ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DE ROTAS METABÓLICAS EM FEIJOEIRO LIGADAS À INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA PELAS LEVEDURAS <i>RHODOTORULA GLUTINIS</i> E <i>SPORIDIOBOLUS JOHNSONII</i>.....</b>	<b>59</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	61
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
5.2.1	Condução do ensaio de indução de ácido jasmônico, ácido salicílico e metil jasmonato .....	63
5.2.2	Tratamento e inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .....	64
5.2.3	Extração dos marcadores bioquímicos de indução de resistência ..	65
5.2.4	Análise dos marcadores bioquímicos de indução de resistência em HPLC-PAD	65
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
5.4	CONCLUSÃO .....	76
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O controle biológico de doenças em plantas visa inibir ou atrasar a entrada de um patógeno no tecido de uma planta, através de um microrganismo antagonista, normalmente não patogênico ao homem e às plantas, conseqüentemente, reduzindo a severidade da doença e seu impacto na produtividade da cultura.

Os microrganismos antagonistas possuem os mecanismos como antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo e predação. Além disso, mecanismos auxiliares que atuam no desenvolvimento vegetal como a indução de resistência e promoção do crescimento, os quais vão interferir de forma direta ou indireta nas ações dos fitopatógenos e no desenvolvimento das doenças, assim, conferindo maior segurança, sem deixar resíduos e apresentando vários mecanismos, dificultando a seleção de patógenos resistentes.

Um grupo de microrganismos que apresenta grande potencial para o controle biológico são as leveduras. Elas podem ser residentes do filoplano, possuem ampla adaptabilidade a alterações de umidade e temperatura sobre a superfície da planta, estabilidade genética e rápida reprodução. Possuem a capacidade de produzir compostos antimicrobianos, voláteis e não-voláteis, com alta toxicidade aos patógenos. Além disso pode sintetizar fitohormônios que regulam o crescimento de plantas, atuando como mecanismo compensatório. São organismos que, competem por espaço e nutriente sobre a superfície da planta, e podem induzir mecanismos de resistência da própria planta.

Esse método pode ser utilizado para o controle de bactérias fitopatogênicas, haja vista que estas são de difícil controle, como é o caso da *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Vauterin et al. (1995). Esta bactéria é agente causal do cretamento bacteriano comum do feijoeiro, que acarreta uma grande redução de produtividade da cultura sob condições favoráveis, chegando até a inviabilização do seu cultivo.

Para se identificar quais os mecanismos que estão atuando no controle biológico são utilizados métodos *in vitro*, para identificação da produção de compostos antimicrobianos que interferem no desenvolvimento do fitopatógeno. Métodos cromatográficos são usados para identificar e quantificar a produção de fitohormônios pelas leveduras e a ativação de defesas em plantas através do aumento de

substâncias com função de sinalização para desencadear o processo de resistência, como é o caso do ácido salicílico e ácido jasmônico.

A presente pesquisa tem por objetivo monitorar a produção de compostos antimicrobianos para *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, promoção de crescimento vegetativo e síntese de fitohormônios e indução de resistência por *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii*.

## 2 REVISÃO: CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS MEDIADO POR LEVEDURAS E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

**Resumo:** A presente revisão possui o objetivo de discorrer sobre os mecanismos de controle biológico de doenças em plantas mediados por leveduras, para reforçar a importância de métodos biológicos de controle de doenças em plantas. O controle biológico de doenças em plantas ocorre através da utilização de microrganismos antagonistas para o controle de microrganismos fitopatogênicos, apresentando-se como um novo e promissor nicho de mercado para os próximos anos. Métodos biológicos possuem amplo espectro de controle devido à expressão de vários mecanismos simultaneamente. Esses mecanismos são representados pela antibiose, que se dá através da produção de um ou mais compostos antimicrobianos, competição por espaço e nutrientes, parasitismo, em que o antagonista se beneficia do fitopatógeno, predação, cujo antagonista se alimenta do fitopatógeno retirando os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento por ingestão. Ainda, na promoção de crescimento, o agente de biocontrole favorece o desenvolvimento das plantas, seja através da interação por disponibilidade de água, nutrientes, produção de enzimas e fitohormônios. E, por fim, a indução de resistência, na qual os microrganismos antagonistas atuam como indutor, ativando mecanismos de defesas latentes da planta. O controle pode ocorrer através de um mecanismo ou pelo sinergismo entre vários mecanismos. Entre os microrganismos estudados para o controle biológico de doenças temos as leveduras, as quais apresentam características desejáveis para um agente de biocontrole, como resistência a condições ambientais adversas, rápida e fácil multiplicação, compatibilidade com demais métodos de controle, estabilidade genética, não patogênico ao homem e planta, entre outros. Na literatura já se têm trabalhos com a utilização de leveduras para o controle biológico de doenças causadas por fungos, nematoides, vírus e bactérias, demonstrando o potencial do seu uso como antagonista no controle biológico de doenças de plantas. Considerando que se tem buscado métodos de controle de doenças de plantas com menor impacto ambiental, apresentando segurança alimentar, agregando valor ao produto e que apresente bons resultados, o controle biológico de doenças utilizando leveduras se apresenta com grande potencial.

**Palavras-chave:** Antagonista, antibiose, indução de resistência, promoção de crescimento, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Phaseolus vulgaris*.

**Abstract:** Upon doing this review we argued biological control mechanisms over plant diseases triggered by yeasts with a view to reinforce their importance. For biological control to occur in plants antagonist microorganisms are employed to activate inner mechanisms which has been shown off a new promising niche for the coming years. Biological methods present wide range control inasmuch several mechanisms are activated at once. It is noticeable through antibiosis: antimicrobial substance(s) production, competition for room and nutrient, parasitism when the antagonist prevails over the phytopathogen, predation when the antagonist nourish itself from phytopathogen by ingestion, growth promotion on plants when the antagonist turns better water and nutrients accessibility, further phytohormones and enzymes production. Even more interesting, antagonists may act as inducers of latent defense mechanisms in plants. Due to several mechanisms started at once control occurs desirably. For biocontrol, yeasts present optimum characteristics including resistance to adverse environmental conditions, rapid and easy multiplication, compatibility with other control methods, genetic stability, non-pathogenicity to man and plant so on. Over the literature there are successful works based on this to control diseases caused by fungi, nematodes, viruses and bacteria. Once we currently face challenges associated to plants diseases control having in mind the need of less environmental impact, food security, product value aggregation and good results attached, biological control using yeasts has become a remarkable tool for future.

**Key-words:** Antagonist, antibiosis, resistance induction, growth promotion, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Phaseolus vulgaris*.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o controle biológico de doenças em plantas vem crescendo muito por conta dos resultados obtidos em pesquisas e a replicação destes em condições de campo, apresentando-se como uma ferramenta com grande potencial para auxiliar no controle de doenças. Este ocorre pela utilização de microrganismos antagonistas, não patogênicos ao homem e às plantas, que interfere direta ou

indiretamente no desenvolvimento, ou fisiologia do microrganismo fitopatogênico, resultando em controle ou atraso do seu desenvolvimento.

Este método de controle pode auxiliar no manejo de doenças de plantas, haja vista que atua por diversos mecanismos de controle, com amplo espectro de fitopatógenos. Este controle pode durar desde dias até o ciclo todo da cultura e não possui residual tóxico ao meio ambiente e ao homem.

Os antagonista pode atuar no controle biológico de doenças através de um ou mais mecanismos, de forma isolada ou em sinergia, aumentando as chances de controle das doenças. Tal fator, também passa maior segurança, por reduzir o risco de seleção de fitopatógenos resistêntes, o que inviabilizaria a sua utilização. Sendo fungos e bactérias, os microrganismos mais utilizados e pesquisados como antagonistas.

Um grupo de microrganismos com grande potencial para uso como agente de controle biológico de doenças são as leveduras. Tratam-se de fungos unicelulares, capazes de suportar alterações drásticas de temperatura e umidade, comuns na superfície das folhas. São de fácil multiplicação, manuseio, aplicação e compatíveis a outros métodos de controle.

As leveduras podem realizar o controle biológico através da produção de compostos tóxicos aos patógenos. Estes vão atuar inibindo ou retardando o desenvolvimento do agente fitopatogênico. Além disso, são capazes induzir resistência, sendo reconhecido pelas plantas, desencadeando uma cascata de reações através de rotas metabólicas secundárias (vias de sinalização através da síntese de ácido salicílico e do ácido jasmônico), culminando na produção de defesas pela planta.

O agente de biocontrole também pode promover o crescimento de plantas através da produção exógena de fitohormônios, agindo como mecanismo de compensação, pois pode aumentar a altura da planta, número de folhas, área foliar e volume radicular, melhorando a absorção de água e nutrientes e aumentando a fotossíntese e, conseqüentemente, refletindo na produtividade.

Diante do exposto a presente revisão de literatura tem por objetivo discorrer sobre os mecanismos de controle biológico de doenças em plantas mediados por leveduras, para reforçar a importância de métodos biológicos de controle de doenças em plantas.

## 2.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS

O controle biológico de doenças de plantas ocorre pelo emprego de microrganismos antagonistas com grande adaptabilidade para o controle de microrganismo fitopatogênico (ROMEIRO, 2007; MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Os produtos biológicos são aplicados principalmente como inoculante em sementes, mas podem ser também aplicados em raízes, covas, sulcos de semeadura e parte aérea de plantas. São normalmente diluídos em água e aplicados como um produto preventivo (ROMEIRO, 2007; LOBO JÚNIOR; GERALDINE; CARVALHO, 2009). A utilização de microrganismos benéficos, que competem de alguma forma com os agentes causadores de doenças em plantas, vem crescendo.

Nos últimos, anos várias empresas e pesquisadores estão investindo esforços nesta área para descobrir, produzir e inserir no mercado novos produtos, mostrando a grande evolução tanto das pesquisas quanto dos resultados obtidos nessa linha de trabalho (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Atualmente 52 produtos biológicos estão registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) objetivando o controle de doenças fúngicas, nematológicas e bacterianas em plantas (MAPA, 2020). Destes produtos apenas dois estão registrados para o controle de bactérias fitopatogênicas. Existe, então, uma carência de produtos e informações do modo de ação desses para o controle dos agentes fitopatogênicos, visto que, até o presente momento, não há registro de nenhum produto desta natureza para *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, bem como conhecimento de como estes atuam no controle.

### 2.2.1 Mecanismos de controle biológico

Os agentes de controle biológico podem atuar através dos mecanismos de antibiose, competição, parasitismo, predação, promoção de crescimento e indução de resistência (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

A antibiose é um mecanismo pelo qual o antagonista produz compostos antimicrobianos. Estes podem ser voláteis e não voláteis, atuando diretamente sobre o patógeno, alterando a sua fisiologia ou crescimento através da alteração da permeabilidade de membrana plasmática e degradação celular. Esse mecanismo

pode ser comparado com a ação de fungicidas, por apresentar toxicidade ao patógeno (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Os compostos antimicrobianos são sintetizados em baixas concentrações, pelo metabolismo secundário do microrganismo. Apresentam-se como grupos de compostos orgânicos heterogêneos e de baixa massa molecular, que alteram o desenvolvimento e/ou metabolismo de outro microrganismo (THOMASHOW; BONSALL; WELLER, 1997).

Esse mecanismo de controle é amplamente estudado, tendo sido identificado grande número de antibióticos produzido por microrganismos (8.700 antibióticos diferentes), sendo 2.900 produzidos por bactérias e outros 4.900 por fungos (BÉRDY, 2005). Acredita-se que a grande maioria dos antibióticos ainda não foram identificados (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012).

A utilização desses compostos antimicrobianos é considerada um dos mecanismos mais potentes para a competição intraespecífica entre microrganismos, favorecendo o estabelecimento do microrganismo antagonista sobre o sítio de desenvolvimento, em um local com recursos limitados (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012).

No mecanismo de competição, o agente biológico cresce rapidamente sobre a superfície em que se encontra, competindo pelo espaço, conseqüentemente, restringindo o espaço para crescimento do patógeno. Além disso, compete por nutrientes, absorvendo-os rapidamente ou imobilizando-os, não disponibilizando para os patógenos (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Os microrganismos altamente competitivos por nutrientes e espaço, apresentam grande potencial para o controle biológico. Os antagonistas competem por sítios de infecção e nutrientes livres em tecido de plantas, restringindo o desenvolvimento de patógenos (CALVO-GARRIDO et al., 2014; SPADARO; DROBY, 2016).

Outra forma de ação no mecanismo de competição ocorre através da modulação do biofilme de água livre sobre a superfície da planta, pela síntese de biosurfactantes por parte do antagonista, reduzindo a quantidade de água livre sobre a planta, impedindo a infecção da planta pelo patógeno (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019).

Outra alteração importante é o pH no meio em que estão inseridos os microrganismos. No caso de bactérias em pH ótimo para o seu desenvolvimento fica

na faixa de 6,5 e 7,5 e para leveduras varia de 4,0 a 6,5. O desenvolvimento e a modulação do microambiente podem reduzir a infecção e, conseqüentemente, severidade da doença (KUNZ, 2006).

Outro mecanismo de controle biológico é o parasitismo. Neste caso o microrganismo parasita obtém nutrientes necessários para o seu desenvolvimento de outro microrganismo. O caso desta interação que ocorre com outro parasita, microrganismo fitopatogênico, é denominada de hiperparasitismo (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019).

No hiperparasitismo, o microrganismo antagonista é capaz de colonizar as estruturas do patógeno pela produção de enzimas hidrolíticas, reduzindo o inóculo, conseqüentemente, impactando na severidade da doença (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018; GHORBANPOUR et al., 2018).

### **2.2.2 Indução de resistência**

Na indução de resistência o microrganismo antagonista induz a planta a produzir defesas contra patógenos, através do reconhecimento de compostos liberados sobre a superfície da planta. Esse processo pode resultar em mudanças morfológicas na planta, produção de enzimas, proteínas entre outros componentes de defesa desta (LORITO et al., 2010).

Os compostos não voláteis são subprodutos do metabolismo das leveduras, e podem atuar como eliciadores, ativando mecanismos de defesa das plantas (DI PIERO; GARCIA JÚNIOR; TONUCCI, 2005). Eles podem ser de natureza proteica, lipídica, carboidratos, entre outros (WALTERS et al., 2005).

A ativação dos mecanismos de defesa das plantas é promovida após o reconhecimento por receptores específicos, de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), que desencadeiam uma cascata de sinais, resultando na ativação de genes de defesas na planta (CAMARGO, 2018).

A resistência pode ser induzida localmente ou atuar por via sistêmica, em toda a planta. Pode ser denominada de resistência sistêmica adquirida (SAR), normalmente ativada por microrganismos necrotróficos, causando a elevação na concentração de ácido salicílico endógeno da planta. No caso da resistência sistêmica induzida (RSI), esta é ativada por microrganismos saprófitos, provocando a elevação

nas concentrações de ácido jasmônico e etileno (CONRATH et al., 2015; CAMARGO, 2018).

Outro efeito relacionado à indução de resistência é o pré-condicionamento (*priming*), estado em que a planta é induzida, mas não expressa mecanismos de resistência. Os mecanismos de resistência só serão expressos quando a planta reconhecer a presença do patógeno (CRISP et al., 2016; PASCHOLATI; DALIO, 2018). Entretanto, após o reconhecimento os mecanismos de resistência são expressos de forma mais rápida e em maior magnitude (KUHN et al., 2006). Esse fenômeno pode ser considerado um ganho adaptativo, pois se não houver patógeno o custo da indução de resistência não se torna significativo.

As plantas evoluíram suas defesas para dificultar ou impedir a entrada e estabelecimento dos patógenos, sendo essas defesas pré-formadas ou pós-formadas (ANIL; NARAYAN DAS; PODILE, 2014). O agente do controle biológico em muitos casos pode ser capaz de ativar estas defesas.

A indução de resistência ocorre em resposta à ativação da síntese de moléculas de sinalização após o reconhecimento de ataque do patógeno. Esta indução se dá por um microrganismo saprófita ou agente abiótico. Assim, o teor de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno são alterados na indução de resistência, sendo que os dois primeiros são considerados os principais fitohormônios de defesa (CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015).

O ácido salicílico é um fitohormônio com grande importância, que desempenha papel de regulador na germinação, maturidade dos frutos, regulação do desenvolvimento de flores, diferenciação sexual, movimento estomático, além de ser necessário para induzir uma resposta de defesa contra patógenos (RASKIN, 1992). Esse fitohormônio é sintetizado no cloroplasto após a percepção do patógeno ou agente indutor, através da via de síntese do isochorismato (WILDERMUTH et al., 2001).

Os jasmonatos são fitohormônios lipídicos, sintetizados via rota dos octadecanoides (SOARES; MACHADO, 2007; FONSECA et al., 2009). Esses atuam na planta como sinalizador, desencadeando resposta a estresses (ferimentos, exposição a ozônio, déficit hídrico e ataque por patógenos necrotróficos e pragas). Também é importante, possuindo efeito, como inibição da germinação de sementes e pólen, atraso do crescimento de raízes, promoção da ondulação de gavinhas, regulação do acúmulo de proteínas de estoque durante o desenvolvimento das

sementes, além do envolvimento na regulação temporal do crescimento e do desenvolvimento de flores e alguns processos de desenvolvimento da planta (LORENZO; SOLANO, 2004; CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; GOOSSENS et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Essas substâncias endógenas das plantas têm um importante papel no processo de sinalização que regulam os genes de defesa.

A sinalização pode ocorrer por apenas um fitohormônio, se ocorrer a síntese de ácido salicílico, este irá inibir a síntese do ácido jasmônico, enquanto o ácido jasmônico inibe a síntese de ácido salicílico (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009; PIETERSE et al., 2012; SANCHEZ; KAY, 2016; KARAPETYAN; DONG, 2018).

No caso do etileno, este aumenta a produção de inibidores de proteínase induzidos por ácido jasmônico (O'DONNELL et al., 1996; DIEZEL; ALLMANN; BALDWIN, 2011). Além de seu papel na defesa, também é importante na regulação dos processos de desenvolvimento vegetal, atuando no amadurecimento de frutos, senescência e abscisão de flores e folhas (DIEZEL; ALLMANN; BALDWIN, 2011; TAIZ et al., 2017).

A sinalização através do ácido jasmônico possui dois caminhos, que cruzam com outras vias hormonais, justamente do etileno e do ácido abscísico, por meio de fatores de transcrição em comum (KAZAN; MANNERS, 2008; KAZAN, 2015; ZHU; LEE, 2015), culminando na ativação de genes de resposta à defesa contra patógenos.

Esses genes constituem os mecanismos pós-formados, os quais a planta produz após o reconhecimento do eliciador. Estes mecanismos podem ser de natureza estrutural (papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas em aminoácidos hidroxiprolina e glicina, camada de cortiça, camada de abscisão e tiloses) e bioquímica, através de compostos químicos produzidos após a infecção (fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies ativas de oxigênio e fototoxinas) (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

### **2.2.3 Promoção de crescimento de plantas**

A promoção de crescimento de plantas pode ser induzida por diversos microrganismos como rizóbios, micorrizas, *Trichoderma*, bactérias e leveduras. As leveduras são microrganismos saprófitas que podem atuar como promotores de crescimento, interagindo com as plantas e induzindo ou produzindo fitohormônios de crescimento. Também podem disponibilizar nutrientes e/ou troca de metabólitos com

a planta, alterando assim o desenvolvimento destas (MACHADO et al., 2011; KHAN et al., 2012).

Os rizóbios são os mais pesquisados da classe dos microrganismos promotores de crescimento, principalmente pela sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio, mas também por induzir a produção de reguladores de crescimento e solubilização do fosfato entre outros (HERNÁNDEZ, 2015).

No entanto, pesquisas com o viés de promoção de crescimento de plantas por leveduras são recentes e têm demonstrado grande potencial. Sun et al. (2014), trabalhando com 12 linhagens de leveduras isoladas *Drosera indica* L. (planta carnívora), revelaram que todos os isolados produziram o regulador de crescimento ácido indol-3-acético (AIA). Assim indicando que leveduras podem atuar promovendo o crescimento de plantas.

### 2.3 LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

As leveduras são encontradas na microbiota epifítica, endofítica e no solo (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). Estes microrganismos são fungos unicelulares, possuindo formato oval ou esférico, com diâmetro de 2 a 10  $\mu\text{m}$ . A sua colônia possui aspecto úmido, ceroso e pastoso. A sua reprodução é assexuada, por brotamento ou cissiparidade, sendo classificada como Ascomycota (KREGER-VAN RIJ, 1984) ou Basidiomycota para leveduras que apresentam blastósporos, resultado do processo de brotação para formar uma nova célula leveduriforme (TRUJILLO, 2012).

O potencial das leveduras como agente de controle biológico de doenças de plantas, se dá em função destes microrganismos serem geneticamente estáveis, não carecer de nutrientes especiais para rápida multiplicação, possuírem resistência a condições adversas do ambiente onde serão aplicadas, além de serem eficientes contra uma alta gama de patógenos e possuírem uma grande diversidade de gêneros que podem ser explorados (RUIZ-MOYANO et al., 2016)

A utilização de leveduras no controle biológico de doenças apresenta grande potencial e pode se tornar uma alternativa importante para o manejo de doenças em plantas. As leveduras apresentam vários mecanismos de atuação, como a indução de resistência em plantas (ZANARDO; PASCHOLATI; FIALHO, 2009). Também pode ocorrer o controle através da competição por espaço e nutrientes, antibiose ou

parasitismo (MACHADO; BETTIOL, 2010). O que representa um grande e promissor potencial da utilização de leveduras no controle de doenças de plantas.

As leveduras podem ser empregadas como agentes de controle biológico para doenças de parte aérea de plantas, pois na superfície foliar ocorrem rápidas alterações de temperatura e umidade, o que pode comprometer o desenvolvimento de microrganismos. No entanto, as leveduras apresentam resistência a essas condições, além de apresentar rápido crescimento e estabelecimento (MEDEIROS, DA SILVA, PASCHOLATI, 2018).

A utilização de leveduras para o controle biológico de doenças em plantas já foi relatada em estudos para o controle de fungos (ZANARDO; PASCHOLATI; FIALHO, 2009; LIMA et al., 2013; SPADARO; DROBY, 2016; HELING et al., 2017), nematoides (FIALHO et al., 2012; MOKBEL; ALHARBI, 2014; HASHEM; OMRAN; SALLAM, 2008), vírus (LEE et al., 2017) e contra bactérias fitopatogênicas (MELLO et al., 2011; MELO et al., 2015; HELING et al., 2016; LEE et al., 2017).

### **2.3.1 Leveduras no controle de fungos**

Ziedan e Farrag (2011), investigando o controle biológico de *Cercospora beticola*, utilizando leveduras, observaram através de microscopia de varredura a colonização do tecido foliar por *Saccharomyces cerevisiae*, próximo às estruturas do fitopatógeno. Indicando, assim, a utilização dos mecanismos de competição e parasitismo.

Zanardo, Pascholati e Fialho (2009) utilizaram os exsudatos de leveduras para controlar a antracnose no pepino (*Colletotrichum orbiculare*, Syn. *Colletotrichum lagenarium*). Esses exsudatos apresentaram atividade eliciadora, induzindo a defesa de plantas, culminando na redução da severidade da doença.

Na área de alimentos, a levedura *Rhodotorula glutinis* já foi testada para a redução de micotoxina patulina sintetizada por *Penicillium expansum* em maçã. Indicando que *R. glutinis* pode metabolizar e/ou afetar negativamente o acúmulo ou síntese desta micotoxina, além de reduzir a infecção de maçãs por este patógeno (CASTORIA et al., 2005).

O potencial antimicrobiano de carotenoides extraídos de *R. glutinis* foi provado por El-Sheekh et al. (2010) que os adicionaram como suplemento alimentar para ratos. Os ratos alimentados com a adição de carotenoides sobreviveram durante duas

semanas após a infecção com *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, demonstrando o grande potencial deste composto antimicrobiano produzido pela levedura.

Zhang et al. (2008), trabalhando com *R. glutinis* para o controle de *Botrytis cinerea* em pós-colheita nos frutos de pêssego, relataram que a utilização da levedura reduziu em até 69,3% a germinação de esporos do patógeno. Os autores ainda constataram que a combinação de *R. glutinis* com o acibenzolar-S-metil, apresentou incidência de 16,67%, valor consideravelmente menor se comparado com o controle que apresentou 46,67% de incidência, demonstrando o potencial antagônico da levedura.

Heling et al. (2017), observaram que *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*, apresentavam halo de inibição de crescimento micelial e produção de compostos voláteis, restringindo o desenvolvimento de *Colletotrichum musae*. Tal resultado indica que o controle deste patógeno ocorre por meio do mecanismo de antagonismo, já que os autores observaram a redução do progresso da doença em até 48%.

Leveduras também podem ser eficientemente utilizadas na proteção de frutos contra ferimentos, pois no local do ferimento sobre a epiderme da fruta, ocorre competição por carboidratos, quantidades limitadas de nitrogênio e aminoácidos. Nesse caso, as leveduras desempenham papel fundamental nas interações antagônicas, como *Pichia guilliermondii* antagonista contra os patógenos *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *B. cinerea* e *Colletotrichum* spp. em diferentes frutos e *Aureobasidium pullulans* e *P. expansum* em maçã (SPADARO; DROBY, 2016).

Bettiol et al. (2012) relataram a competição por nutrientes presentes em ferimentos de citros (*Citrus* sp.) realizada pela levedura *Candida oleophila* contra *Penicillium digitatum*, de modo que a levedura apresenta rápida multiplicação e colonização, prevenindo a infecção pelo patógeno.

Stangarlin et al. (2010) verificaram que *S. boulardii* e seus derivados, induzem a síntese das fitoalexinas gliceolina em soja e deoxiantocianidinas em sorgo. Compostos estes relacionados à defesa dessas plantas, com características antimicrobianas, demonstrando que as leveduras possuem a capacidade de indução de resistência.

Boava et al. (2010) observaram o efeito de *S. cerevisiae* no controle de ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*), através da indução de resistência. Os autores

observaram o incremento da atividade da enzima peroxidase, além de expressivo aumento na atividade de quitinases.

Ruiz-Moyano et al. (2016) estudaram a eficiência dos isolados *Hanseniaspora opuntiae* L479 e *Metschnikowia pulcherrima* L672, contra *Penicillium expansum*, *Cladosporium cladosporioides* e *B. cinérea*. Observaram que as leveduras apresentaram ação sobre os patógenos através da produção de compostos antimicrobianos e competição por espaço e nutriente.

A utilização de *Pseudozyma aphidis* promove a indução de resistência em *Arabidopsis*, reduzindo o desenvolvimento de *B. cinerea* de forma local e sistêmica. Ação confirmada pela expressão dos genes PR1 (sua função ainda não é bem conhecida) e PDF1.2 (defencina), indicando o efeito *priming* em *Arabidopsis* (BUXDORF; RAHAT; LEVY, 2013). Essa sinalização de defesa é dependente das vias do ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA) (BUXDORF et al., 2013; GAFNI et al., 2015).

### **2.3.2 Leveduras no controle de nematoides**

Hashem et al. (2008), trabalhando com *Pichia guilliermondii* Moh10, *Pachytrichospora transvaalensis* Y-1240, *Candida albicans* Moh Y-5 e *Geotrichum terrestre* Y 2162, observaram uma redução de até 92%, chegando a taxa de mortalidade de até 100% de juvenis de *Meloidogyne incognita* em videira, apresentando como mecanismo de ação a produção de compostos tóxicos aos nematoides e o parasitismo.

Fialho et al. (2012) observaram a produção de compostos voláteis de *S. cerevisiae*, resultando em 100% de mortalidade de juvenis de *M. javanica*. Indicando que este gênero de levedura produz compostos nematicidas.

Também trabalhando com *S. cerevisiae*, para o controle de *M. javanica* na cultura da berinjela, Mokbel e Alharbi (2014), aplicando uma suspensão de células da levedura no solo, obtiveram redução de 69,5% do número de galhas.

Karajeh (2013), trabalhando com a mesma levedura e nematoide, na cultura do pepino obteve o aumento no crescimento da planta, aumento de produção e incremento no teor de compostos fenólicos, indicando que houve indução de resistência na planta.

### 2.3.3 Leveduras no controle de vírus

Lee et al. (2017) observaram que a levedura *Pseudozyma churashimaensis* realizou controle do vírus do mosaico do pepino (*Cucumber Mosaic Virus - CMV*), vírus da mancha de pimenta (*Pepper Mottle Virus - PepMoV*), vírus da mancha leve de pimenta (*Pepper Mild Mottle Virus - PMMoV*) e vírus da murcha do feijão fava (*Broad Bean Wilt Virus - BBWV*) através da indução de resistência. Evidenciando, assim, que as leveduras possuem amplo espectro de ação, podendo utilizá-las para o controle de vírus.

### 2.3.4 Leveduras no controle de bactérias

Em estudo realizado por Mello et al. (2011), utilizando levedura para o controle da podridão-mole em couve-chinesa, os autores constataram que as leveduras apresentaram redução de até 39% do progresso da doença. Indicando que também podem interferir no desenvolvimento de bactérias fitopatogênicas.

A eficiência dos isolados *Rhodotorula aurantiaca*, *Pichia anomala* e *R. glutinis*, no controle mancha bacteriana de frutas, causada por *Acidovorax citrulli*, em melão, reduziu o progresso da doença em até 58%. Possivelmente através do mecanismo de indução de resistência, haja vista que não foi constatado a produção de compostos antimicrobianos e competição por parte das leveduras (MELO et al., 2015).

Em pesquisa realizada por Heling et al. (2016), utilizando *R. glutinis* para o controle de cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), o isolado de levedura *R. glutinis* (AH 14-3) reduziu em 53,70% a severidade da doença, demonstrando o seu potencial para o controle de doenças de plantas.

Segundo Lee et al. (2017), a levedura *Pseudozyma churashimaensis*, foi eficiente no controle de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* em plantas de pimenta. Reduzindo em 60% a severidade da doença, através da indução de resistência com efeito *priming*.

*Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) já foi testada para o manejo de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (cretamento bacteriano comum do feijoeiro) e apresentou redução de 50,83% na severidade da doença. Apontando, dessa forma, um direcionamento para as pesquisas com esta levedura, possivelmente atuando por mais de um mecanismo de controle (HELING et al., 2016).

Os metabólitos extracelulares de *Pseudozyma aphidis* influenciaram diretamente, inibindo o desenvolvimento de *Clavibacter michiganensis* em tomateiro. Reduziram em 60% a severidade do cancro bacteriano, indicando que a indução de resistência e antibiose foram os mecanismos efetivos na redução desta doença (BARDA et al., 2015).

## 2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico de doenças de plantas por leveduras vem apresentando resultados significativos, demonstrando amplo espectro, através resultados positivos para doenças fúngicas, virais, nematológicas e bacterianas. Esse ocorre através de vários mecanismos de controle que conferem segurança e eficiência, além de não apresentar contraindicação para a saúde humana e do meio ambiente.

O biocontrole apresenta grande potencial para o futuro do controle de doenças de plantas, apresentando-se como alternativa para os métodos de controle existentes, além de baixo ter custo para sua aplicação.

As leveduras inserem-se neste segmento por apresentar características desejáveis tais como: resistência às alterações no microambiente onde são inseridas; atuação por diversos mecanismos de controle biológico e estabilidade genética, o que confere segurança quanto a sua eficiência; não necessita de um meio de cultura específico para sua multiplicação; tem rápido crescimento e não apresenta características patogênicas ao ser humano.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIL, K.; NARAYAN DAS, S.; PODILE, A. R. Induced defense in plants: a short overview. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 84, n. 3, p. 669–679, 2014.

BARDA, O.; SHALEV, O.; ALSTER, S.; BUXDORF, K.; GAFNI, A. *Pseudozyma aphidis* induces salicylic-acid-independent resistance to *Clavibacter michiganensis* in tomato plants. **Plant Disease**, v. 99, n. 5, p. 621–626, 2015.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1-6, 2005.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, A. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. .M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças em plantas**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2012, 156 p. (Série Documentos n. 88).

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular Plant**, v. 8, n. 4, p. 521-539, 2015.

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

BUXDORF, K.; RAHAT, I.; GAFNI, A.; LEVY, M. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. **Plant Physiological**, v. 161, p. 2014-2022, 2013.

BUXDORF, K.; RAHAT, I.; LEVY, M. *Pseudozyma aphidis* induces ethylene-independent resistance in plant. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 11, p. 1-5, 2013.

CALVO-GARRIDO, C.; VIÑAS, I.; ELMER, P. A.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N. Suppression of *Botrytis cinerea* on necrotic grapevine tissues by early-season applications of natural products and biological control agents. **Pest Management Science**, v. 70, p. 595–602, 2014.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia Volume 1: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda. 2018. p. 85-92.

CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. The roles of ABA in plant-pathogen interaction. **Journal of Plant Resources**, v. 124, n. 4, p. 489-499, 2011.

CASTORIA, R.; MORENA, V.; CAPUTO, L.; PANFILI, G.; DE CURTIS, F.; DE CICCO, V. Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. **Phytopathology**, v. 95, n. 11, p. 1271-1278, 2005.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; LANGENBACH, C. J. G.; JASKIEWICZ, M. R. Priming for enhanced defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 97–119, 2015.

CRISP, P. A.; GANGULY, D.; EICHTEN, S. R.; BOREVITZ, J. O.; POGSON, B. J. Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advances**, v. 2, n. 2, p. 1-14, 2016.

DIEZEL, C.; ALLMANN, S.; BALDWIN, I. T. Mechanisms of optimal defense patterns in *Nicotiana attenuata*: flowering attenuates herbivory-elicited ethylene and jasmonate signaling. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, p. 971–983, 2011.

DI PIERO, R. M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CALVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 29-50.

EL-SHEEKH, M. M.; MAHMOUD, Y. A. G.; ABO-SHADY, A. M.; HAMZA, W. Efficacy of *Rhodotorula glutinis* and *Spirulina platensis* carotenoids in immunopotential of mice infected with *Candida albicans* SC5314 and *Pseudomonas aeruginosa* 35. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 1, p. 61–67, 2010.

FIALHO, M. B.; BESSI, R.; INOMOTO, M. M.; PASCHOLATI, S. F. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p. 152-154, 2012.

FONSECA, S.; CHINI, A.; HAMBERG, M.; ADIE, B.; PORZEL, A.; KRAMELL, R.; MIERSCH, O.; WASTERNAK, C.; SOLANO, R. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 344–350, 2009.

GAFNI, A.; CALDERON, C. E.; HARRIS, R.; BUXDORF, K.; DAFA-BERGER, A.; ZEILINGER-REICHERT, E.; LEVY, M. Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. **Front Plant Science**, v. 6, n. 132, p. 1-11, 2015.

GHORBANPOUR, M.; OMIDVARI, M.; ABBASZADEH-DAHAI, P.; OMIDVAR, R.; KARIMAN, K. Mecanismos subjacentes aos efeitos protetores de fungos benéficos contra doenças de plantas. **Biological Control**, v. 117, p. 147-157, 2018.

GOOSSENS, J.; FERNANDEZ-CALVO, P.; SCHWEIZER, F.; GOOSSENS, A. Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses. **Plant Molecular Biology**, v. 91, p. 673–689, 2016.

HASHEM, M.; OMRAN, Y. A. M. M.; SALLAM, N. M. A. Efficacy of yeasts in the management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, in Flame Seedless grape vines and the consequent effect on the productivity of the vines. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 357-375, 2008.

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

HELING, A. L.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R.; HENKEMEIER, N. P.; CARVALHO, J. C.; LORENZETTI, E. Controle de cretamento bacteriano comum na cultura do feijoeiro, mediado por leveduras. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIOESTE, 8., 2016, Marechal Cândido Rondon-PR. **Anais... VIII SECIAGRA**, p. 200-205, 2016.

HERNÁNDEZ, A. G. **Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão.** 2015, 93 f. Dissertação (Mestrado Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 2015.

KARAJEH, M. R. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* on controlling the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infection and promoting cucumber growth and yield under laboratory and field conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 46, n. 20, p. 2492-2500, 2013.

KARAPETYAN, S.; DONG, X. Redox and the circadian clock in plant immunity: A balancing act. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 119, p. 56–61, 2018.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Jasmonate signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 1459–1468, 2008.

KAZAN, K. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 20, p. 219–229, 2015.

KHAN, Z.; GUELICH, G.; PHAN, H.; REDMAN, R.; DOTY, S. Bacterial and yeast endophytes from poplar and willow promote growth in crop plants and grasses. **International Scholarly Research Network Agronomy**, v. 2012, Article ID 890280, 2012.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-19, 2019.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**, 3.ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.

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**, v. 14, p. 251-302, 2006.

KUNZ, S. Fire blight control in organic fruit growing – systematic investigation of the mode of action of potential control agents. **Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land**, v. 408, p. 249–253, 2006.

LEE, G.; LEE, S.; KIM, K. M.; RYU, C. Foliar application of the leaf-colonizing yeast *Pseudozyma churashimaensis* elicits systemic defense of pepper against bacterial and viral pathogens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 39432, p. 1-13, 2017.

LIMA, J. R.; GONDIM, D. M. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, F. S. A.; GONÇALVES, L. R. B.; VIANA, F. M. P. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 83, p. 58-64, 2013.

LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE, A. M.; CARVALHO, D. D. C. **Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 4 p. Circular técnica 85.

LORENZO, O; SOLANO, R. Señalización de ácido jasmónico e interacciones com otras hormonas. In: MARTÍN, M. D. R.; RODRÍGUEZ, C. N. **Metabolismo y modo de acción de fitohormonas**. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca. 2004. p. 79-80.

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 395-417. 2010.

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**, v. 45, n. 6, p. 539-545, 2010.

MACHADO, R. G.; DE SÁ, E. L. S.; DAMASCENO, R. G.; HAHN, L.; ALMEIDA, D.; MORAES, T.; CAMARGO, F. A. O.; REARTES, D. S. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. **Ciência e Natura**, v. 33, n. 2, p. 111-126, 2011.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. **Agrofit – Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2020. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 02 jan. 2020.

MEDEIROS, F. H. V.; DA SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia volume 1: Princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda. 2018. p. 261-274.

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

MELO, E. A.; DE LIMA, R.; MARIANO, R.; LARANJEIRA, D.; DOS SANTOS, L. A.; GUSMÃO, L. O.; DE SOUZA, E. B. Eficácia da levedura no biocontrole da mancha bacteriana de frutas em plantas de melão. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 56–64, 2015.

MOKBEL, A. A.; ALHARBI, A. A. Suppressive effect of some microbial agents on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* infected eggplant. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 10, p. 1428-1434, 2014.

O'DONNELL, P. J.; CALVERT, C.; ATZORN, R.; WASTERACK, C.; LEYSER, H. M. O.; BOWLES, D. J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**, v. 274, p. 1914–1917, 1996.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismos: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO,

A. **Manual de fitopatologia. Volume 1: princípios e conceitos.** 5ª ed. Editora Agronômica Ceres Ltda, 2018. p. 423-452.

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S. C. M. Modulação hormonal da imunidade vegetal . **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489-521, 2012.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 403–424, 2012.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 439–462, 1992.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos.** Viçosa: Editora UFV, 2007. 269 p.

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.

SANCHEZ, S. E.; KAY, S. A. The plant circadian clock: from a simple timekeeper to a complex developmental manager. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 12, p. 1-16, 2016.

SMITH, E. F. Description of *Bacillus phaseoli* n. sp. **Botanical Gazette**, v. 24, p. 192, 1897.

SOARES, A. M. Dos S.; MACHADO, O. L. T.; Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

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 Food Science & Technology**, v. 47, p. 39–49, 2016.

STANGARLIN, J. R.; SCHULZ, D. G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; KUHN, O. J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2010.

SUN, P.; FANG, W.; SHIN, L.; WEI, J.; FU, S.; CHOU, J. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. **Public Library of Science**, v. 9, n. 12, p. 22, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2017. p. 858.

THOMASHOW, L. S.; BONSALL, R. E.; WELLER, D. M. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**, Washington, DC: ASM Press, p. 493-499, 1997.

TRUJILLO, J. A. B. **Micología médica básica**, 4ª ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2012. 583 p.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 41-55.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 472-489, 1995.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 177-206, 2009.

YADAV, S.; MANJUNATHA, K. H.; RAMACHANDRA, B.; SUCHITRA, N.; PRABHA, R. Characterization of pigment producing *Rhodotorula* from dairy environmental samples. **Asian Journal of Dairy & Food Research**, v. 33, n. 1, p. 1-4, 2014.

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, v. 95, p. 1368-1373, 2005.

WILDERMUTH, M. C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, p. 562-565, 2001.

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

ZHANG, H.; MA, L.; WANG, L.; JIANG, S.; DONG, Y.; ZHENG, X. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. **Biological Control**, v. 47, n. 1, p. 60-65, 2008.

ZHANG, G.; ZHAO, F.; CHEN, L.; PAN, Y.; SUN, L.; BAO, N.; ZHANG, T.; CUI, C.X.; QIU, Z.; ZHANG, Y.; YANG, L.; XU, L. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. **Nature Plants**, v. 5, p. 491–497, 2019.

ZIEDAN, S. H. E.; FARRAG, E. S. H. Application of yeasts as biocontrol agents for controlling foliar diseases on sugar beet plants. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 6, p. 1789-1799, 2011.

ZHU, Z.; LEE, B. Friends or foes: new insights in jasmonate and ethylene co-actions. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, p. 414–420, 2015.

### **3 ARTIGO 1: COMPOSTOS VOLÁTEIS ANTIMICROBIANOS SOBRE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* PRODUZIDOS POR *Rhodotorula glutinis* E *Sporidiobolus johnsonii***

**Resumo:** Compostos antimicrobianos produzidos por leveduras, voláteis e não voláteis, fazem parte de um dos mecanismos de controle biológico de doenças em plantas. Esses compostos podem causar estresse oxidativo em células de fitopatógenos, através da alteração da atividade de proteínas, enzimas e na permeabilidade da membrana plasmática. O objetivo da presente pesquisa foi monitorar a produção de compostos voláteis e não voláteis das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1), com potencial antimicrobiano para a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Um experimento *in vitro* foi conduzido para produção de compostos voláteis, sendo aplicado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos: *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii* e controle com cinco repetições. Este ensaio foi conduzido em placas de Petri, em fundos sobrepostos, e após 48 horas foi realizada lavagem das placas com solução salina (0,85%) e leitura em espectrofotômetro a 580 nm. Para a produção de compostos não voláteis, após o crescimento das leveduras em meio de cultura líquido, este foi centrifugado e filtrado. Em placa contendo meio de cultura nutriente ágar foi aplicado 100 µL da suspensão bacteriana, e acondicionados seis discos de papel filtro umedecidos com os compostos não voláteis e, após 48 horas, foi avaliada a formação de halo de inibição do desenvolvimento bacteriano. Os resultados do ensaio para a produção de compostos voláteis à multiplicação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi reduzida em 50,9%, 45,7% e 28,3% pelas leveduras *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *S. johnsonii*, respectivamente. Os isolados *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *S. johnsonii* produziram compostos voláteis antimicrobianos que reduziram a multiplicação de células bacterianas de *X. axonopodis* pv. *Phaseoli*, apresentando-se como um mecanismo para o controle deste patógeno. Os compostos não voláteis antimicrobiano não foram produzidos através do método utilizado.

**Palavras-chave:** Antagonismo. Antibiose. Controle biológico. *Phaseolus vulgaris*.

**Abstract:** Antimicrobial substances produced by yeasts be them volatile or not they combine with biological control mechanisms over plant diseases. These substances

may cause oxidative stress in phytopathogenic cells by altering the activity of proteins, enzymes and plasma membrane permeability. This work aim was to evaluate the production of volatile and non-volatile substances from the yeasts *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3, AH 20-1) and *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) with antimicrobial potential for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. For this to happen an in vitro essay was set and leded to check volatile substances production. The treatments including one control were arranged in a randomized complete block design replicated five times. This test was conducted in Petri dishes, on overlapping bottoms. After 48 hours, the plates were washed with saline solution (0.85%) and read on a spectrophotometer at 580 nm. When yeasts had grown, we centrifuged and filtered their content for non-volatile substances production check. We poured 100 µL of the bacterial suspension over Petri plates containing with agar nutrient over which six disks of filtering paper soaked with the non-volatile substances were also places. Passed 48 hours from that we analyzed halo bacterial development formation. Results stood for reduction rates of 50.9%, 45.7% and 28.3% by the action of *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) and *S. johnsonii*, respectively. All isolates were skilled enough to suggest their ability on biological control of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* by producing antimicrobial volatile substances which turned down cell multiplication. Related to the non-volatile antimicrobial compounds there were no production by the above-mentioned method.

**Key-words:** Antagonist. Antibiosis. Biological control. *Phaseolus vulgaris*.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O controle biológico de doenças pode ser observado através da interação de entre o antagonista e o fitopatógeno, de modo que um consiga influenciar no desenvolvimento do outro de alguma forma (ROMEIRO, 2007; LOBO JÚNIOR; GERALDINE; CARVALHO, 2009).

Um dos mecanismos que podem ser observados nessa interação é a antibiose, que ocorre através da produção de uma ou mais moléculas tóxicas ao patógeno, capaz de inibir o seu desenvolvimento ou atuar fisiologicamente sobre o patógeno (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Esse mecanismo antagonista ocorre de forma semelhante aos fungicidas, por ser altamente tóxico e atuar diretamente sobre o fitopatógeno. Pode ser de amplo

espectro, ou seja, atuar sobre diversos patógenos, seja ele, fungo, bactéria, vírus ou nematoide (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Agentes antagonistas de biocontrole podem produzir compostos voláteis que se apresentam naturalmente no estado gasoso com ação tóxica ao patógeno, que são liberados sobre a superfície da planta na camada estacionária de ar, alterando a microatmosfera. Além da produção de compostos antimicrobianos voláteis, o agente de biocontrole também pode produzir compostos não voláteis. Neste caso, ocorre a produção de compostos os quais são liberados sobre a superfície vegetal (EFFMERT et al., 2012; MORATH; HUNG; BENNETT, 2012; KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019).

Este mecanismo pode inibir o crescimento, interferindo na permeabilidade e integridade membrana celular do patógeno e desorganização celular (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018). A produção de compostos antimicrobianos pode ser observada em leveduras utilizadas no controle biológico de fitopatógenos (FIALHO et al., 2016).

Foi observado que a levedura *R. glutinis* sintetiza lipídeos, carotenoides e enzimas, que possuem potencial antimicrobiano, assim como *S. johnsonii*. No entanto, a ação destes compostos ainda deve ser melhor estudada, conforme El-Sheekh et al. (2010).

Heling (2016), observou a redução do número de unidades formadoras de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em 41,9%, 62,8% e 31,6% por compostos não voláteis de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii* (AH 16-1), respectivamente. Assim como para a produção de compostos voláteis, em que o autor observou redução do número de unidades formadoras de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em 84,8%, 58,4%, para as leveduras *S. johnsonii* (AH 16-1) e *R. glutinis* (AH 20-1), respectivamente.

Carvalho (2017) relatou a redução de até 68% da severidade da doença e a produção foi de 16% e 12% superior quando aplicado células dos isolados *R. glutinis* (AH 14-3) e *S. johnsonii* (AH 16-1), respectivamente.

De acordo com o exposto, o objetivo da presente pesquisa é identificar a produção de compostos voláteis e não voláteis com potencial antimicrobiano, pelas leveduras *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *S. johnsonii* (AH 16-1).

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As leveduras testadas *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1), isoladas de flor de roseira, folha de pitangueira e folha de beijinho, respectivamente, pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, foram preservadas através do método de castelani e armazenadas em frascos de vidro transparente com capacidade de 10 mL contendo água destilada autoclavados (ODDS, 1991). Estas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio YEPG sólido para sua manutenção (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glicose e 10 g de ágar).

A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi obtida por isolamento indireto de fragmentos de tecido foliar de feijoeiro infectado. Foi identificada por características de coloração de colônia e por teste de patogenicidade e mantida em meio nutriente ágar a 25 °C para crescimento e preservada em solução salina 0,85% a 10 °C.

Compostos voláteis das leveduras foram testados em experimento *in vitro*, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii* e controle, com cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais, onde cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri.

O experimento foi implantado em placas de Petri, em fundos sobrepostos, na qual em um dos fundos, contendo meio Ágar-YEPG (20 g de ágar, 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glicose, 1000 mL de água), foram repicadas as leveduras. E no outro, contendo meio de cultura nutriente ágar, foi expalhado 100 µL de suspensão bacteriana ajustada a 0,100 de absorbância a 580 nm (cubeta de vidro) em espectrofotômetro (marca Bel, modelo Uv-Vis 200-1000NM - Mono Feixe - Uv-M51) e curva de concentração bacteriana previamente elaborada, segundo metodologia de Gonçalves, Alfenas e Mafia (2016). Elas foram mantidas em BOD por 48 horas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período foi realizada lavagem das placas com 15 mL de solução salina (0,85%), procedendo-se novas leituras em espectrofotômetro (marca Bel, modelo Uv-Vis 200-1000NM - Mono Feixe - Uv-M51), a 580 nm, para estimar a quantidade de células bacterianas.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) utilizando o *software* GENES (CRUZ, 2013).

Para a identificação de compostos não voláteis, as leveduras foram repicadas em meio líquido (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glicose, 1000 mL de água), e agitadas a 150 rpm por sete dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, o meio foi centrifugado a 290g (5.000 rpm) por 5 minutos e depois filtrado em filtro de seringa (acetato de celulose estéril) 0,45 µm, obtendo-se a fase não volátil (filtrado de cultura).

Após a obtenção dos compostos não voláteis, foi aplicado 100 µL da suspensão bacteriana preparada e ajustada (absorbância 0,100; 580 nm) e curva de concentração bacteriana previamente elaborada (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016), sobre placa de Petri contendo meio de cultura nutriente ágar, espalhado com auxílio de alça de Drigalski. Sobre o meio contendo a bactéria foram depositados seis discos de papel filtro, com 0,5 cm de diâmetro previamente esterilizados em autoclave, umedecidos com os filtrados das culturas de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii*, e controle (solução salina 0,85%), sendo cada disco uma unidade experimental, totalizando 24 unidades. Em seguida, as placas foram mantidas em BOD por 48 horas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, para se avaliar halo de inibição de desenvolvimento bacteriano. O resultado foi obtido pela observação da presença ou ausência do halo de inibição de crescimento bacteriano.

Os filtrados de cultura foram aplicados em cromatografia de camada delgada, para separação dos compostos presentes nos filtrados de cultura de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii*. Em que foi aplicado 100 µL de cada filtrado e desenvolvido por 90 minutos a 25 °C, em Becker de vidro (2 L), contendo 50 mL de metanol 99%.

Após a evaporação de todo o solvente da placa, foi realizada a revelação utilizando luz ultravioleta (UV, onda longa 400 – 320 nm) e também pelo método biológico. Para isso, foi aplicada uma fina camada de nutriente ágar (1 mm) e semeada suspensão bacteriana a 0,100 de absorbância, obtida com auxílio de espectrofotômetro (marca Bel, modelo Uv-Vis 200-1000NM - Mono Feixe - Uv-M51), a 580 nm. Após 42 horas foi verificada a possível ocorrência da presença de pontos de inibição de crescimento do patógeno.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de leveduras inibiram a multiplicação de células bacterianas, em 50,9%, 45,7% e 28,3%, através da produção de compostos voláteis, para as leveduras *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii* (AH 16-1), respectivamente (Tabela 1).

Esses resultados confirmaram a capacidade de produção de compostos voláteis antimicrobianos produzidos pelas leveduras e o seu potencial em reduzir o desenvolvimento do patógeno.

**Tabela 1.** Número de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em atmosfera contendo compostos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii*.

Tratamento	Absorbância	Células, mL <sup>-1</sup>	Inibição (%)
<b><i>R. glutinis</i> (AH 14-3)</b>	0,10035 a	2,017 x10 <sup>7</sup> a	50,94%
<b><i>R. glutinis</i> (AH 20-1)</b>	0,11100 a	2,230 x10 <sup>7</sup> a	45,76%
<b><i>S. johnsonii</i></b>	0,14687 b	2,947 x10 <sup>7</sup> b	28,31%
<b>Controle</b>	0,20503 c	4,111 x10 <sup>7</sup> c	-
<b>CV%</b>	10,74	10,70	-

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

Heling (2016), trabalhando com 47 isolados observou que os três isolados utilizados no presente estudo apresentaram produção de compostos voláteis antimicrobianos à *X. axonopodis* pv. *Phaseoli*. O isolado *S. johnsonii* apresentou redução do desenvolvimento em 84,8%, resultado expressivo, bem superior ao obtido na presente pesquisa, em que o mesmo isolado apresentou redução de 28,3%. Possivelmente este resultado tenha ocorrido em decorrência do método utilizado, visto que Heling (2016) utilizou a contagem de unidades formadoras de colônias, identificando apenas células vivas. Por outro lado, na presente pesquisa foi utilizada uma suspensão de células, por meio da qual se pode obter o número aproximado de células, mas não a viabilidade destas. Quanto ao isolado *R. glutinis* (AH 20-1) o autor obteve redução de 58,4%, próximo do resultado obtido no presente trabalho (45,7%). E o isolado *R. glutinis* (AH 14-3) o autor não observou redução, indicando que o

mesmo não produziu compostos voláteis antimicrobianos, diferente do observado no presente estudo, sendo que este isolado apresentou a maior redução na multiplicação do patógeno, com 50,9%.

Compostos voláteis normalmente possuem baixa massa molecular ( $\leq 300$  Da), alta pressão de vapor ( $\geq 0,01$  kPa a  $20^\circ\text{C}$ ) e apresentam atividade antimicrobiana em baixas concentrações (EFFMERT et al., 2012). São compostos encontrados em vários grupos químicos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos, hidrocarbonetos, tioalcoois, tioésteres, ciclo-hexanos, compostos heterocíclicos, fenóis, derivados de benzeno e compostos de enxofre. Devido à característica de alta volatilidade, estes compostos podem se difundir em grandes áreas no ambiente em que é produzido, conferindo vantagem a este mecanismo (EFFMERT et al., 2012; MORATH; HUNG; BENNETT, 2012). Isso indica que estes compostos podem estar atuando na redução da multiplicação de células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

A produção de compostos voláteis por *S. cerevisiae*, já foi constatada por Fialho et al. (2011), quando constataram a produção de compostos voláteis antimicrobianos, principalmente álcool (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e éster (acetato de etila).

Toffano, Fialho e Pascholati (2017), observaram a produção dos compostos voláteis 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, por *S. Cerevisiae*. Além disso, constataram que esses compostos foram os principais interferentes na germinação de esporos e no desenvolvimento de apressório de *Guignardia citricarpa* (Syn. *Phylosticta citricarpa*), agente causal da pinta preta do citros, em pós colheita. Esses compostos inibiram em 100% a germinação e a formação de apressório do patógeno. Reforçando mais uma vez que o grupo dos álcoois apresentam características antimicrobianas.

Fialho et al. (2016), identificaram que os compostos antimicrobianos interferem em vários processos celulares de microrganismos. Especialmente sobre a glicólise e o ciclo do ácido tricarbóxico, inibindo assim o desenvolvimento do fungo *Guignardia citricarpa* (Syn. *Phylosticta citricarpa*), agente causal da pinta preta do citros, em pós colheita. Possivelmente este pode ser o mesmo funcionamento de compostos voláteis produzidos pelos isolados *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. Johnsonii*, sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Segundo Rezende et al. (2015), a exposição de fungos aos compostos voláteis 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, resultou em aumento nos níveis da

peroxidação de lipídios da membrana. O que indica a ocorrência de estresse oxidativo, além do aumento da permeabilidade e redução da seletividade de membrana plasmática, mostrando potencial no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*. Sendo o grupo dos álcoois compostos antimicrobianos que podem atuar no controle de fitopatógenos, o que pode explicar os resultados obtidos na presente pesquisa.

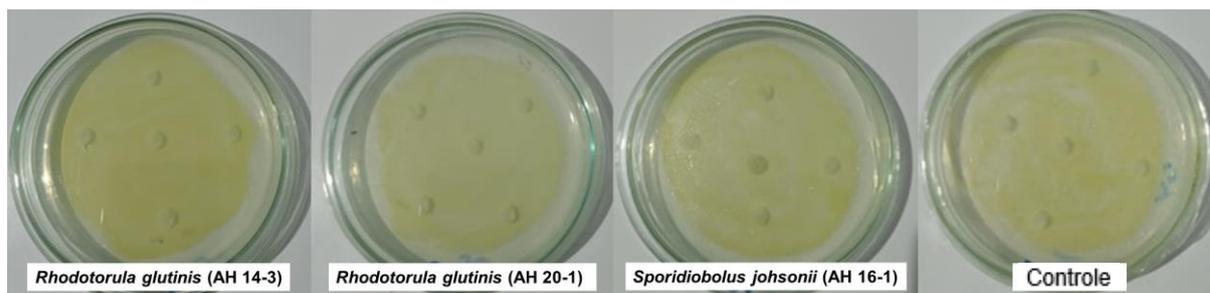
Segundo Huang et al. (2012), a levedura *Sporidiobolus pararoseus* sintetiza 2-etil-1-hexanol, composto antimicrobiano capaz de inibir a germinação de esporos e crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Um dos isolados utilizados pertence ao gênero *Sporidiobolus*, tal composto pode ter sido sintetizado por este isolado e atuado no controle da *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Outros compostos voláteis já foram relatados na literatura, como é o caso de 1,3,5,7-ciclo-octatetraeno, 3-metil-1-butanol, 2-nonanona e álcool feniletílico, sintetizados por *Candida intermedia* na interação com *B. cinerea* (HUANG et al., 2011).

O composto 2-feniletanol foi identificado como o principal componente volátil antimicrobiano sintetizado por *Pichia anomala*. Ele atuou na inibição da germinação de esporos, crescimento micelial e produção de toxinas por *Aspergillus flavus* (HUA et al., 2014).

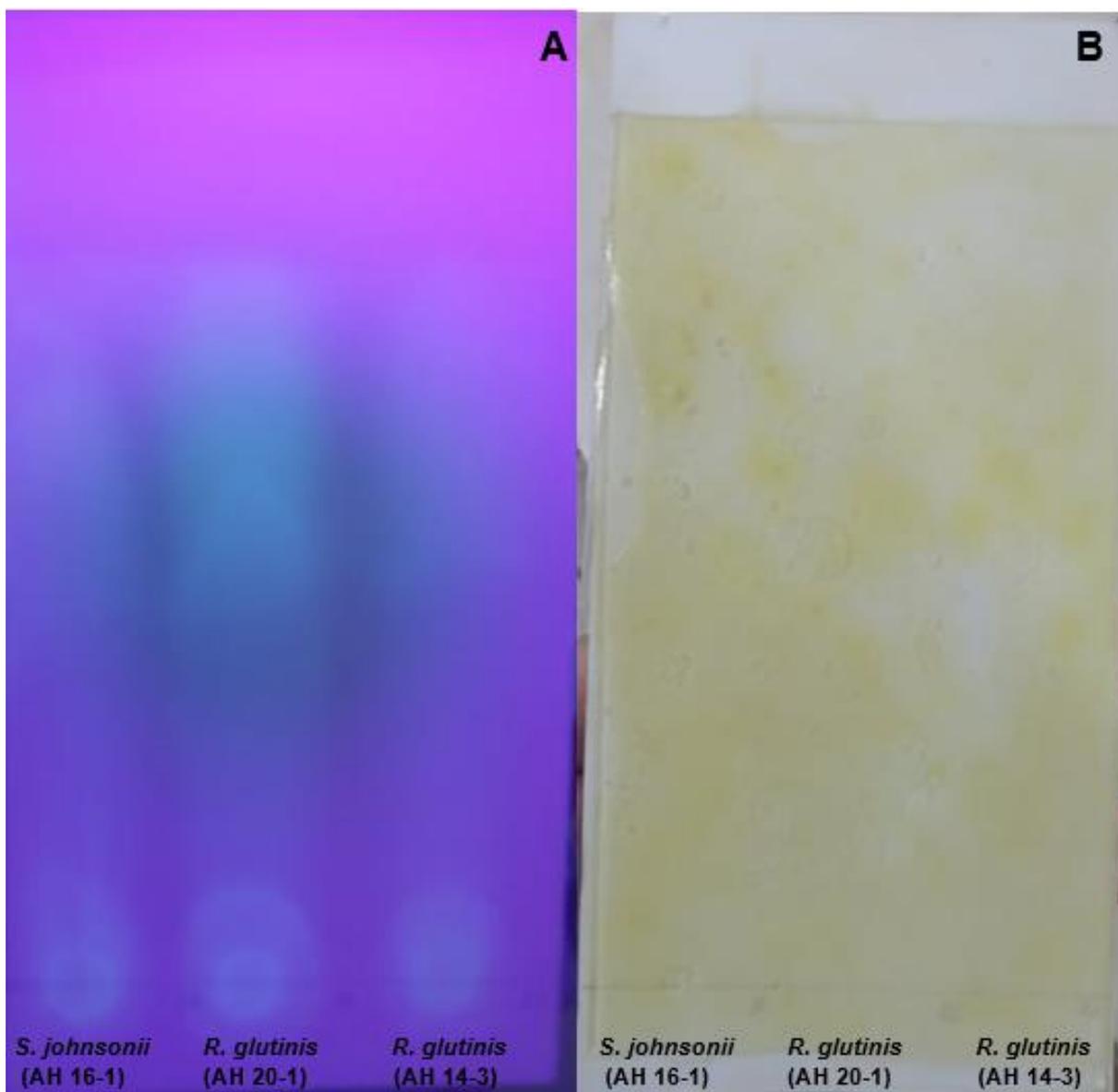
De acordo com Fialho et al. (2010), os compostos antimicrobianos voláteis atuam reduzindo a síntese de proteínas, atividade de enzimas envolvidas na morfogênese e também podem desencadear o estresse oxidativo, impedindo o desenvolvimento de microrganismos.

Os resultados para produção de compostos antimicrobianos não voláteis pelas leveduras *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. Johnsonii*, não foram significativos. Ou seja, através do método utilizado os três isolados não demonstraram capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos não voláteis que pudessem afetar o desenvolvimento de bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, como mostra na Figura 1. Bem como observado em cromatografia de camada delgada, não apresentando nenhuma região específica da placa em que houve a separação de composto ou compostos antimicrobianos (Figura 2).



**Figura 1.** Efeito de compostos não voláteis sintetizados pelas leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1), *Sporidiobolus johnsonii*, sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, com 48 horas.

Resultado este diferente do obtido por Heling (2016), que observou a redução do número de unidades formadoras de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em 41,97%, 62,85% e 31,63% por compostos não voláteis de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. Johnsonii*, respectivamente. Naquele caso, o autor utilizou diluição entre 30 e 300 células, diferente da utilizada na presente pesquisa (21.000.000 células). Indicando a importância de se realizar o controle biológico de forma preventiva, momento que a pressão de inóculo é baixa, favorecendo a atuação do antagonista.



**Figura 2.** Cromatografia de camada delgada para separação de compostos presentes em filtrados de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1), *Sporidiobolus johnsonii*, revelada com luz ultra violeta (UV, onda longa 400 – 320 nm) (A) e pelo método biológico utilizando suspensão de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (B).

### 3.4 CONCLUSÃO

Os isolados *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. Johnsonii*, produziram compostos voláteis antimicrobianos que reduzem a multiplicação de células da bactéria fitopatogênica *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Assim, apresentando-se como um mecanismo em potencial para o controle deste patógeno. E através da

metodologia utilizada não foi possível observar a produção de compostos antimicrobianos não voláteis.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, J. C. **Manejo do cretamento bacteriano comum do feijoeiro por *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii***. 2017, 39 f. Dissertação (Mestrado Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 2017.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

EFFMERT, U.; KALDERÁS, J.; WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 665–703, 2012.

EL-SHEEKH, M. M.; MAHMOUD, Y. A. G.; ABO-SHADY, A. M.; HAMZA, W. Efficacy of *Rhodotorula glutinis* and *Spirulina platensis* carotenoids in immunopotential of mice infected with *Candida albicans* SC5314 and *Pseudomonas aeruginosa* 35. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 1, p. 61–67, 2010.

FIALHO, M. B.; DE ANDRADE, A.; BONATTO, M.; SALVATO, F.; LABATE, C. A.; PASCHOLATI, S. F. Proteomic response of the phytopathogen *Phyllosticta citricarpa* to antimicrobial volatile organic compounds from *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Research**, v. 183, p. 1-7, 2016.

FIALHO, M. B.; DE MORAES, M. H. D.; TREMOCOLDI, A. R.; PASCHOLATI, S. F. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 2, p.137-142, 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.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**, Editora UFV, ed. 2, p. 92-105, 2016.

HELING, A. L. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial de leveduras como agentes de proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum**. 2016, 51f. Dissertação (Mestrado Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 2016.

HUA, S. S.; BECK, J. J.; SARREAL, S. B.; GEE, W. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin Research**, v. 30, p. 71–78, 2014.

HUANG, R.; CHE, H. J.; ZHANG, J.; YANG, L.; JIANG, D. H.; LI, G.Q. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. **Biological Control**, v. 62, p. 53–63, 2012.

HUANG, R.; LI, G. Q.; ZHANG, J.; YANG, L.; CHE, H. J.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**, v. 101, p. 859–869, 2011.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-19, 2019.

LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE, A. M.; CARVALHO, D. D. C. **Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 4 p. Circular técnica 85.

MEDEIROS, F. H. V.; DA SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.

**Manual de fitopatologia Volume 1: princípios e conceitos.** 5. ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda. 2018. p. 261-274.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 73–83, 2012.

ODDS, F. C. Long term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V. 29, n.6, p. 413-415, 1991.

REZENDE, D. C.; FIALHO, M. B.; BRAND, S. C.; BLUMER, S.; PASCHOLATI, S. F. Antimicrobial activity of volatile organic compounds and their effect on lipid peroxidation and electrolyte loss in *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* mycelia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 23, p. 1527-1535, 2015.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos.** Viçosa: Editora UFV, 2007. 269 p.

TOFFANO, L.; FIALHO, M. B.; PASCHOLATI, S. F. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. **Biological Control**, v. 108, p. 77-82, 2017.

#### 4 ARTIGO 2: MEDIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO ATRAVÉS DE FITOHORMÔNIOS PRODUZIDOS POR *Rhodotorula glutinis* E *Sporidiobolus johnsonii*.

**Resumo:** A promoção de crescimento é uma interação entre o microrganismo utilizado para o biocontrole e planta, benéfica para ambos e que se apresenta como compensatória no processo de controle biológico, sendo este normalmente influenciado pela produção de fitohormônios por parte dos microrganismos antagonistas. As leveduras apresentam grande potencial para este fim, pois já foi constatado como promissor agente de biocontrole e produtor de fitohormônios. O objetivo do estudo foi demonstrar a promoção de crescimento vegetativo do feijoeiro e quantificar a produção de fitohormônios pelas leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii*. Para isso, realizou-se experimento em câmara de crescimento utilizando vasos de 0,5 L, com substrato comercial, com a cultivar de feijoeiro IAPAR Tuiuiú. Os tratamentos foram: 5 g L<sup>-1</sup> de células de cada isolado de levedura *R. glutinis* (isolados AH 14-3 e AH 20-1) e *S. johnsonii* e o filtrado de cultura de cada um destas leveduras e um controle totalizando sete tratamentos com três repetições cada. Foram realizadas três aplicações nos seguintes estádios fenológicos: V2 (10 dias após a semeadura), V3 (20 dias após a semeadura) e V4 (30 dias após a semeadura), com quatro momentos de coletas para avaliar o desenvolvimento das plantas ao decorrer do experimento, com intervalo de 10 dias entre cada uma, sendo que a primeira foi imediatamente antes da aplicação dos tratamentos. Em cada coleta foram realizadas análises de altura de planta, área foliar, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e massa seca total, para se calcular a área abaixo da curva de crescimento vegetal (AACCV). Também foi quantificada a produção de fitohormônios por estes isolados. Obteve-se incremento de 39,7% na altura de planta, com aplicação de filtrado de cultura de *S. Johnsonii*. 42,7% de área foliar em plantas tratadas com células de *R. glutinis* (AH 14-3). Para massa seca de parte aérea, os tratamentos que com células de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura *R. glutinis* (AH 14-3) e células de *R. glutinis* (AH 20-1), apresentaram incremento de 33,1%, 33,5% e 29,5% respectivamente. Quanto ao incremento de massa seca de raiz, este foi de 27,8% superior em plantas tratadas com células de *R. glutinis* (AH 14-3). Para massa seca total foram observados incrementos de 31,8%, 31,3% e 25,4%, respectivamente, para

os tratamentos com células de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura *R. glutinis* (AH 14-3) e células de *R. glutinis* (AH 20-1). Os três isolados apresentaram a produção dos fitohormônios ácido 3-indolacético, ácido 3-indolbutírico e de giberelina (GA4). Os isolados de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *S. Johnsonii*, assim como seus respectivos filtrados de cultura, possuem a capacidade de promover o crescimento do feijoeiro, pela síntese de auxinas e giberelinas.

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

**Abstract:** Growth promotion is understood as an interaction between a given antagonist microorganism and the plant being great for both under mutual benefit throughout biological control processes. Often phytohormones production by antagonistic microorganisms influence on growth promotion. Yeasts species had stand great performance to do so once some studies have already recorded their skill as well as their phytohormones production. We aimed at showing up vegetative growth promotion in bean plants quantifying phytohormones production by *Rhodotorula glutinis* and *Sporidiobolus johnsonii* yeast species. For it to occur we set growth chambers using 0.5 L-vases filled with commercial substrate into which we placed seeds of IAPAR Tuiuiú bean cultivar. The treatments were defined as: 5 g L<sup>-1</sup> of cells from each yeast isolate *R. glutinis* (AH 14-3; AH 20-1) and *S. johnsonii* beyond their own individual culture filtrate and water as the control standard, replicated thrice each of them. We leaded three applies at the following developmental stages: V2 (10 days after sowing), V3 (20 days after sowing) and V4 (30 days after sowing). There were four collection times in order to evaluate plants development throughout the experiment in an interval of 10 days. The first one took place right after treatments application. During each collection evaluation we measured plant height, foliar area, dry matter of aerial part, dry matter of roots and total dry matter intending to do the math related to plant growth curve (MRPGV). Also, phytohormones production from these isolates was quantified. Plant height showed an increase at 39.7% under *S. johnsonii* culture filtrate. Other interesting outcome revealed 42.7% of foliar area increment in plants treated with *R. glutinis* (AH 14-3). Dry matter of aerial part got an increase of 33.1%, 33.5% and 29.5% by *R. glutinis* cells (AH 14-3), *R. glutinis* culture filtrate (AH 14-3) and *R. glutinis* cells (AH 20-1), respectively. In turn, dry matter of roots was 27.8% superior for plants treated with *R. glutinis* cells (AH 14-3). Finally,

total dry matter reached rates of 31.8%, 31.3% and 25.4% under the influence of *R. glutinis* cells (AH 14-3), *R. glutinis* culture filtrate (AH 14-3) and *R. glutinis* cells (AH 20-1), in that order. All isolates produced the following phytohormones 3-indolacetic acid, 3-indolbutyric acid and gibberellin (GA4). In all it is to say that all isolated displayed promising characteristics for growth promotion purposes, mainly by auxins and gibberellins synthesis.

**Key-words:** Biological Control. Phytohormones. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Phaseolus vulgaris*.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O crescimento vegetal pode ocorrer numa relação mutualística entre um determinado microrganismo e a planta hospedeira, quando ambos se beneficiam desta relação. O grande benefício dessa relação pode ser traduzido no controle biológico de doenças, por auxiliar a planta na absorção de nutriente e água, ou até induzir a síntese de fitohormônios, ou propriamente a produção de fitohormônios pelo agente de controle biológico. Compensando, assim, os danos causados pelo patógeno na planta (MACHADO et al., 2011; KHAN et al., 2012).

Esse mecanismo é tido como compensatório, haja vista que proporcionará condições favoráveis para o desenvolvimento do hospedeiro, mesmo com a infecção de um patógeno, que pouco influenciará no desenvolvimento e produtividade da planta (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018). Esse mecanismo pode estar relacionado ao aumento da área de absorção de nutrientes e água pelas raízes, fixando e disponibilizando nutrientes para planta, promoção da expansão e crescimento de folhas, mantendo ou elevando a área fotossinteticamente ativa, além da produção de aminoácidos e vitaminas, prontamente disponíveis para a planta, compensando as perdas ocasionadas pelo patógeno.

Alguns microrganismos são capazes de sintetizar auxina, giberelina, citocinina e etileno, ente outros fitohormônios, importantes para regular o crescimento da planta, divisão celular e senescência (MACHADO et al., 2011; KHAN et al., 2012; WAQAS et al. 2012; IGNATOVA et al., 2015).

Dessa maneira, os fitohormônios atuam na germinação, enraizamento, crescimento e floração, processos de grande importância para a planta. Eles podem ser produzidos pela própria planta ou serem disponibilizados através da produção

exógena destes, podendo impactar diretamente no crescimento, desenvolvimento e na produtividade vegetal (TAIZ et al., 2017).

As leveduras são importantes antagonistas utilizadas para o controle biológico, com capacidade de sintetizar fitohormônios. Auxiliando, assim, no controle biológico de doenças através da promoção de crescimento, reduzindo os impactos causados pelos patógenos (NUTARATAT et al., 2014; FU et al., 2016). Isso pode refletir no incremento do desenvolvimento da planta, reduzindo ou compensando as perdas causadas por patógenos.

Estudos mostraram que as leveduras *R. glutinis* (AH 14-3), *S. Johnsonii* (AH 16-1) e *R. glutinis* (AH 20-1) foram capazes de reduzir a severidade do cretamento bacteriano do feijoeiro causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (HELING, 2016; CARVALHO, 2017).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii* e seus respectivos filtrados de cultura na mediação do crescimento do feijoeiro.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Ensaio de promoção de crescimento

Para constatar a promoção de crescimento, o experimento foi conduzido em esquema de blocos casualizados, em sala com luz artificial. Para tanto, utilizou-se vasos de 0,5 L, com substrato comercial Humusfertil® para germinação de sementes de hortaliças (composto por: vermicomposto, casca de pinus, areia para substrato e vermiculita). A adubação foi realizada com base numa expectativa de produtividade de 3000 kg ha<sup>-1</sup> (aplicando 14 g de formulado 10-20-20, 50% no momento da semeadura e 50% no estágio V3). A semeadura foi realizada acondicionando-se três sementes por vaso da cultivar IAPAR Tuiuiú. Após a germinação, foi realizado raleio das plantas, mantendo uma planta por vaso.

As leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) isoladas de flor de roseira, folha de pitangueira e folha de beijinho, respectivamente. Utilizadas como tratamentos, pertencem à coleção de leveduras do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do

Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, preservados através do método de Castellani (ODDS, 1991).

Elas foram cultivadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo meio YEPG líquido (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glicose, 1000 mL água), para a obtenção de células de leveduras e produção de compostos não voláteis (filtrado de cultura). As leveduras foram repicadas e os frascos levados para agitação (150 rpm) por sete dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após este período, centrifugou-se a 290 g por 5 minutos, para obtenção das células separadas do meio de cultura. As células foram ressuspendidas e ajustadas para concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. O sobrenadante foi esterilizado por filtração em membrana PES 0,45 µm, o qual foi denominado filtrado de cultura.

Os tratamentos utilizados para o presente experimento foram as suspensões de células de cada isolado, bem como os seus respectivos filtrado de cultura e o controle (água destilada), totalizando sete tratamentos: 5 g L<sup>-1</sup> célula de *R. glutinis* (AH 14-3), 5 g L<sup>-1</sup> células de *R. glutinis* (AH 20-1), 5 g L<sup>-1</sup> células de *S. johnsonii* (AH 16-1), filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 20-1), filtrado de cultura de *S. johnsonii* (AH 16-1) e controle, com três repetições.

#### **4.2.2 Aplicação dos tratamentos, coletas e variáveis analisadas**

Para determinar a análise de crescimento foram realizadas três aplicações e quatro momentos de coletas, objetivando avaliar o desenvolvimento das plantas ao decorrer do experimento. As aplicações dos tratamentos foram realizadas nos estádios fenológicos V2 (10 dias após a semeadura), V3 (20 dias após a semeadura) e V4 (30 dias após a semeadura). Foram realizadas quatro coletas, em intervalos de 10 dias, com excessão da quarta coleta, que foi realizada três dias após a terceira em decorrência de estresse por conta da alta temperatura próximo às lâmpadas. A primeira coleta foi realizada imediatamente antes da aplicação dos tratamentos, no estágio V2, a segunda antes da segunda aplicação dos tratamentos (V3), a terceira antes da terceira aplicação dos tratamentos (V4) e a quarta, três dias após a última aplicação (V4). Em cada coleta foi realizada análise de altura de planta, área foliar, volume de raiz, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e massa seca total.

Com as variáveis de crescimento obtidas, elaborou-se a curva de progresso de crescimento vegetal e procedeu-se o cálculo da área abaixo da curva de

crescimento vegetal (AACCV), para cada uma das variáveis, com auxílio da equação abaixo, adaptada de Shaner e Finney (1977).

$$AACCV = \sum_i^{n-1} [(c_i + (c_i + 1)) * 0,5] * [(t_i + 1) - t_i] \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

n é o número de avaliações, c é o resultado variável analisada e [(ti+1)-ti] é o intervalo de avaliações consecutivas.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey, utilizando o *software* GENES (CRUZ, 2013).

#### 4.2.3 Produção de fitohormônio por *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii*

Processou-se a análise da produção de fitohormônios pelas leveduras, sendo que os compostos não voláteis produzidos em meio líquido, como já citado anteriormente, foram filtrados em filtro de membrana PES com poro de 0,45 µm e enviados para o laboratório JM Bioanálises.

Para proceder a análise inicialmente foi preparado um mix com os fitohormônios a serem testados. Para tanto, foi pesado em balança analítica aproximadamente 0,010 g dos padrões analíticos de zeatina ribosídeo trans, ácido giberelico, ácido 3-indolacético, ácido salicílico, ácido abscísico, ácido indol-3-butírico, ácido jasmônico, giberelina GA4 e ribosídeo 6-(y,y-dimetilalilamino) purina, em balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se o volume com metanol, levou-se a banho ultrassônico por 5 minutos e agitou-se em vórtex por 60 segundos.

Uma solução Mix de aproximadamente 10,00 µg mL<sup>-1</sup> em metanol (solução intermediária), foi utilizada para preparar a curva analítica. Esta solução mix foi diluída para obter as concentrações 200,0; 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; e 3,125 ng mL<sup>-1</sup>. Sendo então realizado o cálculo do limite de quantificação (LQ) de 0,001 mg L<sup>-1</sup>, através da equação abaixo.

$$LQ = \frac{10\sigma}{\beta_1} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$\beta$ : Inclinação da curva de calibração.

$\sigma$ : Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

Depois, realizou-se a pesagem em balança analítica aproximadamente 0,1 g das amostras e dilui-se em balão volumétrico de 10,0 mL em metanol. Injetou-se 20  $\mu$ L em LC-MS/MS, cromatógrafo Líquido Varian 325-MS. Fase móvel A – Água deionizada 100% B – Metanol 100% (fase móvel foi composta de 30% do solvente A e 70% do solvente B), em fluxo de 0,25 mL min<sup>-1</sup>. E foi utilizado como fase estacionária a coluna polaris C18-A (50 x 2,0 mm; 5  $\mu$ m). Os resultados obtidos foram confrontados com os obtidos para os padrões em detector de espectrometria de massas.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis temperatura e umidade relativa na câmara de crescimento durante o desenvolvimento do experimento foram monitoradas. A temperatura variou de 20,5 a 35,8 °C (mínima e máxima) e a umidade relativa variou de 27% a 75% (mínima e máxima). Que foram adequadas para o desenvolvimento da cultura, com temperatura média próxima dos 28 °C. Segundo Silva, Reichert e Reinert (2006) a cultura tem um ótimo desenvolvimento na faixa de temperatura de 15 a 29 °C.

Os resultados para análise de crescimento vegetativo da cultura do feijoeiro demonstram que as leveduras influenciaram no seu desenvolvimento. A altura foi incrementada pelo tratamento com filtrado de cultura de *Sporidiobolus johnsonii* (AH 20-1), apresentando a maior área abaixo da curva de altura de plantas (Tabela 1), com altura final de 52,2 cm (39,7% superior ao controle) (Figura 1).

Para área abaixo da curva de área foliar o tratamento que apresentou maior incremento de área foi utilizando células de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3) apresentando 811,1 cm<sup>2</sup> final de área (42,7% de incremento).

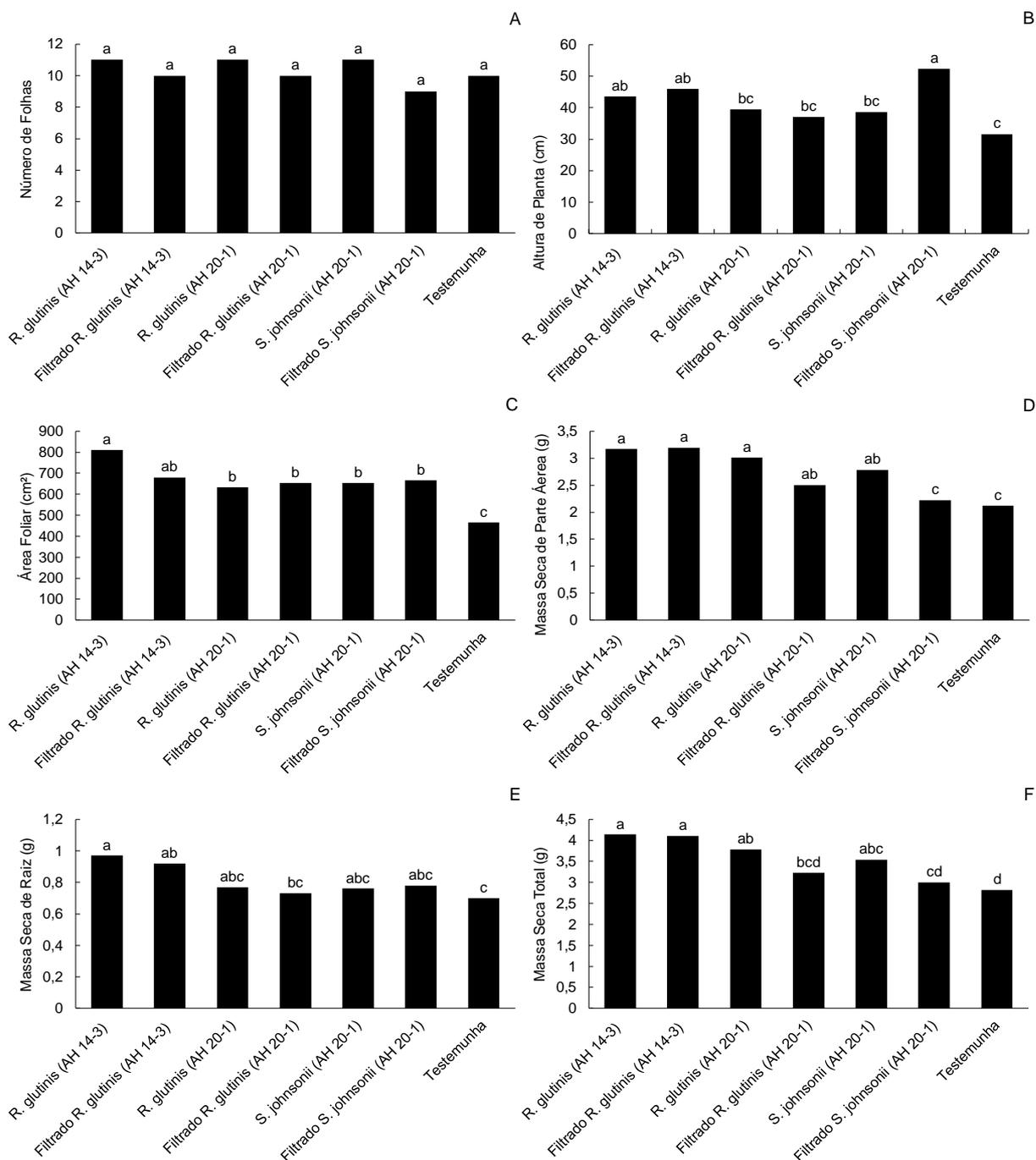
Na massa seca de parte aérea os tratamento que apresentaram maiores acúmulos foram células de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 14-3) e células de *R. glutinis* (AH 20-1), apresentando massa seca de 3,17; 3,19 e 3,01 g respectivamente (incremento de 33,1%, 33,5% e 29,5%, respectivamente) (Tabela 1 e Figura 1).

O incremento de massa seca de raiz foi observado apenas para o tratamento com células de *R. glutinis* (AH 14-3), com a maior área abaixo da curva e média final de 0,97 g (apresentando incremento de 27,84%). Quanto à massa seca total, os maiores incrementos foram apresentados pelos tratamentos com células de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 14-3) e células de *R. glutinis* (AH 20-1), apresentando massa seca total de 4,14; 4,11 e 3,78 g, respectivamente (incremento de 31,8%, 31,3% e 25,4%, respectivamente) (Tabela 1 e Figura 1). A área abaixo da curva de número de folhas não apresentou diferença, apresentando média de 10 folhas por planta (Figura 1A).

**Tabela 1.** Área abaixo da curva de crescimento vegetal do feijoeiro, para as variáveis altura de plantas, área foliar (AF), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST), de plantas tratadas com com células de *Rhodotorula glutinis* (isolados AH 14-3 e AH 20-1), filtrado de cultura destes isolados, células e filtrado de cultura de *Sporidiobolus johnsonii*.

Tratamento	Área Abaixo da Curva de Crescimento Vegetal (AACCV)				
	Altura	AF	MSPA	MSR	MST
<i>R. glutinis</i> (AH14-3)	567 ab	8695 a	26,9 a	9,76 a	36,8 a
Filtrado <i>R. glutinis</i> (AH 14-3)	596 ab	7930 ab	29,3 a	8,77 ab	37,1 a
<i>R. glutinis</i> (AH20-1)	503 bc	7302 abc	27,3 a	8,15 ab	32,8 ab
Filtrado <i>R. glutinis</i> (AH20-1)	525 abc	7985 ab	26,2 ab	8,67 ab	35,9 a
<i>S. johnsonii</i>	501 bc	8269 ab	26,1 ab	6,98 abc	33,1 ab
Filtrado <i>S. johnsonii</i>	629 a	6996 cb	21,5 bc	6,25 bc	26,5 b
Controle	421 c	5891 c	20,2 c	5,10 c	25,3 b
Média Geral	534	7581	25,4	7,67	32,5
CV%	6,87	6,99	6,51	13,07	8,82

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de erro.



**Figura 1.** Parâmetros de crescimento na última avaliação para o de número de folhas (A), Altura (B), Área Foliar (C), Massa Seca de Parte Aérea (D), Massa Seca de Raiz (E) e Massa Seca Total (F) de plantas de feijoeiro tratados com células de *Rhodotorula glutinis* (isolados AH 14-3 e AH 20-1), filtrado de cultura destes isolados, células e filtrado de cultura de *Sporidiobolus johnsonii*.

Estes resultados demonstram a promoção de crescimento proporcionado pelas leveduras, favorecendo o desenvolvimento do feijoeiro. Apresentando-se com

potencial compensatório no processo infeccioso, indiretamente participar do controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Como constatado por Carvalho (2017), utilizando esses isolados observou a redução de até 68% da severidade do crestamento bacteriano comum do feijoeiro e produção de 16% e 12% superior quando aplicado células dos isolados *R. glutinis* (AH 14-3) e *S. johnsonii*, respectivamente.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores do coeficiente de correlação (> 0,99). Apresentando resposta linear do detector na faixa dinâmica de trabalho, atendendo as especificações da ANVISA (BRASIL, 2017) e Miller, Miller e Miller (2018).

Os limites de quantificação estão adequados para o método em HPLC-MS, sendo que estes foram inferiores aos pontos mais baixos da concentração das curvas analíticas na faixa de trabalho. Sendo, assim, sensível para realizar a quantificação dos fitohormônios produzidos pelos isolados de leveduras (Tabela 2), encontrando-se dentro do intervalo recomendado (BRASIL, 2017; MILLER; MILLER; MILLER, 2018).

**Tabela 2.** Produção de fitohormônios pelas leveduras *Rhodotorula glutinis* (isolados AH 14-3 e AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii*.

Fitohormônios	R <sup>2</sup>	LQ	<i>R. glutinis</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>S. johnsonii</i>
			(AH 14-3)	(AH 20-1)	
————— µg mL <sup>-1</sup> —————					
Zeatina ribosídeo trans	0,9947	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Ácido giberélico	0,9961	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Ácido 3-indolacético	0,9965	0,001	0,604	0,654	1,420
Ácido salicílico	0,9986	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Ácido abscísico	0,9975	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Ácido 3-indolbutírico	0,9971	0,001	1,043	0,825	0,552
Ácido jasmônico	0,9984	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Giberelina GA4	0,9926	0,001	0,476	1,334	0,670
Ribosídeo 6-(γ,γ-dimetilalilamino) purina	0,9975	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlação; LQ: Limite de quantificação.

O isolado *R. glutinis* (AH 14-3) sintetizou 0,604 µg mL<sup>-1</sup> de Ácido 3-indolacético, 1,043 µg mL<sup>-1</sup> ácido 3-indolbutírico e 0,476 µg mL<sup>-1</sup> de giberelina GA4.

O outro isolado de *R. glutinis* (AH 20-1) sintetizou 0,654  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido 3-indolacético, 0,825  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ácido 3-indolbutírico e 1,334  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de giberelina GA4. E o isolado de *S. johnsonii* sintetizou 1,420  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido 3-indolacético, 0,552  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ácido 3-indolbutírico e 0,670  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de giberelina GA4 (tabela 2).

Segundo Nutaratat et al. (2014), os níveis de síntese de auxinas pelas leveduras, são considerados baixos, pois, segundo os autores, o nível baixo vai até 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e nível alto é acima de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Como se observa, os três isolados são capazes de sintetizar através do seu metabolismo duas formas de auxina e uma de giberelina. No entanto, em concentrações diferentes, sendo que o isolado *R. glutinis* (AH 14-3) sintetizou em maior concentração o ácido 3-indolbutírico. O outro isolado de *R. glutinis* (AH 20-1) sintetizou mais giberelina (GA4). E, o isolado de *S. Johnsonii*, sintetizou mais ácido 3-indolacético (Tabela 2).

Assim, observa-se que os resultados da análise de crescimento foram influenciados pelos isolados, pois estes são capazes de sintetizar fitohormônios, promovendo o desenvolvimento das plantas de feijão.

Abd El-Hafez e Shehata (2001) observaram que uma cepa de *Rhodotorula* sp. apresentou promoção de crescimento em plantas. Também foi relatado por El-Tarabily (2004), que a aplicação via solo com *R. glutinis* promoveu o crescimento de beterraba açucareira. Resultados que corroboram com os resultados obtidos na presente pesquisa, para cultura do feijoeiro.

Este mecanismo auxiliar de controle biológico de doenças em plantas normalmente está associado à síntese de fitohormônios e metabólitos secundários pelos microrganismos (HELMAN; BURDMAN; OKON, 2011; HERMOSA et al., 2012; NUTARATAT et al., 2014). A promoção de crescimento em plantas foi associada à síntese de auxinas (LE FLOCH et al., 2003; LIMTONG et al., 2014), responsáveis pela divisão e alongamento celular. Elas são importantes na formação e manutenção de meristemas, essenciais para estabelecimento de todas as partes das plantas (TIBUBOS; HURTADO; CRITCHLEY, 2017; TAIZ et al., 2017).

A auxina apresenta-se em algumas formas químicas diferentes nas plantas, a mais abundante e atuante nas plantas é o ácido 3-indolacético (SIMON; PETRÁŠEK, 2011), uma das formas sintetizadas pelos isolados, evidenciando a atuação na divisão e alongamento celular que cabe ao ácido 3-indolacético. Enquanto o ácido 3-indolbutírico pode ser considerado como uma forma mais estável de armazenamento

deste fitohormônio (NORDSTRÖM; JACOBS; ELIASSON, 1991) e pode ser novamente convertido em ácido 3-indolacético através da ação de enzimas de oxidação peroxissômica (EPSTEIN; MÜLLER, 1993; ZOLMAN et al., 2008). Além disso o ácido 3-indolbutírico possui papel importante no desenvolvimento de raízes (FRICK; STRADER, 2018), deixando clara a atuação destes regulando o crescimento das plantas.

As giberelinas possuem funções importantes em todas as fases de crescimento e desenvolvimento das plantas. Desde a germinação, crescimento de caule, expansão das folhas, desenvolvimento de flores, produção de pólen, até a senescência da planta (FALKOWSKA et al., 2011; DAVIÈRE et al., 2014; BRIONES-MORENO et al., 2017; TAIZ et al., 2017). Outro fitohormônio sintetizado pelos isolados, que possui papel importante como regulador de crescimento, dentre todas as giberelinas conhecidas (aproximadamente 125) a giberelina (GA4) é biologicamente ativa em plantas (TAIZ et al., 2017).

A produção de fitohormônios pelos isolados de leveduras, explicam os resultados obtidos na análise de crescimento. O incremento de 39,7% na altura de planta obtido com aplicação de filtrado de cultura de *S. johnsonii* estimulou o crescimento de planta. Isso se deve ao fato de que este isolado produz em maior concentração ácido 3-indolacético, resultando no incremento em altura de planta através da divisão e alongamento celular ocasionado em decorrência do estímulo deste fitohormônio (SIMON; PETRÁŠEK, 2011; TIBUBOS; HURTADO; CRITCHLEY, 2017; TAIZ et al., 2017).

A área foliar apresentou incremento de 42,7%, em plantas tratadas com suspensão de células de *R. glutinis* (AH 14-3), sendo que este isolado apresentou síntese de auxina e giberelina. Estes fitohormônios atuam na divisão e alongamento celular e, conseqüentemente, na expansão de folhas (FALKOWSKA et al., 2011; TAIZ et al., 2017), o que explica o resultado obtido.

Para massa seca de parte aérea e massa seca total os tratamentos células de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 14-3) e células de *R. glutinis* (AH 20-1) apresentaram incremento. Assim, estes resultados também podem ser explicados pela capacidade de síntese de fitohormônios por parte destes isolados, por atuarem como promotores de crescimento de plantas (FALKOWSKA et al., 2011; TAIZ et al., 2017).

Quanto à massa seca de raiz, o tratamento com maior incremento foi utilizando suspensão de células de *R. glutinis* (AH 14-3), apresentando 27,8% superior ao controle. Este resultado é confirmado pelo relato de Frick e Strader (2018), de que o ácido 3-indolbutírico possui grande importância no desenvolvimento de raízes.

Auxinas produzidas por microrganismos promovem o crescimento das raízes laterais e pelos radiculares, que têm grande importância no crescimento das plantas. Visto que, desta forma, irá maximizar a absorção de água e nutrientes, além maior tolerância das plantas a estresses (HALLIDAY; MARTÍNEZ-GARCÍA; JOSSE, 2009; MOLLER; WEIJERS, 2009).

Ignatova et al. (2015) identificaram a síntese de auxina pelo isolado de *R. mucilaginoso*, o qual produziu  $45,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de auxina, valor superior ao produzido nos isolados utilizados no presente trabalho, assim como relatado por El-Tarabily (2004). Neste caso o autor trabalhou com um isolado de *R. glutinis*, e observou a produção de  $24,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de auxina. A diferença nos resultados pode ser explicada pelo método utilizado, cujos autores quantificaram por colorimetria, sendo a precisão desse método inferior ao método de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrômetro de massas. Embora os valores numéricos estejam distantes é preciso considerar o efeito no fenótipo.

Fu et al. (2016), trabalhando com *Sporidiobolus ruineniae*, identificaram a síntese de  $69,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  de auxina, valor também superior ao obtido no presente trabalho com o isolado de *S. johnsonii*. Deixando claro que a síntese de auxinas é variável em função da espécie do microrganismo.

Nutaratat et al. (2014) relataram a produção de  $2,8 \text{ mg g}^{-1}$  e  $29,3 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido 3-indolacético, pelos isolados *R. taiwanensis* e *R. Paludigenum*, respectivamente. Demonstrando que o gênero *Rhodotorula* sp. possui a capacidade de sintetizar este fitohormônio, deixando claro que pode ser empregado para a promoção de crescimento de plantas.

No gênero *Rhodotorula*, foram identificadas como capazes de produzir IAA em muitos estudos, *R. graminise* e *R. mucilaginoso*, com a capacidade de promoção do crescimento de várias plantas distintas, como o álamo, pimenta, milho e tomate (KHAN et al., 2012; KNOTH et al., 2012; KNOTH et al., 2014). O que indica o efeito dos fitohormônios produzidos pelos isolados de leveduras, atuando na promoção de crescimento do feijoeiro.

Devido às atividades fisiológicas da giberelina na planta, observam-se diversas aplicações comerciais. Como o principal efeito observado nas plantas está normalmente relacionado à sua promoção de crescimento e otimização da produção (SALAZAR-CEREZO et al., 2018), o efeito tem sido associado a diferentes fungos e bactérias, culminando em impactos na produção agrícola (ERIKSSON et al., 2000).

Segundo Waqas et al. (2012), fungos como *Phoma glomerata* e *Penicillium* sp. são capazes de produzir giberelina, resultando no crescimento de plantas e acréscimo em biomassa, na cultura do pepino. Além disso, apresentou função importante, reduzindo estresses de salinidade e déficit hídrico. Também melhorou a assimilação dos nutrientes potássio, cálcio e magnésio, assim como na presente pesquisa em que foi observado incremento de área foliar e massa seca com a aplicação de isolados de leveduras.

Hamayun et al. (2010) observaram a produção de  $0,01335 \mu\text{g mL}^{-1}$  de giberelina, por *Cladosporium* sp, resultando em aumento de 12,9 cm de altura na cultura do o pepino, promovendo crescimento de plantas. Assim como os resultados obtidos pelos isolados de leveduras, sobre a cultura do feijoeiro.

Já Waqas, Khan e Lee (2014), observaram a produção entre 0,0002 a 0,008  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de giberelina (GA4) e a produção entre 0,00023 a 0,0715  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido 3-indolacético, por *Chrysosporium pseudomerdarium*, *Aspergillus fumigates*, *Paecilomyces* sp., *Phoma glomerata* e *Paecilomyces formosus*. Apresentando, então, incremento de altura e massa seca na cultura do arroz, corroborando com os como os resultados observados na cultura do feijão com os isolados de levedura, demonstrando o potencial de promoção de crescimento pelos isolados de levedura.

As evidências indicam a promoção de crescimento na cultura diante da aplicação de isolados de *R. glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1), *S. johnsonii* e seus filtrados de cultura, por meio da síntese dos fitohormônios auxina e giberelina, culminando no aumento da altura, área foliar e massa seca das planta de feijoeiro. Reforçando, assim, que a promoção de crescimento de plantas pode atuar de forma compensatória, mantendo os níveis de produção da cultura, mesmo com o desenvolvimento de crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

Como relatado por Carvalho (2017) que, na oportunidade, observou a redução de até 68% da severidade da doença e a produção foi de 16% e 12% superior quando aplicado células dos isolados *R. glutinis* (AH 14-3) e *S. Johnsonii*, respectivamente.

Ainda, Carvalho (2017) observou incremento de 25,2% na massa seca de parte aérea com a aplicação de 10 g L<sup>-1</sup> *R. Glutinis*, 23,5% na massa seca de raiz aplicando 6,55 g L<sup>-1</sup> de *R. glutinis* e *S. johnsonii*. Resultados semelhante ao obtido na presente pesquisa, confirmando a promoção de crescimento através destes isolados de leveduras.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Os Isolados de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii*, assim como seus respectivos filtrados de cultura, promovem o crescimento do feijoeiro, pela síntese de fitohormônios (Ácido 3-indolacético e Ácido 3-indolbutírico) e giberelina (GA4).

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-HAFEZ, A. E.; SHEHATA, S. F. Field evaluation of yeasts as a biofertilizer for some vegetable crops. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, p. 169–182, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, Brasília, 2017.

BRIONES-MORENO, A.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, J.; VARGAS-CHÁVEZ, C.; ROMERO-CAMPERO, F. J.; ROMERO, J. M.; VALVERDE, F.; BLÁZQUEZ, M. A. Evolutionary analysis of DELLA-associated transcriptional networks. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 626, p. 1-11, 2017.

CARVALHO, J. C. **Manejo do crescimento bacteriano comum do feijoeiro por *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii***. 2017, 39 f. Dissertação (Mestrado Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 2017.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DAVIÈRE, J. M.; WILD, M.; REGNAULT, T.; BAUMBERGER, N.; EISLER, H.; GENSHIK, P.; ACHARD, P. Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. **Current Biology**, v. 24, p. 1923-1928, 2014.

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

EPSTEIN, E.; MÜLLER, J. L. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. **Plant Physiology**, v. 88, p. 382–389, 1993.

ERIKSSON, M. E.; ISRAELSSON, M.; OLSSON, O.; MORITZ, T. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 784-788, 2000.

FALKOWSKA, M. F.; PIETRYCZUK, A. P.; BAJGUZ, A. B.; GRYGORUK, A. G.; The effect of gibberellic acid (Ga3) on growth, metal biosorption and metabolism of the green algae *Chlorella vulgaris* (chlorophyceae) beijerinck exposed to cadmium and lead stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 1, p. 53–59, 2011.

FRICK, E. M.; STRADER, L. C. Roles for IBA-derived auxin in plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 169-177, 2018.

FU, S. F.; SUN, P. F.; LU, H. Y.; WEI, J. Y.; XIAO, H. S.; FANG, W. T.; CHENG, B. Y.; CHOU, J. Y. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spathulata* Lab. **Fungal Biology**, v. 120, n. 3, p. 433-448, 2016.

HALLIDAY, K. J.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. F.; JOSSE, E-M. Integration of light and auxin signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. 1-11, 2009.

HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; KHAN, A. L.; REHMAN, G.; KIM, Y-H.; IQBAL, I.; HUSSAIN, J.; Sohn, E-Y.; LEE, I-J. Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.), **Mycologia**, v. 102, n. 5, p. 989-995, 2010.

HELING, A. L. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial de leveduras como agentes de proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum**. 2016, 51f. Dissertação (Mestrado Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 2016.

HELMAN, Y.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: ROSENBERG, E.; GOPHNA, U. (eds) **Beneficial microorganisms in multicellular life forms**. Berlin: Springer, 2011. p 89–103.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17–25, 2012.

IGNATOVA, L. V.; BRAZHNIKOVA, Y. V.; BERZHANOVA, R. Z.; MUKASHEVA, T. D. Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. **Microbiological Research**, v. 175, p. 78-83, 2015.

KHAN, Z.; GUELICH, G.; PHAN, H.; REDMAN, R.; DOTY, S. Bacterial and yeast endophytes from poplar and willow promote growth in crop plants and grasses. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

KNOTH, J. L.; KIM, S-H.; ETTL, G. J.; DOTY, S. L. Biological nitrogen fixation and biomass accumulation within poplar clones as a result of inoculations with endophyte consortia. **New Phytologist**, v. 201, p. 599-609, 2014.

KNOTH, J. L.; KIM, S-H.; ETTL, G. J.; DOTY, S. L. Effects of cross host species inoculation of nitrogen-fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 5, n. 4, p. 408-418, 2012.

LE FLOCH, G.; REY, P.; BENIZRI, E.; BENHAMOU, N.; TIRILLY, Y. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. **Plant Soil**, v. 257, n. 2, p. 459–470, 2003.

LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R.; YONGMANITCHAI, W.; KAWASAKI, H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 1785-1796, 2014.

MACHADO, R. G.; DE SÁ, E. L. S.; DAMASCENO, R. G.; HAHN, L.; ALMEIDA, D.; MORAES, T.; CAMARGO, F. A. O.; REARTES, D. S. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. **Ciência e Natura**, v. 33, n. 2, p. 111-126, 2011.

MEDEIROS, F. H. V.; DA SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia Volume 1: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2018. p. 261-274.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C.; MILLER, R. D. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6 Ed., Gosport, UK; Ashford Colour Press Ltda., 2018. 292p.

MOLLER, B.; WEIJERS, D. Auxin control of embryo patterning. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 5, p. 1-13, 2009.

NORDSTRÖM, A. C.; JACOBS, F. A.; ELIASSON, L. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings, **Plant Physiology**, v. 96, p. 856–861, 1991.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, n. 8, p. 683-694, 2014.

ODDS, F. C. Long term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V. 29, n.6, p. 413-415, 1991.

SALAZAR-CEREZO, S.; MARTÍNEZ-MONTIEL, N.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J.; PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; MARTÍNEZ-CONTRERAS, R. D. Gibberellin biosynthesis and metabolism: a convergent route for plants, fungi and bacteria. **Microbiological Research**, v. 208, p. 85-98, 2018.

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

SILVA, V. R.; REICHERT, J. M.; REINERT, D. J. Variação na temperatura do solo em três sistemas de manejo na cultura do feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 391-399, 2006.

SIMON, S.; PETRÁŠEK, J. Why plants need more than one type of auxin. **Plant Science**, v. 180, p. 454–460, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2017. 858p.

TIBUBOS, K. R.; HURTADO, A. Q.; CRITCHLEY, A. T. Direct formation of axes in new plantlets of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty, as influenced by the use of AMPEP K<sup>+</sup>, spindle inhibitors, and plant growth hormones. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 5, p. 2345-2349, 2017.

WAQAS, M.; KHAN, A. L.; KAMRAN, M.; HAMAYUN, M.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indole acetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, p. 10754-10773, 2012.

WAQAS, M.; KHAN, A. L.; LEE, I-J. Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 478-487, 2014.

ZOLMAN, B. K.; MARTINEZ, N.; MILLIUS, A.; ADHAM, A. R.; BARTEL, B. Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. **Genetics**, v. 180, p. 237–251, 2008.

## 5 ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DE ROTAS METABÓLICAS EM FEIJOEIRO LIGADAS À INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA PELAS LEVEDURAS *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii*

**Resumo:** A resistência em plantas pode ser ativada por microrganismos classificados como agentes de controle biológico. Neste sentido, leveduras residentes do filoplano possuem potencial para atuar no controle biológico e na indução de resistência a doenças de plantas. O objetivo deste trabalho foi demonstrar a ação das leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolus Johnsonii* na indução de síntese de ácido salicílico, ácido jasmônico e metil jasmonato, do feijoeiro como mediadores de resistência contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Foi realizado experimento em câmara de crescimento utilizando-se vasos de 0,5 L, contendo substrato comercial, no qual foi semeado o cultivar de feijão IAPAR Tuiuiú. Os tratamentos foram: 5 g L<sup>-1</sup> de células de cada isolado de levedura *R. glutinis* (isolados AH 14-3 e AH 20-1), *S. johnsonii* e o filtrado de cultura de cada um destas leveduras e um controle totalizando sete tratamentos, com duas repetições cada. Os tratamentos foram aplicados no estágio V2 e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculado 24 horas após. Foram realizadas seis coletas de tecido foliar, iniciando-se imediatamente antes da aplicação dos tratamentos e 3h, 6h, 24h, 27h e 30 horas após a aplicação dos tratamentos. Detecção, identificação e quantificação de ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico foram realizados em HPLC-PAD. Os tratamentos com filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 20-1), suspensão de células de *S. johnsonii* e seu filtrado de cultura apresentaram incremento na concentração de ácido jasmônico, com 169,4, 183,1 e 175,9 µg g<sup>-1</sup> de tecido fresco, respectivamente. Quanto ao incremento de ácido salicílico, este ocorreu 30 horas após a aplicação do tratamento com suspensão de células de *R. glutinis* (AH 14-3), com a concentração de 5,18 µg g<sup>-1</sup> de tecido fresco. Pode-se concluir que os tratamentos utilizando filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 20-1), suspensão de células e filtrado de cultura de *S. johnsonii* foram capazes de aumentar a síntese de ácido jasmônico três horas após a aplicação, indicando que são capazes de ativar esta via de sinalização. Os resultados para metil jasmonato não foram conclusivos, provavelmente pela característica deste composto de ser volátil. Para o ácido salicílico, a aplicação da suspensão de células de *R. glutinis* (AH 14-3) indicou a possível ocorrência de efeito *priming*, apresentando

incremento 30 horas após a sua aplicação e seis horas após a inoculação do patógeno.

**Palavras-chave:** Ácido Jasmônico. Ácido Salicílico. Cromatografia. Controle Biológico. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Phaseolus vulgaris*.

**Abstract:** Resistance activation in plants may be mediated by biological control agents that induce signaling phytohormones such as salicylic acid, jasmonic acid and methyl jasmonate. In that, several yeasts species belonging to phylloplane have been shown to possess potential value for resistance inducement. This work aimed at screening *Rhodotorula glutinis* and *Sporidiobolus Johnsonii* yeasts species activity to induce salicylic acid, jasmonic acid and methyl jasmonate synthesis in bean crop as resistance mediators against *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* pathogenesis. For this to happen it was run a trial into growth chamber by using 0.5 L vases fulfilled with commercial substrate and sowed with IAPAR Tuiuiú bean cultivar. The treatments were defined as: 5 g L<sup>-1</sup> of cells from each yeast isolate *R. glutinis* (AH 14-3; AH 20-1) and *S. johnsonii* (AH 16-1) beyond their own individual culture filtrate and water as the control standard, making a total of 7 treatments with two replications each. As soon as bean plants reached V2 development stage the treatments were applied. Passed 24 hours we inoculate *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Analysis consisted of six foliar-tissue collections right before treatments application. Also, the very same was performed passed 3h, 6h, 24h, 27h and 30 hours. With regards to salicylic acid, jasmonic acid and methyl jasmonate we performed detection, identification and quantification HPLC-PAD was set. In summary, culture filtrates of *R. glutinis* (AH 20-1) and of *S. johnsonii* as well as cell suspension of *S. johnsonii* increased jasmonic acid at rates of 169.4, 75.9 and 183.1 µg g<sup>-1</sup> of fresh tissue, respectively. Salicylic acid rise took place only passed 30 h from *R. glutinis* (AH 14-3) cell-suspension applies, ending up with 5.18 µg g<sup>-1</sup> of fresh tissue concentration. Results indicated ability of *R. glutinis* (AH 20-1) and *S. johnsonii* culture filtrates as well as *S. johnsonii* cell suspension to increase jasmonic acid synthesis in only 3h hours since their application, suggesting positive influence on this signaling pathway. Results on methyl jasmonate were non-conclusive probably due to its volatility. We checked a track of priming effect for salicylic acid led by *R. glutinis* (AH 14-3) cell suspension after 6h of pathogenic inoculation.

**Key-words:** Jasmonic Acid. Salicylic Acid. Biological Control. Methyl Jasmonate. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Phaseolus vulgaris*.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Indução de resistência é a capacidade das plantas de reagirem a indutores, os quais podem ser físicos, químicos ou biológicos. Esses indutores desencadeiam uma cascata de sinais nas células, ativando rotas metabólicas, culminando na produção de mecanismos de defesa (CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015).

Esse fenômeno pode durar de dias até o ciclo todo da cultura, podendo, ainda, ser passado para próxima geração através da produção de sementes ou por enxertia. Apresenta amplo espectro, ou seja, não é restrito a apenas um patógeno, porém não apresenta risco de selecionar raças resistentes ao método de controle, por atuar por vários mecanismos de defesa (MEDEIROS; DA SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Normalmente, ocorre a ativação da sinalização pela via do ácido jasmônico, por microrganismos não patogênicos ou pela via do ácido salicílico, quando o indutor é um agente químico ou microrganismo patogênico. A indução de resistência deve ser realizada de forma preventiva e pode necessitar de reaplicações, para manter a planta induzida, para que se possa realizar a redução da severidade da doença (SANCHEZ; KAY, 2016; KARAPETYAN; DONG, 2018).

A indução de resistência ocorre em resposta à ativação da síntese de moléculas de sinalização após o reconhecimento de ataque do patógeno, indução sendo por um microrganismo saprófita ou agente abiótico. Assim, o teor de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno são alterados na indução de resistência, sendo que os dois primeiros são considerados os principais fitohormônios de defesa (CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015).

O ácido salicílico desempenha papel de regulador na germinação, maturidade dos frutos, regulação do desenvolvimento de flores, diferenciação sexual, movimento estomático. Além de ser necessário para induzir uma resposta de defesa contra patógenos (RASKIN, 1992). Sua síntese ocorre no cloroplasto após o reconhecimento do patógeno ou agente indutor, através da via de síntese do isochorismato (WILDERMUTH et al., 2001).

Os jasmonatos são fitohormônio lipídicos, sintetizados na rota dos octadecanoides (SOARES; MACHADO, 2007; FONSECA et al., 2009). Sua atuação na planta se dá como sinalizador, em resposta a estresses (ferimentos, exposição a

ozônio, estresse hídrico e ataque por patógenos necrotróficos e pragas), inibição da germinação de sementes e pólen, retardamento do crescimento de raízes, promoção da ondulação de gavinhas, regulação do acúmulo de proteínas de estoque durante o desenvolvimento das sementes, regulação temporal do crescimento e do desenvolvimento de flores (LORENZO; SOLANO, 2004; CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; GOOSSENS et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

Esses fitohormônios são importantes no processo de sinalização que regulam os genes de defesa. Ela ocorre com apenas um fitohormônio, ou seja, ocorrendo a síntese de ácido salicílico, a síntese do ácido jasmônico é inibida, enquanto o ácido jasmônico inibe a síntese de ácido salicílico (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009; PIETERSE et al., 2012; SANCHEZ; KAY, 2016; KARAPETYAN; DONG, 2018).

Diversos microrganismos podem atuar como indutores de rotas metabólicas nas plantas. Entre eles, fungos filamentosos, bactérias e leveduras, que produzem moléculas, que são reconhecidas por receptores específicos da planta, levando à ativação de mecanismos de resistência.

Zanardo, Pascholati e Fialho (2009) observaram que o filtrado de cultura de *Saccharomyces cerevisiae* foi eficiente no controle da antracnose em pepino causado por *Colletotrichum orbiculare* (Syn. *Colletotrichum lagenarium*), apresentando atividade eliciadora para induzir a defesa e redução da severidade da doença.

Assim como, a utilização de *Pseudozyma aphidis* promove a indução de resistência em *Arabidopsis*, reduzindo o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* de forma local e sistêmica. Indicando o efeito *priming* em *Arabidopsis*, estado em que a planta é induzida, mas não expressa mecanismos de resistência. Ou seja, os mecanismos de resistência só serão expressos quando a planta reconhecer a presença do patógeno (BUXDORF; RAHAT; LEVY, 2013). Esta sinalização de defesa é dependente de uma das vias, do ácido jasmônico (JA) ou do ácido salicílico (SA) (BUXDORF et al., 2013; GAFNI et al., 2015).

Foi comprovada a redução da severidade de crescimento bacteriano comum do feijoeiro em folhas tratadas com células de *R. glutinis* (AH 14-3), *S. johnsonii* (AH 16-1) e *R. glutinis* (AH 20-1), reduzindo a severidade em 79,5%, 53,1% e 52,9%, respectivamente (HELING, 2016). Demonstrando, assim, o potencial dessas leveduras para o controle da doença.

As leveduras são agentes potenciais para a indução de resistência em plantas contra patógenos. No entanto esta área de conhecimento ainda carece de mais pesquisas, para elucidar de qual forma estas atuam e qual via de sinalização é ativada.

Para elucidar a maneira pela qual as leveduras interferem na relação patógeno-hospedeiro, além de mecanismos de controle biológico, propõe-se investigar a ocorrência da indução de resistência pela quantificação do sinalizador produzido após o contato planta-indutor.

Considerando o exposto, esta pesquisa teve por objetivo demonstrar a ocorrência da indução de resistência na cultura do feijoeiro. Sendo mediada por *Rhodotorula glutinis* e *Sporidiobolu johnsonii* isoladas do filoplano, através da quantificação de ácido salicílico, ácido jasmônico e metil jasmonato.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Condução do ensaio de indução de ácido jasmônico, ácido salicílico e metil jasmonato

Para realizar a análise de indução de resistência, foi implantado experimento em sala com luz artificial. Para tanto, utilizou-se vasos de 0,5 L, com substrato comercial Humusfertil® para germinação de sementes de hortaliças (composto por: vermicomposto, casca de pinus, areia para substrato e vermiculita). A adubação foi realizada com base numa expectativa de produtividade de 3000 kg ha<sup>-1</sup> (aplicando 14 g de formulado 10-20-20, 50% no momento da semeadura e 50% no estágio V3). A semeadura foi realizada acondicionando-se três sementes por vaso da cultivar IAPAR Tuiuiú. Após a germinação, foi realizado raleio das plantas, mantendo uma planta por vaso.

As leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *R. glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* (AH 16-1) isoladas de flor de roseira, folha de pitangueira e folha de beijinho, respectivamente, utilizadas no experimento, pertencem à coleção de leveduras do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon. Sendo preservadas através do método de Castellani (ODDS, 1991).

As leveduras foram cultivadas em erlenmeyer de 250 mL contendo meio YEPG líquido (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glicose, 1000 mL

água), sendo foram mantidos em agitação (150 rpm) por sete dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após este período, centrifugou-se a 290g (5.000 rpm) por 5 minutos. Em seguida separou-se o sobrenadante e realizou-se a ressuspensão de células ajustado para 5 g células L<sup>-1</sup> para obtenção da suspensão de células. Bem como o sobrenadante foi filtrado em filtro PES com poro de 0,45 µm, o qual foi denominado filtrado de cultura.

O patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi obtido através de isolamento indireto de fragmentos de tecido foliar de feijoeiro infectado e mantido em meio nutriente ágar a 25 °C em BOD (MAFIA; ALFENAS; GONÇALVES, 2016) e armazenado pelo método de congelamento a -20 °C conforme descrito por Gonçalves, Alfenas e Mafia (2016). Para inoculação foi preparada suspensão bacteriana ajustada para 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, com auxílio de espectrofotômetro (marca Bel, modelo Uv-Vis 200-1000NM - Mono Feixe - Uv-M51), a 580 nm e curva de concentração bacteriana previamente elaborada, de acordo com metodologia descrita por Mafia, Alfenas e Gonçalves (2016).

### **5.2.1 Tratamento e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***

Os tratamentos utilizados para o experimento foram as células de cada isolado, bem como os seus respectivos filtrados de cultura e o controle (água destilada). Totalizaram sete tratamentos, 5 g L<sup>-1</sup> de células de *R. glutinis* (AH 14-3), 5 g L<sup>-1</sup> de células de *R. glutinis* (AH 20-1), 5 g L<sup>-1</sup> de células de *S. johnsonii*, filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 14-3), filtrado de cultura de *R. glutinis* (AH 20-1), filtrado de cultura de *S. johnsonii* e controle.

A aplicação dos tratamentos foi realizada utilizando-se borrifador manual, aplicando-se aproximadamente 1 mL por folíolo de cada trifólio, no estágio V2 (7 dias após a semeadura) e a inoculação do patógeno 24 horas após. Foram realizadas seis coletas de amostras de tecido foliar (fragmento da primeira folha unifoliada), nos tempos 0h, 3h, 6h, 24h, 27h e 30h após a aplicação dos tratamentos. Sendo os tratamentos aplicados no tempo zero após a primeira coleta e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* inoculado no tempo 24 horas, através da aspersão de suspensão de células na concentração de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> conforme já mencionado. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com duas repetições cada tratamento totalizando 84 unidades experimentais.

### 5.2.2 Extração dos marcadores bioquímicos de indução de resistência

A extração dos marcadores bioquímicos de indução de resistência foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Pan, Welti e Wang (2008). Em cada coleta foi realizada a pesagem em balança analítica de aproximadamente 0,3 g de tecido foliar. E este imediatamente acondicionado em tubos de microcentrífuga com volume de 2 mL, contendo matrix D (esfera de zircônio para macerar o tecido foliar), 0,750 mL solvente para extração composto de álcool isopropílico/H<sub>2</sub>O/HCL concentrado (2:1:0,002, vol/vol/vol) e 0,02 g de pvp (polivinilpirrolidona).

Imediatamente após a coleta, os tubos foram levados ao homogeneizador de amostras FastPrep-24™ 5G, por 40 segundos e força de 8 m s<sup>-1</sup>. Em seguida as amostras foram levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos e, então particionadas com 0,750 mL de hexano e levadas ao banho ultrassônico por mais 30 min. Realizou-se centrifugação por 5 min a 20.000g e 10 °C. Foi coletada a fração superior (hexano), e filtrada em filtro de nylon 0,45 µm e acondicionada em frasco de 2 mL para as análises em HPLC-PAD.

### 5.2.3 Análise dos marcadores bioquímicos de indução de resistência em HPLC-PAD

Foi injetado 10 µL de cada amostra em cromatógrafo líquido (Waters, Alliance e2695) com detector PAD (*Photodiode Array Detection*, Waters, 2998) e Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi definida como (A) 70% de metanol e (B) 30% de água com 0,5% de ácido fosfórico, com fluxo de 0,7 mL min<sup>-1</sup>, de acordo metodologia adaptada de Pan, Welti e Wang (2008). Os resultados foram confrontados com as curvas dos padrões ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico, e calculado o desvio padrão entre as duplicatas de cada amostra, para identificar a diferenças entre os tratamentos.

Os coeficientes de linearidade do ácido jasmônico (3,125-100 µg mL<sup>-1</sup>), metil jasmonato (0,0019 e 0,9787 µg mL<sup>-1</sup>) e ácido salicílico (0,039 e 12,50 µg mL<sup>-1</sup>) foram determinados.

A recuperação do analito foi obtida utilizando amostra de extrato vegetal, padrão interno e amostra de tecido vegetal mais padrão interno.

Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) foram determinados de acordo com as equações abaixo (BRASIL, 2003; MILLER, MILLER e MILLER, 2018).

$$LQ = \frac{10\sigma}{\beta_1} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$\beta$ : Inclinação da curva de calibração.

$\sigma$ : Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

$$LD = \frac{3,3s}{\beta_1} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

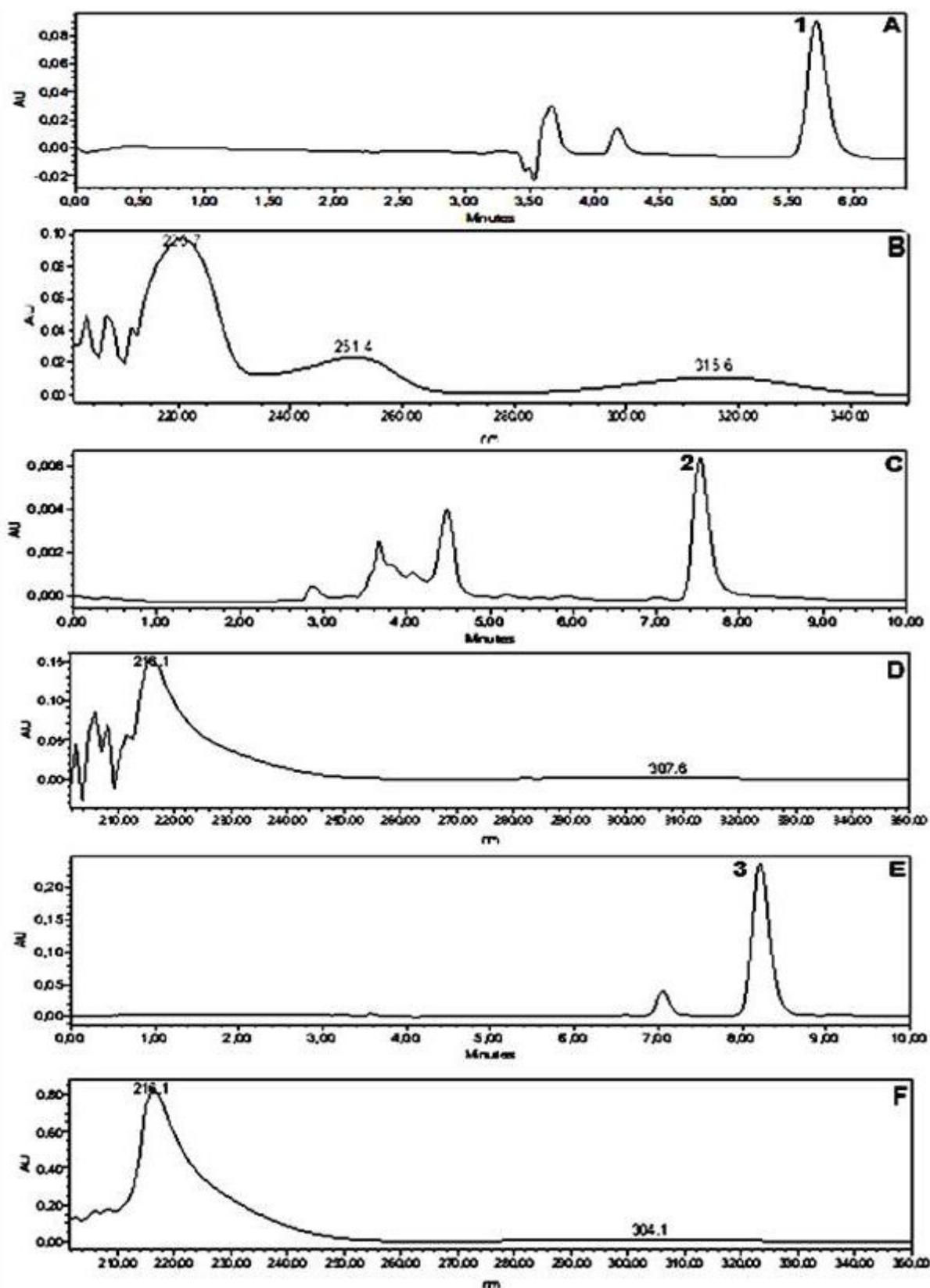
$\beta$ : Inclinação da curva de calibração.

$s$ : Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção.

Para determinar a diferença entre os tratamentos dentro de cada tempo foi utilizado o desvio padrão entre as duas médias obtidas para cada tratamento.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

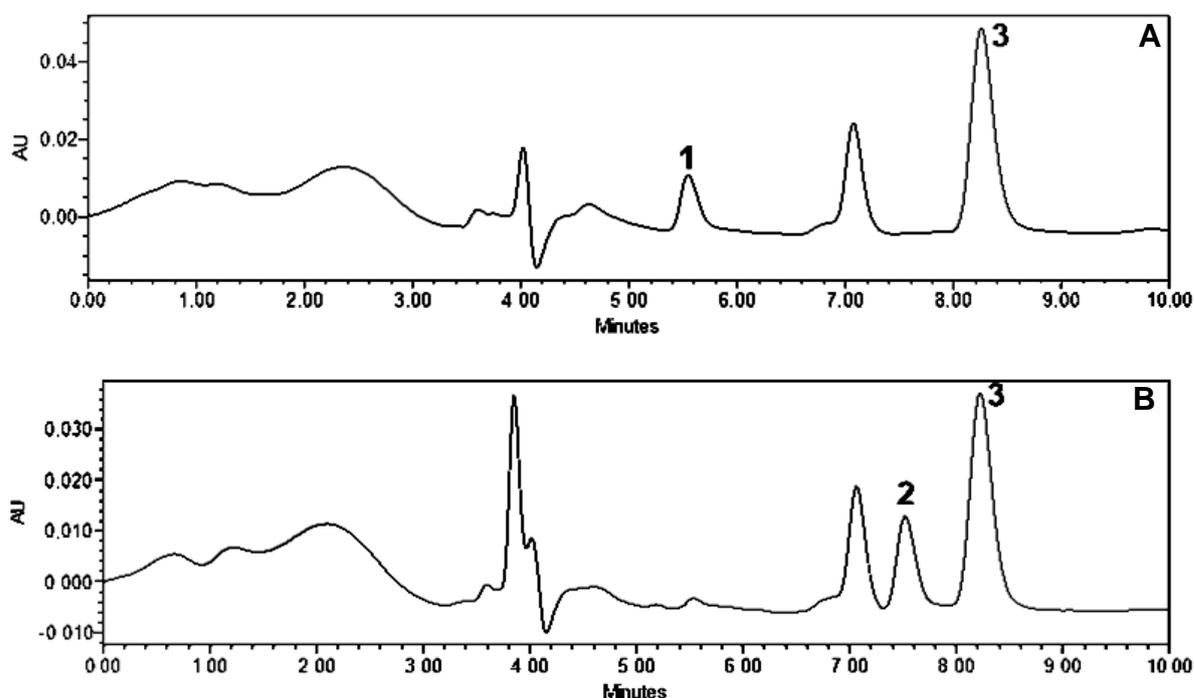
Os cromatogramas dos padrões e das amostras de folhas de feijoeiro são apresentados nas Figuras 1 e 2. A condição com melhor resolução e separação dos picos permitiu a detecção de ácido salicílico, ácido jasmônico e metil jasmonato nos tempos de retenção de 5,707; 7,524 e 8,291 min, respectivamente, com as absorções máximas típicas do espectro UV em torno de 220 nm para ácido salicílico e 216 nm para ácido jasmônico e metil jasmonato.



**Figura 1.** Cromatogramas, com os tempos de retenção dos padrões de ácido salicílico (5,707 min) (A), ácido jasmônico (7,524 min) (C) e metil jasmonato (8,291 min) (E). Espectros de absorção, com o pico máximo, dos padrões de ácido salicílico (220 nm) (B), ácido jasmônico (216 nm) (D) e metil jasmonato (216 nm) (F).

Esses comprimentos de onda foram semelhantes aos encontrados por Gerhardt (2014) para o ácido jasmônico (250 nm), Islam, Phukan e Chattopadhyay (2019) para o metil jasmonato (214 nm) e Uddin et al. (2014) para o ácido salicílico (204 nm).

A especificidade e seletividade do método para os três fitohormônios em *Phaseolus vulgaris* foi confirmada pela ausência de sinal analítico no tempo de retenção dos analitos de interesse. E, também, pela pureza dos espectros de absorção no UV ao longo do pico cromatográfico, comparando-se aos padrões (SHABIR, 2003).



**Figura 2.** Cromatogramas dos extratos de folhas de *Phaseolus vulgaris* evidenciando os picos de ácido salicílico (1), ácido jasmônico (2) e metil jasmonato (3). Figura A refere-se ao comprimento de onda 220 nm; Figura B refere-se ao comprimento de onda 216 nm.

Os parâmetros analíticos da validação do método proposto estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Os valores elevados do coeficiente de determinação ( $> 0,99$ ) indicam linearidade da resposta do detector na faixa dinâmica de trabalho, atendendo as especificações de BRASIL (2003) e Miller, Miller e Miller (2018).

Os valores de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), para ácido jasmônico foram de  $0,0047 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $0,0015 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, para metil

jasmonato foram 0,0016 e 0,0047  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente e para o ácido salicílico 0,0111 e 0,0335  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores encontram-se abaixo da menor concentração utilizada na curva de calibração, sendo 3,13; 0,0019 e 0,0039  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para ácido jasmonico, metil jasmonato e ácido salicílico, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros de validação para determinação de ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico em folhas de feijoeiro.

Analitos	Retenção (Min)	Equação de regressão	R <sup>2</sup>	Faixa linear	LD	LQ
				$\mu\text{g mL}^{-1}$		
Ácido Jasmônico	7,524	$y = 633,93 + 2804,78x$	0,9991	3,13-100,0	0,0047	0,0015
Metil jasmonato	8,291	$y = 69444,7 + 12395486,3x$	0,9939	0,0019-0,9787	0,0016	0,0047
Ácido salicílico	5,707	$y = 605,45 + 218549,37x$	0,9997	0,039-5,00	0,0111	0,0335

R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlação; LD: limites de detecção; LQ: limite de quantificação

A recuperação dos analitos foi obtida através da adição de 50,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido jasmônico, sendo recuperado 41,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (82,8%). Para o metil jasmonato foi adicionado 0,09  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e recuperado 0,072  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (80,5%), enquanto para o ácido salicílico foi adicionado 0,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e recuperado 0,77  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (85,3%) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Recuperação dos analitos, ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico pelo método proposto empregando HPLC-PDA.

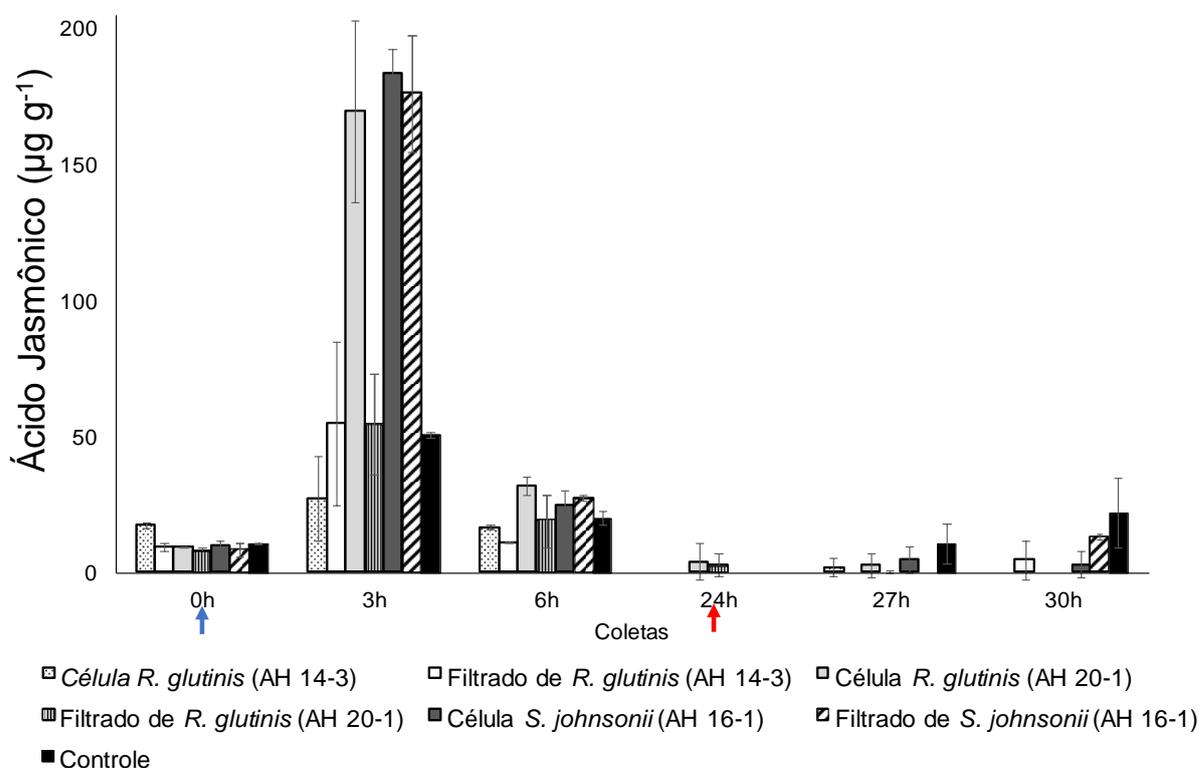
Fitohormônios	Quantidade adicionada	Quantidade recuperada	Recuperação
	$\mu\text{g mL}^{-1}$		%
Ácido jasmônico	50,00	41,40	82,80
Metil jasmonato	0,09	0,072	80,51
Ácido salicílico	0,9	0,77	85,32

Os valores de LD e LQ sugerem que o método de separação em HPLC-PDA, foi suficientemente sensível para quantificar os três fitohormônios em feijoeiro. Ou seja, para o intervalo no qual o LQ foi inferior ao ponto de mais baixa concentração na curva analítica na faixa de trabalho (BRASIL, 2003; MILLER; MILLER; MILLER, 2018).

Os resultados para a recuperação dos analitos mostram que a exatidão do método proposto para realizar análise, apresentou 82,8%, 80,5% e 85,3% para ácido jasmônico, metil jasmonato e ácido salicílico, respectivamente, isto é, a recuperação foi superior a 80% para os três analitos (Tabela 2). Segundo a literatura, os resultados

ficaram dentro da faixa indicada como adequada entre 70% e 120% (BRASIL, 2003; MILLER; MILLER; MILLER, 2018).

Os resultados da análise do fitohormônio ácido jasmônico (Figura 3), mostraram aumento de síntese três horas após a aplicação dos tratamentos. Isto é, plantas que receberam aplicação de células de *R. glutinis* (AH 20-1), células de *S. johnsonii* (AH 16-1) e filtrado da cultura de *S. johnsonii*, apresentaram incremento na concentração deste fitohormônio, com 169,45, 183,10 e 175,92  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco. Gerando aumento de sua concentração em aproximadamente 3,5 vezes (250% superior ao controle).



**Figura 3.** Síntese de ácido jasmônico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em folha de feijoeiro tratada com células e filtrado de cultura das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* ( $\uparrow$ ). Aplicação dos tratamentos no tempo 0 e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 24 horas após ( $\uparrow$ ).

Mueller et al. (1993) observaram o incremento de 0,018  $\mu\text{g g}^{-1}$  do ácido jasmônico em peso fresco de cultura de células de feijoeiro, três horas após a aplicação de células de levedura *Eschscholtzia californica*. Resultados esses que corroboram com os obtidos na presente pesquisa.

González-Gallegos et al. (2015), observaram o incremento de ácido jasmônico na cultura da batata (*Solanum tuberosum*) em função da aplicação de indutores bióticos e abióticos. Com a aplicação de Best Ultra F (*Bacillus* spp. e *Pseudomonas fluorescens*), o incremento ocorreu seis horas após o tratamento, apresentando  $55 \mu\text{g g}^{-1}$  (massa fresca). São resultados inferiores ao obtido no presente trabalho, em decorrência da utilização de outra cultura e indutor. No entanto, salienta-se a capacidade de indutores biológicos na ativação de defesa de plantas.

Segarra et al. (2006) não observaram incremento de ácido jasmônico em plantas de pepino, com a aplicação de *Trichoderma asperellum*, apresentando incremento apenas com a inoculação de *Rhizoctonia solani*. Isso indica que a sinalização ocorreu apenas com a inoculação do patógeno. Diferente do que ocorreu com os isolados de leveduras utilizados na presente pesquisa. Reforçando o potencial destes isolados para o controle biológico de doenças através da indução de resistência.

O incremento de ácido jasmônico também foi demonstrado por Pan, Welti e Wang (2008) em folhas de *Arabidopsis*, onde os autores observaram incremento de 500 vezes uma hora após o ferimento mecânico (aproximadamente  $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco). Porém, com a inoculação de *Botrytis cinerea*, o incremento ocorreu a partir de 12 horas, chegando próximo de  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco.

Quando são comparados os resultados obtidos por Pan, Welti e Wang (2008), com os resultados obtidos com a aplicação de leveduras, com o intuito de induzir resistência em plantas, observa-se a rápida sinalização da planta em resposta ao estresse. Assim, a planta ativa a produção de genes de resistência e fica preparada para um possível ataque de um patógeno.

Riet et al. (2016) observaram incremento de ácido jasmônico em folhas de *Arabidopsis* suscetíveis, inoculadas com *Alternaria brassicicola* e *Botrytis cinerea* (aproximadamente  $7,0$  e  $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco, respectivamente), somente cinco dias após a inoculação do patógeno. Isso indica que plantas suscetíveis apresentam sinalização tardia, deixando a planta vulnerável por muito tempo. Dessa forma, evidenciando a importância da rápida sinalização para evitar o estabelecimento do patógeno.

Os resultados obtidos na presente pesquisa indicam que houve indução de resistência em plantas de feijoeiro (CAMARGO, 2018), visto que as leveduras reduziram a severidade do cretamento bacteriano em estudo prévio de Heling (2016).

A presença das leveduras *R. glutinis* (AH 20-1) e *S. johnsonii* na superfície da planta ativa a biosíntese do ácido jasmônico de forma rápida (3 horas), resultando na elevação nos níveis de defesa. Por definição, o aumento na concentração deste composto, pressupõe a ocorrência de resistência sistêmica induzida (RSI) conforme esclarecem Conrath et al. (2015) e Camargo (2018).

Os jasmonatos são fitohormônios lipídicos, sintetizados via rota do octadecanoide (SOARES; MACHADO, 2007; FONSECA et al., 2009), possuem função de mensageiro. Apresentando, ainda, importante papel no processo de tradução de sinais que regulam os genes de defesa em resposta a estresses aos quais a planta está sendo submetida (LORENZO; SOLANO, 2004; CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011; GOOSSENS et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

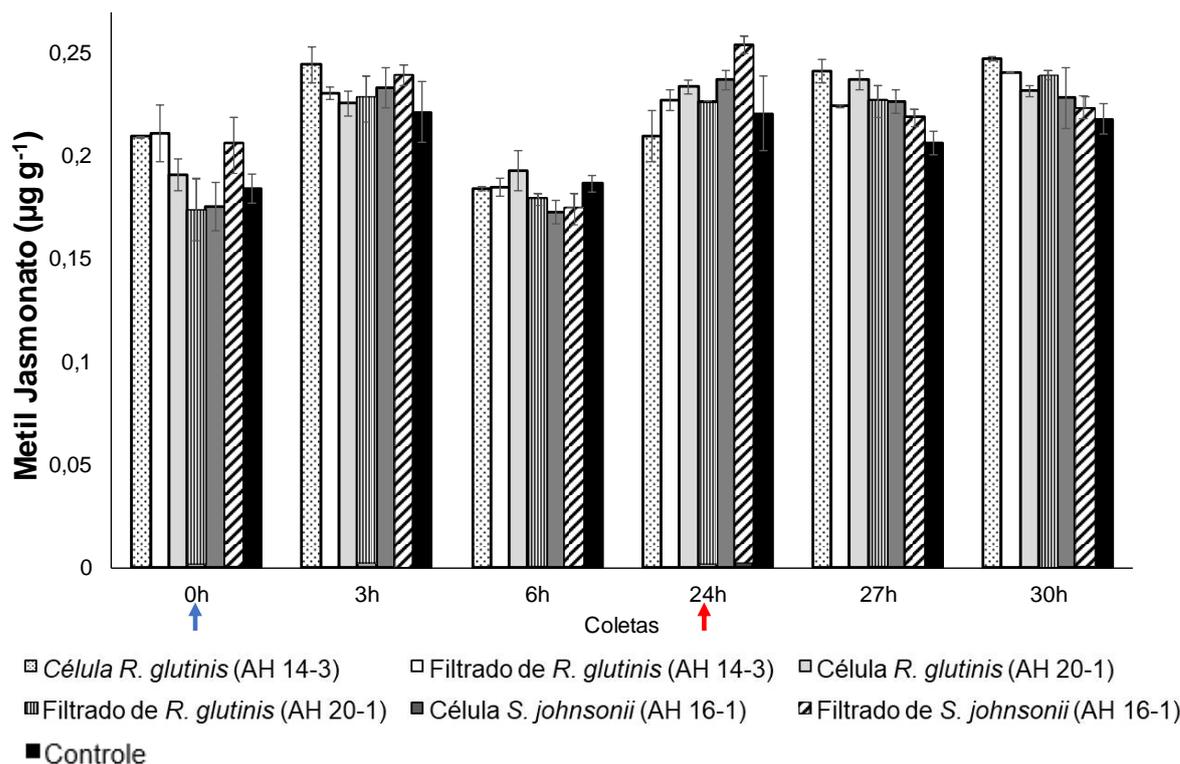
A sinalização através do ácido jasmônico possui dois caminhos, cruzando com outras vias hormonais, do etileno e do ácido abscísico, por meio de fatores de transcrição em comum (KAZAN; MANNERS, 2008; KAZAN, 2015; ZHU; LEE, 2015).

Estas vias de sinalização são necessárias para a ativação da resistência sistêmica induzida (RSI), mecanismo indireto no controle biológico de doenças em plantas contra patógenos (PIETERSE et al., 1998), culminando na ativação de genes de resposta à defesa contra patógenos.

Após a sinalização mediada por ácido jasmônico ocorre o acúmulo de compostos envolvidos na defesa de plantas, como alcaloides, flavonoides, terpenoides, compostos fenólicos, inibidores de proteinase, bem como aumento na atividade de fenilalanina amônia-liase (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995; WASTERNAK; PARTHIER, 1997).

Liu et al. (2016) observaram diversos genes de defesa ativados nas vias de sinalização do ácido jasmônico e etileno, através da aplicação da levedura *Kloeckera apiculata* e seus filtrados de cultura, contribuindo, de forma indireta, para o controle biológico em frutos de laranja.

A análise de metil jasmonato, não apresentou resultados conclusivos, pois o controle acabou se apresentando semelhante aos demais tratamentos em todos os tempos de coleta. Embora possa se observar aumento na concentração com três horas após a aplicação dos tratamentos e, assim como nos tempos de 24, 27 e 30 horas, se comparados com a primeira coleta (Figura 4).



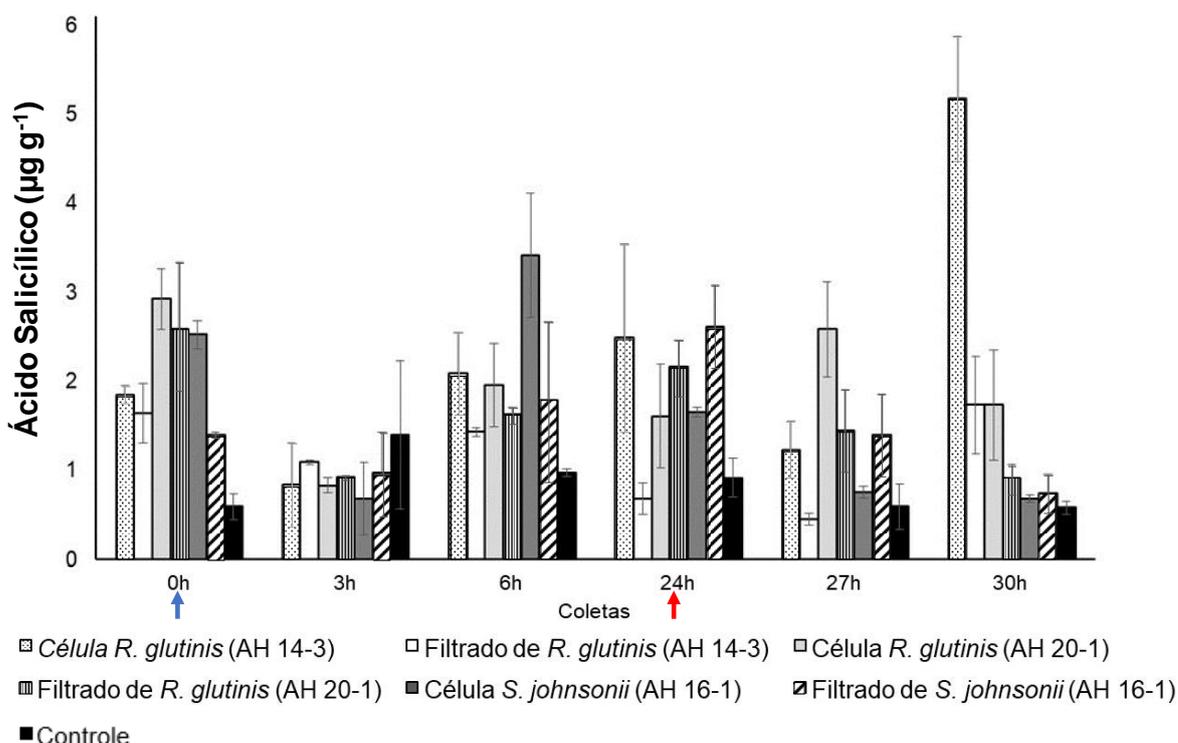
**Figura 4.** Síntese de metil jasmonato ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em folha de feijoeiro tratada com células e filtrados de cultura das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* ( $\uparrow$ ). Aplicação dos tratamentos no tempo 0 e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 24 horas após ( $\uparrow$ ).

O metil jasmonato (MeJA), é o metil éster, volátil, sua síntese é derivada do ácido jasmônico, possui basicamente a mesma função do ácido jasmônico. Está envolvido na sinalização da planta e por apresentar característica volátil também alerta plantas vizinhas, ao ser liberado pela planta estressada. O MeJA induz a síntese de compostos de defesa e desencadeia a expressão de genes relacionados à patogênese envolvida na resistência sistêmica induzida (YU et al., 2018).

No entanto, os resultados obtidos para o metil jasmonato corroboram com os resultados observados por Pan, Welti e Wang (2008). No referido estudo os autores observaram um incremento uma hora após o dano mecânico e inoculação com *B. cinerea* em folhas de *Arabidopsis*, sendo a concentração inferior, com vezes menor, que a concentração observada para o ácido jasmônico. Semelhante ao observado para ambos os jasmonatos na presente pesquisa, que seguem esse conceito.

O incremento do ácido salicílico ocorreu com 30 horas após a aplicação do tratamento com células de *R. glutinis* (AH 14-3) com a concentração de  $5,18 \mu\text{g g}^{-1}$  de

tecido fresco. Aproximadamente nove vezes superior ao controle (incremento de 793,10%), indicando que esta levedura ativou a sinalização via ácido salicílico (Figura 5).



**Figura 5.** Síntese de ácido salicílico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em folha de feijoeiro tratada com células e filtrado de cultura das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* ( $\uparrow$ ). Aplicação dos tratamentos no tempo 0 e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 24 horas após ( $\uparrow$ ).

A aplicação de microrganismos antagonistas para o controle biológico de doenças em plantas pode desencadear a indução de resistência, através do incremento de ácido salicílico. González-Gallegos et al. (2015) observaram o incremento de ácido salicílico na cultura da batata (*Solanum tuberosum*) com a aplicação de Best Ultra F (*Bacillus* spp. e *Pseudomonas fluorescens*). O incremento ocorreu três horas após o tratamento, apresentando  $114,02 \mu\text{g g}^{-1}$  (massa seca), diferente do que ocorreu no presente trabalho. No entanto, salienta-se que 30 horas após a aplicação, coincide com seis horas após a inoculação do patógeno.

Neste sentido, supõe-se que a presença da levedura no tecido foliar altera a velocidade e a magnitude da resposta com o reconhecimento do patógeno. Este fato

não ocorreu nas plantas controles, as quais receberam apenas o patógeno. Assim, configura-se a ocorrência de sinalização (*priming*), na qual a resposta efetiva da proteção só é manifestada após a chegada do patógeno em plantas induzidas.

Segarra et al. (2006) obtiveram incremento de ácido salicílico em plantas de pepino, apenas com a inoculação de *Rhizoctonia solani*. Diferente do que ocorreu com os isolados de leveduras utilizados na presente pesquisa, demonstrando o efeito *priming* de células de *R. glutinis* (AH 14-3), pois apenas no tratamento com este isolado ocorreu o incremento deste fitohormônio 30 horas após o tratamento e seis após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

Pan, Welti e Wang (2008) observaram o incremento de ácido salicílico 24 horas após a inoculação de *B. cinerea*, semelhante ao que foi observado na presente pesquisa. O incremento deste fitohormônio ocorreu apenas após a inoculação do patógeno. Observa-se o efeito *priming* apresentado pela levedura *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), pois apenas seis horas após a inoculação do patógeno ocorreu o incremento do ácido salicílico, o que não foi observado no controle.

Riet et al. (2016) observaram incremento de ácido salicílico em folhas de *Arabidopsis*, inoculadas com *Colletotrichum higginsianum*, apenas cinco dias após a inoculação do patógeno. Diferente do ocorrido na presente pesquisa quando aplicado células de *R. glutinis* (AH – 14-3), demonstrando que a planta estava em estado de alerta e prontamente ocorreu a sinalização de defesa.

Forcat et al. (2008) observaram incremento de ácido salicílico quando desafiado com bactérias fitopatogênicas, cuja concentração variou de 6,0 a 9,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco de *Arabidopsis thaliana*, semelhante ao observado na presente pesquisa que chegou a 5,18  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco.

Esse tipo de resistência se denomina de resistência sistêmica adquirida (SAR). Normalmente é ativada por microrganismos necrotróficos desencadeando a elevação no nível de ácido salicílico (CONRATH et al., 2015; CAMARGO, 2018), o que ocorreu na presente pesquisa. Sendo o incremento do ácido salicílico registrado seis horas após a inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, que é um patógeno necrotrófico.

O ácido salicílico é um fitohormônio que desempenha uma função importante para induzir resposta de defesa contra patógenos. Além de se apresentar como regulador na germinação, maturidade dos frutos, regulação no desenvolvimento de flores, diferenciação sexual e movimento estomático (RASKIN, 1992; CAO;

YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011). Este fitohormônio é sintetizado no cloroplasto após a percepção do patógeno, através da via do isochorismato (WILDERMUTH et al., 2001).

O efeito de indução de resistência foi observado através da sinalização do ácido salicílico obtido na presente pesquisa, ocorrendo apenas após a interação entre a planta e o patógeno, conhecido como *priming*. Ou seja, a planta recebeu um estímulo com um tratamento biológico e só apresentou aumento na concentração do ácido salicílico após o reconhecimento do patógeno (CRISP et al., 2016; PASCHOLATI; DALIO, 2018).

De acordo com Mauch-Mani et al. (2017), no estado *priming*, a planta fica em estado de alerta, permitindo a ativação de suas defesas mais rapidamente ou com maior efetividade quando submetida a estresse.

Um aspecto digno de nota nesse fenômeno tem sido seu amplo espectro no controle de doenças e a rápida ativação de mecanismos de defesa, somente na presença de patógenos, não afetando significativamente o crescimento e a produção das plantas (MAUCH-MANI et al., 2017; KARASOV et al., 2017).

O resultado dessa via de sinalização de defesas contra patógenos propicia o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), síntese de fitoalexinas e reação de hipersensibilidade (HR) (BARROS et al., 2010; STANGARLIN et al., 2011).

Outra resposta interessante observada na coleta com três horas, concomitantemente com o incremento na concentração de ácido jasmônico, houve redução da concentração de ácido salicílico. O inverso é evidenciado na coleta em 30 horas, momento que ocorreu expressão de ácido salicílico e não se observou mais de ácido jasmônico (Figuras 3 e 5).

Isso faz sentido, uma vez que a sinalização ocorre por apenas uma via, com o aumento da síntese de ácido salicílico, ocorre a inibição da síntese do ácido jasmônico. Por outro lado, quando a via do ácido jasmônico é estimulada aumentando sua produção, a síntese de ácido salicílico é inibida (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009; PIETERSE et al., 2012; SANCHEZ; KAY, 2016; KARAPETYAN; DONG, 2018).

#### 5.4 CONCLUSÃO

Os tratamentos com filtrado da cultura de *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1), suspensão de células e filtrado da cultura de *Sporidobolus johnsonii* foram capazes

de aumentar a síntese de ácido jasmônico três horas após a aplicação, indicando que são capazes de ativar esta via de sinalização. Os resultados para metil jasmonato não ficaram claros ou não indicaram indução, possivelmente pela característica volátil deste composto. Para o ácido salicílico, o tratamento com células de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), apresentou efeito *priming*, com incremento somente em plantas induzidas seis horas após a inoculação do patógeno.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular Plant**, v. 8, n. 4, p. 521-539, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BUXDORF, K.; RAHAT, I.; GAFNI, A.; LEVY, M. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. **Plant Physiological**, v. 161, p. 2014-2022, 2013.

BUXDORF, K.; RAHAT, I.; LEVY, M. *Pseudozyma aphidis* induces ethylene-independent resistance in plant. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 11, p. 1-5, 2013.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia volume I: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Ceres, 2018. p. 85-92.

CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. The roles of ABA in plant-pathogen interaction. **Journal of Plant Resources**, v. 124, n. 4, p. 489-499, 2011.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; LANGENBACH, C. J. G.; JASKIEWICZ, M. R. Priming for enhanced defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 97–119, 2015.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activated synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of National Academic Science USA**, v. 92, p. 407-411, 1995.

CRISP, P. A.; GANGULY, D.; EICHTEN, S. R.; BOREVITZ, J. O.; POGSON, B. J. Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advances**, v. 2, n. 2, p. 1-14, 2016.

FONSECA, S.; CHINI, A.; HAMBERG, M.; ADIE, B.; PORZEL, A.; KRAMELL, R.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C.; SOLANO, R. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 344–350, 2009.

FORCAT, S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J. W.; GRANT, M. R. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v. 4, n. 16, p. 1-8, 2008.

GAFNI, A.; CALDERON, C. E.; HARRIS, R.; BUXDORF, K.; DAFA-BERGER, A.; ZEILINGER-REICHERT, E.; LEVY, M. Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. **Front Plant Science**, v. 6, n. 132, p. 1-11, 2015.

GERHARDT, N. S. **Teores de ácido jasmônico em *Solanum lycopersicum* l. Cv. Roqueijo (tomate) cultivada em associação com três linhagens de fungos micorrízicos.** 2014, 57f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências biológicas.) Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo. Vitória, 2014.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**, Editora UFV, ed. 2, p. 92-105, 2016.

GONZÁLEZ-GALLEGOS, E.; LAREDO-ALCALÁ, E.; ASCACIO-VALDÉS, J.; RODRÍGUEZ, D. J.; HERNÁNDEZ-CASTILLO, F. D. Changes in the production of salicylic and jasmonic acid in potato plants (*Solanum tuberosum*) as response to foliar application of biotic and abiotic inductors. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1785-1791, 2015.

GOOSSENS, J.; FERNANDEZ-CALVO, P.; SCHWEIZER, F.; GOOSSENS, A. Jasmonates: Signal transduction components and their roles in environmental stress responses. **Plant Molecular Biology**, v. 91, p. 673–689, 2016.

HELING, A. L. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial de leveduras como agentes de proteção de plantas de feijoeiro ao cretamento bacteriano comum**. 2016, 51f. Dissertação (Mestrado Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 2016.

ISLAM, J.; PHUKAN, S.; CHATTOPADHYAY, P. Development of a validated RP-HPLC/DAD method for the quantitative determination of methyl jasmonate in an insect repellent semi-solid formulation. **Heliyon**, v. 5, p.1-8, 2019.

KARAPETYAN, S.; DONG, X. Redox and the circadian clock in plant immunity: a balancing act. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 119, p. 56–61, 2018.

KARASOV, T. L.; CHAE, E.; HERMAN, J. J.; BERGELSON, J. Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defence. **The Plant Cell**, v. 29, p. 666-680, 2017.

KAZAN, K. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 20, p. 219–229, 2015.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Jasmonate signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 1459–1468, 2008.

LIU, P.; CHEN, K.; LI, G.; YANG, X.; LONG, C. Comparative transcriptional profiling of orange fruit in response to the biocontrol yeast *Kloeckera apiculata* and its active compounds. **BMC Genomics**, v. 17, n. 17, p. 1-14, 2016.

LORENZO, O; SOLANO, R. Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas. In: MARTÍN, M. D. R.; RODRÍGUEZ, C. N. **Metabolismo y modo de acción de fitohormonas**. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca, 2004. p. 79-80.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Detecção, isolamento e inoculação de bactérias fitopatogênicas In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**, Editora UFV, ed. 2, p. 145-170, 2016.

MAUCH-MANI, B.; BACCELLI, I.; LUNA, E.; FLORS, V. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 485-512, 2017.

MEDEIROS, F. H. V.; DA SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia volume I: Princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2018. p. 261-274.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C.; MILLER, R. D. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6 Ed., Gosport: Ashford Colour Press Ltd., 2018. 292 p.

MUELLER, M. J.; BRODSCHELM, W.; SPANNAGL, E.; ZENK, M. H. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. **Plant Biology**, v. 90, p. 7490-7494, 1993.

ODDS, F. C. Long term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V. 29, n.6, p. 413-415, 1991.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1773–1781, 2008.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia. Volume 1: princípios e Conceitos**. 5ª ed. Editora Agronômica Ceres Ltda, 2018. p. 423-452.

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S. C. M. Modulação hormonal da imunidade vegetal . **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489 – 521, 2012.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, N.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, n. 9, p. 1571–1580, 1998.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 439–462. 1992.

RIET, K. B.; NDLOVU, N.; PIATER, L. A.; DUBERY, I. A. Simultaneous analysis of defense-related phytohormones in *Arabidopsis thaliana* responding to fungal infection. **Applications in Plant Sciences**, v. 4, n. 8, p. 1-9, 2016.

SANCHEZ, S. E.; KAY, S. A. The plant circadian clock: from a simple timekeeper to a complex developmental manager. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 12, p. 1-16, 2016.

SEGARRA, G.; JÁUREGUI, O.; CASANOVA, E.; TRILLAS, I. Simultaneous quantitative LC–ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. **Phytochemistry**, v. 67, p. 395–401, 2006.

SHABIR, G. A. J. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p.57-66, 2003.

SOARES, A. M. Dos S.; MACHADO, O. L. T.; Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

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

UDDIN, N.; KRIEG, C.; STÖGGL, W.; STECHER, G.; ABEL, G.; POPP, M.; BONN, G. K.; HUCK, C. W. Quantitative analysis of salicylic acid and its derivatives in primulae radix by high performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry (hplc-dad-esi-ms) and simultaneous determination of total polyphenol content (TPC). **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p. 271-279, 2014.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 177-206, 2009.

WASTERNACK, C.; PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 302-307, 1997.

WILDERMUTH, M. C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, p. 562-565, 2001.

YU, X.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; LANG, D.; ZHANG, X. The roles of methyl jasmonate to stress in plants. **Functional Plant Biology**, v. 46, n. 3, p. 197-212, 2018.

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

ZHANG, G.; ZHAO, F.; CHEN, L.; PAN, Y.; SUN, L.; BAO, N.; ZHANG, T.; CUI, C.X.; QIU, Z.; ZHANG, Y.; YANG, L.; XU, L. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. **Nature Plants**, v. 5, p. 491–497, 2019.

ZHU, Z.; LEE, B. Friends or foes: new insights in jasmonate and ethylene co-actions. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, p. 414–420, 2015.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Os Isolados de *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii*, bem como seus respectivos filtrados de cultura atuam pelos mecanismos de antibiose, pela produção de compostos voláteis, com promoção de crescimento através da síntese dos fitohormônios auxina (Ácido 3-indolacético e Ácido 3-indolbutírico) e giberelina (GA4). E, possivelmente, induzem a resistência na cultura do feijoeiro através das rotas do ácido jasmônico e do ácido salicílico, apresentando-se com grande potencial para o controle biológico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.