

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

**TAÍS REGINA KOHLER**

**LEVEDURAS: CONTROLE BIOLÓGICO DE ANTRACNOSE EM SOJA E  
SENSIBILIDADE À FUNGICIDAS**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ**

**2022**

**TAÍS REGINA KOHLER**

**LEVEDURAS: CONTROLE BIOLÓGICO DE ANTRACNOSE EM SOJA E  
SENSIBILIDADE À FUNGICIDAS**

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

Orientador: Odair José Kuhn

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ**

**2022**

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

Kohler, Taís Regina

Leveduras: Controle biológico de antracnose em soja e sensibilidade à fungicidas / Taís Regina Kohler; orientador Odair José Kuhn. -- Marechal Cândido Rondon, 2022.  
50 p.

Dissertação (Mestrado Profissional Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.

1. Soja - doenças e pragas. 2. Doenças em plantas - controle biológico. 3. Fungos leveduriformes. 4. Inibição de crescimento . I. Kuhn, Odair José, orient. II. 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.

**TAÍS REGINA KOHLER**

Leveduras: controle biológico de antracnose em soja e sensibilidade à fungicidas

Dissertação 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 Mestre em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle Alternativo, APROVADA pela seguinte banca examinadora:



Orientador - Odaír José Kuhn

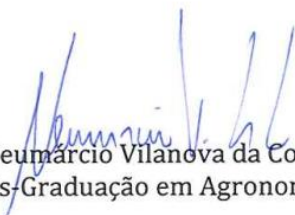
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

José Renato Stangarlin

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

Eloísa Lorenzetti

Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Neumárcio Vilanova da Costa  
Coordenador Especial do Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Marechal Cândido Rondon, 4 de março de 2022

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde, pelas graças que tem concedido a cada dia e por ter me capacitado a tornar realidade essa conquista em minha vida.

A meus pais Valério e Cleci Kohler pelo amor e apoio incondicional durante toda a minha existência. Pelo amparo e ajuda incessante quando precisei e também, por acreditarem em mim, na minha capacidade e vontade de chegar até o fim de mais uma etapa de vida.

A minha irmã Tânia Kohler pelo apoio, companheirismo e amizade.

Ao meu companheiro Arion Ramos por sempre estar do meu lado, por fazer companhia nas horas de estudo e também na elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Odair José Kuhn pela oportunidade, pela valiosa orientação e ensinamentos, pelo seu profissionalismo e pela sua amizade.

Aos demais professores pelos conselhos, técnicas e incentivos a buscar sempre o conhecimento.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação e graduação pela amizade e por sempre estarem de braços abertos para dar apoio e um ombro amigo quando fosse preciso.

A todos os amigos que fiz nos Laboratórios de Fitopatologia e Nematologia e demais laboratórios pela ajuda e suporte técnico quando necessário.

À Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal do Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa para realização deste estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta obra, não citados e ou por vezes não lembrados, nunca menos importantes.

Muito obrigada!

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica nossa ignorância”

(John F. Kennedy)

## RESUMO

KOHLER, Taís, R. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, março de 2022. **Leveduras: Controle biológico de antracnose em soja e sensibilidade à fungicidas.** Orientador: Odair José Kuhn.

Diante do uso excessivo de produtos químicos que têm levado a contaminação e relatos de ineficiência de princípios ativos, se faz necessário métodos alternativos eficazes para o manejo da antracnose (*Colletotrichum truncatum*) na cultura da soja. Portanto, objetivou-se avaliar o potencial de leveduras no controle biológico da antracnose em soja, avaliando-se a redução da severidade da doença e o efeito na atividade de proteínas relacionadas à defesa de plantas, além de avaliar a sensibilidade dos isolados quando submetidos ao contato com produtos fungicidas. Realizou-se ensaio *in vivo* em casa de vegetação avaliando-se o potencial de 35 isolados de leveduras na redução da severidade da antracnose em plantas de soja, por meio da avaliação da porcentagem de área foliar lesionada. Oito isolados eficientes na redução da doença foram selecionados para um novo ensaio, onde avaliou-se a atividade de enzimas relacionadas à defesa vegetal. Para determinação das enzimas de defesa, plantas de soja foram tratadas com os isolados de leveduras e posteriormente inoculadas com o patógeno *C. truncatum*. Por fim, realizou-se um ensaio *in vitro* para avaliar a sensibilidade de 37 isolados de leveduras à produtos fungicidas. Para isto, avaliou-se o tamanho do halo de inibição das leveduras quando em contato com cinco produtos fungicidas e duas caldas agrícolas. Constatou-se que 85% dos isolados de leveduras, sendo todos os isolados de *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp., *Zygoascus hellenicus* e *Sporidiobolus johnsonii* e 50% dos isolados de *Cryptococcus laurentii* e *Candida albicans*, reduziram a severidade da antracnose em soja. Por outro lado, verificou-se que nenhuma das leveduras selecionadas induziu aumento no teor de proteínas e não promoveram incrementos na atividade de fenilalanina amônia-liase. O isolado *R. aurantiaca* (AH 12-3) apresentou efeito *priming* incrementando a atividade de peroxidase após a inoculação do patógeno. O isolado *Z. hellenicus* (AH 06-2) induziu atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase com o tratamento, mas inibiu a atividade de peroxidase com a chegada do patógeno. Observou-se que as leveduras *Z. hellenicus*, *R. aurantiaca*, *Pichia* spp. e *Sporobolomyces roseus* se mostraram insensíveis a maior parte dos fungicidas testados, enquanto a levedura *C. laurentii* foi inibida em algum grau por todos os produtos, há exceção da calda bordalesa. Com relação aos produtos, aqueles compostos por uma mistura de estrobilurinas e carboxamidas, atuantes sobre apenas um mecanismo de ação, a inibição da respiração e os produtos multisítios se mostraram menos

tóxicos as leveduras, já os produtos contendo ingrediente ativo do grupo dos triazóis, atuantes sobre a inibição da síntese de esterol em membranas, se mostraram com maior toxicidade. Os resultados indicam que as leveduras apresentam potencial para redução da doença, mas que cada isolado pode contribuir de forma diferente na indução de resistência. As leveduras testadas apresentam insensibilidade à maior parte dos fungicidas testados, no entanto, algumas espécies apresentam significativa sensibilidade à produtos químicos contendo princípio ativo do grupo dos triazóis.

Palavras-chave: antagonistas; *Colletotrichum truncatum*; indução de resistência, insensibilidade; triazol.



## ABSTRACT

KOHLER, Taís, R. State University of Western Paraná, in March 2022. **Yeasts: Biological control of anthracnose in soybean and their sensitivity to fungicides.** Advisor: Odair José Kuhn.

In view of the excessive use of chemical products that have led to contamination and reports of inefficiency of active principles, effective alternative methods for the management of anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in soybean cultivation are necessary. Therefore, the objective was to evaluate the potential of yeasts in the biological control of anthracnose in soybean, evaluating the reduction in disease severity and the effect on the activity of proteins related to plant defense, in addition to evaluating the sensitivity of the strains when subjected to contact with fungicidal products. An in vivo test was carried out in a greenhouse to evaluate the potential of 35 yeast strain to reduce the severity of anthracnose in soybean plants, by evaluating the percentage of injured leaf area. Eight strains efficient in reducing the disease were selected for a new assay, where the activity of enzymes related to plant defense was evaluated. To determine the defense enzymes, soybean plants were treated with yeast strains and later inoculated with the pathogen *C. truncatum*. Finally, an in vitro test was carried out to evaluate the sensitivity of 37 yeast strains to fungicidal products. For this, the size of the inhibition halo of yeasts when in contact with five fungicide products and two agricultural sprays was evaluated. It was found that 85% of the yeast strains, being all *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp., *Zygoascus hellenicus* and *Sporidiobolus johnsonii* strains and 50% of the *Cryptococcus laurentii* and *Candida albicans* strains, reduced the severity of anthracnose in soybean. On the other hand, none of the selected yeasts induced an increase in protein content and did not promote increases in phenylalanine ammonia-lyase activity. The strain *R. aurantiaca* (AH 12-3) showed a priming effect increasing the peroxidase activity after inoculation of the pathogen. The strain *Z. hellenicus* (AH 06-2) induced  $\beta$ -1,3-glucanase activity with the treatment, but inhibited the peroxidase activity with the arrival of the pathogen. It was observed that the yeasts *Z. hellenicus*, *R. aurantiaca*, *Pichia* spp. and *Sporobolomyces roseus* were insensitive to most of the tested fungicides, while the yeast *C. laurentii* was inhibited to some degree by all products, with the exception of Bordeaux mixture. Regarding the products, those composed of a mixture of strobilurins and carboxamides, acting on only one mechanism of action, the inhibition of respiration and the multisite products proved to be less toxic to yeasts, while the products containing the active ingredient of the triazole group, acting

on the inhibition of sterol synthesis in membranes, showed greater toxicity. The results indicate that yeasts have the potential to reduce the disease, but that each isolate can contribute differently in the induction of resistance. The tested yeasts present insensitivity to most of the tested fungicides, however, some species present significant sensitivity to chemical products containing the active principle of the triazole group.

Keywords: antagonists; *Colletotrichum truncatum*; resistance induction; insensitivity; triazole.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ARTIGO I.....</b>	<b>6</b>
LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DA ANTRACNOSE EM SOJA .....	6
Resumo.....	6
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão .....	13
Conclusão .....	23
Referências .....	23
<b>3. ARTIGO II.....</b>	<b>28</b>
SENSIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FILOPLANO À FUNGICIDAS ..	28
Resumo.....	28
Abstract .....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão .....	33
Conclusão .....	42
Referências .....	42
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>45</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma planta originária do leste da Ásia e pertencente à família Fabaceae. Esta cultura tem grande importância no Brasil e no mundo pois apresenta características composicionais que proporcionam sua utilização para alimentação humana e animal, devido a sua rica composição em óleo vegetal e proteínas (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). Através do melhoramento genético, várias cultivares foram desenvolvidas para as mais diferentes regiões do país, fazendo com que esta oleaginosa fosse produtiva em diferentes localidades. Segundo dados do levantamento da Conab (2022), a estimativa de produção da cultura no país para a safra 2021/2022 foi de aproximadamente 140,5 milhões de toneladas.

A soja é uma planta anual, ereta, herbácea, autógama, apresentando variabilidade para suas características morfológicas. A planta de soja apresenta raiz pivotante com o desenvolvimento de raízes secundárias. Seu caule é constituído de nós e entrenós, sendo que em cada nó há uma folha e uma gema lateral que pode originar um racemo (inflorescência). Ao longo de seu desenvolvimento a soja apresenta três tipos de folhas, as cotiledonares, as unifolioladas e as trifolioladas que podem apresentar tamanho, formato e posicionamento diferentes. As flores aparecem em axilas ou racemos terminais, podendo ser brancas ou roxas. A vagem é achatada, reta a pouco curvada tendo comprimento de 2 a 7 cm, apresentando de uma a cinco sementes (NOGUEIRA et al., 2009).

Seu ciclo de desenvolvimento é dividido em duas fases, propostas por Fehr e Caviness (1977), sendo a fase vegetativa que compreende a emergência da cultura (VE) até a emissão da última folha trifoliolada (V<sub>n</sub>) antes da abertura da primeira flor, e a fase reprodutiva, que se inicia na abertura da primeira flor (R1) até a plena maturação (R8). Esta cultura é extremamente exigente quanto as condições climáticas, necessitando de temperaturas entre 20 °C a 30 °C, alta luminosidade e precipitações bem distribuídas ao longo de todo o ciclo da cultura, variando entre 450 a 800 mm/ciclo para expressão de seu máximo potencial produtivo (NEUMAIER et al., 2020).

Entretanto, diversos outros fatores podem interferir na expressão de potencial produtivo da cultura além das condições climáticas, como por exemplo, a fertilidade de solo, presença de plantas daninhas, insetos e doenças, entre outros, trazendo desafios constantes para as diversas áreas da pesquisa agrônoma. Dentre estes fatores limitantes, têm ganhado destaque as doenças, que podem afetar a cultura desde a germinação até o final do enchimento de grãos/sementes, e ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. Estes danos anuais na

produção são estimados entre 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar danos de até 100% (SEIXAS et al., 2020; HENNING et al., 2014), e inviabilizar cultivos quando não manejadas corretamente.

Uma doença de planta é o resultado de uma interação dinâmica e irreversível entre um patógeno virulento, um hospedeiro suscetível e um ambiente favorável, produzindo alterações fisiológicas e frequentemente morfológicas na planta, podendo resultar em danos, e consequentemente, perdas (ZAMBOLIN; CHAVES, 2012). A intensificação do cultivo de soja no Brasil fez com que muitos patógenos dessa cultura se desenvolvessem mais facilmente, pois na presença da cultura e de condições climáticas favoráveis, estes conseguem realizar o seu ciclo de vida, aumentando o inóculo e suas populações no campo. Além disso, os cultivos de soja têm sido implantados apenas em sucessão de cultura, alternando com a cultura do milho, uma prática que favorece a sobrevivência de patógenos saprofiticamente em restos culturais. Dessa forma, a ocorrência de doenças causadas tanto por bactérias, nematoides, fungos e/ou vírus, se tornou cada vez mais presente nos cultivos, levando a significativas reduções de produtividades.

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas da cultura da soja, cujo inóculo é proveniente de restos culturais e de sementes infectadas, podendo infectar a planta em qualquer estágio da cultura. A doença pode provocar a morte de plântulas, necrose nos pecíolos e nervuras e manchas necróticas em folhas, hastes e vagens. Lesões no caule e na vagem surgem a partir da floração, e nos estádios finais da cultura podem levar a queda total das vagens e deterioração das sementes em colheitas retardadas (GODOY et al., 2016; YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2015; GRIGOLLI, 2015; SHARMA; GUPTA; RAMTEKE, 2011).

A antracnose da soja é atualmente associada com a espécie *Colletotrichum truncatum* como a mais comum, no entanto, várias outras espécies de *Colletotrichum* têm sido relatadas como agentes causais da doença (BOUFLEUR et al., 2021; YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2015; SHARMA; GUPTA; RAMTEKE, 2011). Boufleur et al. (2021) relatam ser importante a identificação correta da espécie para melhor controle da doença, visto que as espécies do patógeno podem responder de forma diferente as diferentes estratégias de controle. Porém, a diferenciação entre as espécies é complexa e demanda de equipamentos sofisticados (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2015), sendo ainda muito restrita.

Dentre as formas de manejo e controle da antracnose na soja podem-se citar o uso de sementes saudáveis, tratamento de sementes, rotação de culturas, aumento do espaçamento entre fileiras de 50 a 55 cm (maior arejamento das plantas), população adequada de plantas e manejo

adequado da fertilidade (principalmente para a adubação potássica) (GODOY et al., 2016) e controle químico pelo uso de fungicidas (GRIGOLLI, 2015).

O controle químico de doenças na soja, de modo geral, é o mais utilizado, em virtude de ser relativamente barato, rápido e eficaz. São empregadas costumeiramente misturas comerciais registradas para o controle da antracnose pertencentes aos grupos químicos benzimidazol, triazol, estrobilurina e carboxamida (BRASIL, 2022).

No entanto, nos últimos anos, vários estudos mostraram que a eficiência dos fungicidas está diminuindo gradualmente contra a antracnose da soja. Dias; Pinheiro e Café-Filho (2016) ao avaliarem duas safras de soja, constataram que o controle químico com o uso de triazóis combinados com estrobilurinas foi eficiente durante a primeira safra, mas não durante a segunda safra sob infecções de *Colletotrichum* spp.. A resistência de isolados de *C. truncatum* a múltiplos triazóis (flutriafol, fenbuconazol, tebuconazol, metconazol e miclobutanil) e sensibilidade reduzida ao difenoconazol e propiconazol já foram relatados (CHEN et al., 2018; ZHANG et al., 2017; CHEN et al. 2016). Outros princípios ativos, como carbendazim, também já se têm relatado a baixa eficiência de controle (GRIGOLLI, 2015).

Além da ineficiência do controle obtida por alguns dos fungicidas que estão apresentando insensibilidade ao patógeno, os produtos agrotóxicos podem levar a sérios danos ambientais. Alengebawy et al. (2021) destacam que os resíduos de agrotóxicos causam danos diretos e indiretos à fauna, flora, propriedades físico-químicas e biológicas do solo agrícola, e ainda, podem diminuir a atividade enzimática e inibir as comunidades microbianas do solo. Portanto, se faz necessário a busca por formas alternativas e/ou que sejam aliadas aos demais tipos de controle, para que sejam amenizados os problemas oriundos do uso exacerbado ou discrepante das recomendações dos produtos químicos. Sharma; Gupta e Ramteke (2011) já relatavam a necessidade de buscar agentes de biocontrole, incluindo antagonistas fúngicos, dentre outras estratégias, para garantir a contenção efetiva da doença, na ausência de cultivares altamente resistentes e de produtos químicos eficazes.

O controle biológico de doenças visa a redução do inóculo ou das atividades determinantes de uma doença provocada por um patógeno, por meio da aplicação de um agente de biocontrole, nas plantas ou no solo, e através de relações antagônicas, estes agentes agem impedindo a infecção e o estabelecimento de patógenos (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). O controle propriamente dito, pode resultar de interações diretas ou indiretas entre os microrganismos benéficos e os fitopatógenos, cujos mecanismos de ação podem ser influenciados pelas condições ambientais e pela presença de outros microrganismos (MELLO et al., 2020).

Os agentes de biocontrole podem atuar por um ou mais mecanismos de ação, como antibiose, indução de resistência, competição, parasitismo, predação e promoção do crescimento (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). Dentre os agentes biológicos para controle de doenças em plantas, citam-se os fungos filamentosos, como *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea*; as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus velezensis*; e por fim as leveduras, grupo do qual não há produtos registrados disponíveis no Brasil (BRASIL, 2022).

As leveduras são organismos eucarióticos, fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais, ascomicetos ou basidiomicetos, que podem se reproduzir por brotamento ou por fissão e podem apresentar hifas ou pseudo-hifas. Por serem amplamente difundidas na natureza e possuírem crescimento anaeróbico facultativo, podem sobreviver em vários ambientes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; DIAS; SCHWAN, 2010). Esse grupo de fungos desempenha importantes funções em muitos ecossistemas, contribuindo significativamente para a biodiversidade.

As leveduras estão presentes naturalmente na superfície dos órgãos vegetais e dos solos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). Algumas características tornam-nas promissoras para utilização como agentes de controle biológico, tais como não produzir esporos alergênicos, não sintetizar antibióticos como as bactérias, não ser exigente em nutrientes e não apresentar riscos ao consumidor (RAMOS et al., 2010). O biocontrole com leveduras constitui método alternativo relevante, isto porque as leveduras são facilmente encontradas, conseguem se reproduzir de forma rápida e ocupar competitivamente locais de infecção fúngica nas plantas (OLIVEIRA et al., 2011). As leveduras são ativas consumidoras de nutrientes, efetivas como colonizadores de fermentos e, em alguns casos, atuam como indutoras de resistência do hospedeiro (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

De acordo com Pascholati e Dalio (2018), a resistência do hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. Quando um patógeno inicia o processo de infecção na planta, a mesma ativa mecanismos de transdução de sinais, que resultam no desencadeamento de respostas celulares estruturais ou bioquímicas, culminando no processo de defesa da planta. Estudos têm mostrado que é possível realizar a indução de resistência em plantas, por meio da ativação de algum mecanismo de defesa latente em resposta a aplicação de algum agente biótico ou abiótico, os chamados indutores (PASCHOLATI; TOFFANO, 2007). Na literatura são encontrados diferentes indutores de resistência, como biofertilizantes, extratos vegetais e óleos

essenciais, bactérias e fungos, polissacarídeos e soluções ultradiluídas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2014).

Cabe destacar a atuação das leveduras como possíveis indutoras de resistência, variando conforme o patossistema. Freimoser et al. (2019) em sua revisão, relatam o uso de leveduras como indutoras de resistência para uma ampla gama de patógenos, além da atuação sobre outros mecanismos do controle biológico. Os diferentes mecanismos de atuação das leveduras no controle biológico de doenças, incluindo a indução de resistência, também são descritos por Zhang et al. (2020) e Hernandez-Montiel et al. (2021), destacando o potencial desse grupo de microrganismos como agentes de biocontrole.

Visando sanar os problemas fitossanitários das plantações e oferecer melhores condições de cultivo, o controle biológico se incorpora ao campo e à pesquisa se tornando uma alternativa sustentável quando comparado à utilização dos agroquímicos. Portanto, objetivou-se avaliar o potencial de leveduras no controle biológico da antracnose em soja, avaliando-se a redução da severidade da doença e o efeito indutor promovido pelas mesmas, além de avaliar a sensibilidade dos isolados quando submetidos ao contato com produtos químicos, para identificar potenciais isolados de leveduras para uso em cultivos como alternativa e/ou aliado ao controle químico para o manejo da doença.



## 2. ARTIGO I

### LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DA ANTRACNOSE EM SOJA

### YEAST AS AGENTS FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF ANTHRACNOSIS IN SOYBEAN

#### Resumo

O controle químico da antracnose (*Colletotrichum truncatum*) em soja, método mais utilizado nos sistemas agrícolas extensivos, tem apresentado ineficiência de alguns princípios ativos, demandando métodos alternativos eficientes para o manejo de doenças. Objetivou-se avaliar o efeito de leveduras na redução da severidade da antracnose e na atividade de enzimas relacionadas a defesa em plantas de soja. Diante disso, 35 isolados de leveduras obtidos do filoplano foram testados quanto a eficiência no controle biológico da antracnose em soja, avaliando-se a redução da severidade da doença. Após isso, oito isolados eficientes na redução da doença foram avaliados quanto às enzimas relacionadas a defesa de plantas quando tratadas com leveduras e inoculadas com *C. truncatum*. Constatou-se que 85% dos isolados de leveduras reduziram a severidade da antracnose em soja em condições de casa de vegetação. Todos os isolados de *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp., *Zygoascus hellenicus* e *Sporidiobolus johnsonii* e 50% dos isolados de *Cryptococcus laurentii* e *Candida albicans* se mostraram eficientes na redução da doença. Por outro lado, verificou-se que nenhuma das leveduras selecionadas interferiu no teor de proteínas e não promoveu incrementos na atividade de fenilalanina amônia-liase. O isolado *Rhodotorula aurantiaca* (AH 12-3) apresentou efeito *priming* incrementando a atividade de peroxidase após a inoculação do patógeno. O isolado *Z. hellenicus* (AH 06-2) induziu atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase com o tratamento, mas inibiu a atividade de peroxidase após a inoculação do patógeno. Os resultados indicam que as leveduras apresentam potencial para redução da doença, mas cada isolado pode contribuir de forma diferente na indução de enzimas relacionadas a defesa.

**Palavras-chave:** antagonista; *Colletotrichum truncatum*; indução de resistência; peroxidase; polifenoxidase.

#### Abstract

The chemical control of anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in soybean, the most used method in extensive agricultural systems, has shown inefficiency of some active principles, demanding efficient alternative methods for disease management. The objective of this study was to evaluate the effect of yeasts on the reduction of anthracnose severity and on the activity of enzymes related to defense in soybean plants. Therefore, 35 yeast strains obtained from the phylloplane were tested for efficiency in the biological control of anthracnose in soybean, evaluating the reduction of disease severity. After that, eight strains efficient in reducing the disease were evaluated for enzymes related to plant defense when treated with yeasts and inoculated with *C. truncatum*. It was found that 85% of the yeast strains reduced the severity of anthracnose in soybean under greenhouse conditions. All *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp., *Zygoascus hellenicus* and *Sporidiobolus johnsonii* strains and 50% of the *Cryptococcus laurentii* and *Candida albicans* strains were efficient in reducing the disease. On the other hand, none of the selected yeasts interfered with the protein content and did not promote increases in the phenylalanine ammonia-lyase activity. The strain *Rhodotorula aurantiaca* (AH 12-3) showed a priming effect increasing the peroxidase activity after inoculation of the pathogen. The strain *Z. hellenicus* (AH 06-2) induced  $\beta$ -1,3-glucanase activity with treatment, but inhibited peroxidase activity after inoculation of the pathogen. The results indicate that yeasts have the potential to reduce the disease, but each strain may contribute differently in the induction of defense-related enzymes.

**Key words:** antagonist; *Colletotrichum truncatum*; peroxidase; polyphenol oxidase; resistance induction.

## Introdução

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) tem grande importância no Brasil e no mundo, pois além de ser cultivada em vários estados do país, apresenta características composicionais que proporcionam sua utilização para alimentação humana e animal, devido a sua rica composição em óleo vegetal e proteínas (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). Frente à importância da cultura para o país e a demanda crescente por maiores produções, têm-se a expansão da soja para novas áreas com uso da monocultura, o que leva à introdução de novos patógenos, surgindo problemas fitossanitários de elevada importância, que podem ocasionar danos de até 100% (GODOY et al., 2016). Dentre estas doenças está a antracnose.

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas da soja, cujo inóculo é proveniente de restos culturais e de sementes infectadas, podendo infectar a planta em qualquer estágio da cultura. A doença pode provocar a morte de plântulas, necrose nos pecíolos e nervuras e

manchas necróticas em folhas, hastes e vagens. Lesões no caule e na vagem surgem a partir da floração, e nos estádios finais da cultura podem levar a queda total das vagens e deterioração das sementes em colheitas retardadas (GODOY et al., 2016; GRIGOLLI, 2015). As plantas infectadas pela doença têm a produção comprometida pela redução no número de vagens formadas e a presença de grãos menores e/ou malformados.

Manter a sanidade das plantas é de suma importância para reduzir os possíveis danos de produção e os prejuízos econômicos encontrados pelos agricultores. A antracnose pode ser controlada a partir do uso de sementes saudáveis, tratamento de sementes, rotação de culturas, aumento do espaçamento entre fileiras de 50 a 55 cm (maior arejamento das plantas), população adequada de plantas, manejo adequado da fertilidade (principalmente para a adubação potássica) (GODOY et al., 2016) e controle químico pelo uso de fungicidas (GRIGOLLI, 2015).

Considerando que o controle químico, método mais usualmente utilizado, tem se mostrado insuficiente para o controle da antracnose, onde para cada 1% no aumento de vagens doentes, estima-se que 90 kg ha<sup>-1</sup> da produção da soja sejam perdidos (DIAS; PINHEIRO; CAFÉ FILHO, 2016), e que para alguns princípios ativos, já tem sido relatado a baixa eficiência de controle (CHEN et al., 2016; GRIGOLLI, 2015), é necessário a busca por medidas de controle alternativas que possam ser substituídas e/ou aliadas ao controle químico, como é o caso do controle biológico.

O controle biológico visa a redução do inóculo ou das atividades determinantes de uma doença provocada por um patógeno, por meio da aplicação de um agente de biocontrole, sobre as plantas ou no solo, e através de relações antagônicas, estes agentes agem impedindo a infecção e o estabelecimento de patógenos (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). O controle propriamente dito pode resultar de interações diretas ou indiretas entre os microrganismos benéficos e os fitopatógenos, cujos mecanismos de ação podem ser influenciados pelas condições ambientais e pela presença de outros microrganismos (MELLO et al., 2020). Os agentes de biocontrole podem atuar por um ou mais mecanismos de ação como antibiose, indução de resistência, competição, parasitismo, predação e promoção do crescimento (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). Dentre esses microrganismos, diversas espécies de fungos filamentosos, bactérias e leveduras têm sido relatados como antagonistas pela literatura científica.

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais, que podem se reproduzir por brotamento ou por fissão. Por serem amplamente difundidas na natureza e possuírem crescimento anaeróbico facultativo, podem sobreviver em vários ambientes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Esses microrganismos são habitantes naturais

das plantas e do solo, e nesses ambientes são ativas consumidoras de nutrientes, efetivas como colonizadores de fermentos e, em alguns casos, atuando como indutoras de resistência do hospedeiro (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000), mostrando-se um importante grupo de microrganismos promissores para o uso em cultivos agrícolas no manejo e controle de doenças.

Leveduras antagonistas (também conhecidas como leveduras de biocontrole) referem-se a fungos com crescimento leveduriforme que podem inibir ou interferir no crescimento, desenvolvimento, reprodução ou atividade de fitopatógenos. Múltiplos mecanismos de ação das leveduras já foram observados como a competição por nutrientes e espaço, secreção de enzimas, produção de toxinas, liberação de compostos orgânicos voláteis, micoparasitismo e indução de resistência em plantas (FREIMOSER, 2019; ZHANG et al., 2020; HERNANDEZ-MONTIEL et al., 2021). O tratamento com leveduras antagônicas pode melhorar a sinalização na planta, induzindo maior expressão de genes relacionados à defesa (BUXDORF et al., 2013; CARVALHO, 2020) e conseqüentemente, aumentar as atividades de enzimas relacionadas à defesa.

Portanto, objetivou-se com este trabalho, avaliar o efeito de diferentes isolados de leveduras na redução da severidade da antracnose e avaliar a atividade de enzimas relacionadas a defesa em plantas de soja quando tratadas com leveduras e inoculadas com *Colletotrichum truncatum*.

## **Material e Métodos**

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação climatizada pertencente a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Marechal Cândido Rondon/PR. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo 36 tratamentos (35 isolados de leveduras e um controle) e seis repetições. Cada repetição era composta por um vaso contendo duas plantas de soja.

Utilizou-se 35 isolados de leveduras da coleção de leveduras do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, das seguintes espécies: *Candida albicans*, *Cryptococcus laurentii*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pini*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporidiobolus johnsonii* e *Zygoascus hellenicus*, preservadas sob óleo mineral estéril e mantidos em geladeira (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016). As leveduras foram retiradas do preservado e cultivadas em placas de Petri contendo meio ágar-YEPG (20 g glicose, 10 g peptona, 5 g extrato de levedura e 20 g ágar diluídos em 1000 mL de água destilada) para serem utilizadas no ensaio. A partir de placas de Petri com as leveduras cultivadas com sete dias de idade, realizou-se o preparo das suspensões leveduriformes,

diluindo-se alçadas das colônias em tubos Falcon contendo solução salina (NaCl 0,85%), cujo tubo foi levemente agitado para completa homogeneização das suspensões. Posteriormente, preparou-se as suspensões de cada uma das leveduras correspondendo a  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, calibrando-as com auxílio de Câmara de Neubauer.

Um isolado de *C. truncatum* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (39 g de meio formulado ágar batata dextrose diluído em 1000 mL de água destilada). A partir de placas de Petri cultivadas com 10 dias de idade, realizou-se o preparo da suspensão do patógeno, por meio da raspagem superficial do meio cultivado com auxílio de alça de Drigalski e água destilada estéril, em seguida o conteúdo foi filtrado, recolhido em béquer e homogeneizado. Posteriormente, a suspensão dos esporos foi calibrada em Câmara de Neubauer a  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>.

Sementes de soja da cultivar BMX 59160 RSF IPRO foram semeadas em vasos de polipropileno, cilíndrico, com capacidade para 2 L, contendo como substrato a mistura de solo, areia e matéria orgânica, na proporção de 3:1:1, autoclavado por 1 hora a 120 °C a 1 atm. Após a germinação das sementes, manteve-se apenas duas plantas por vaso.

As plantas receberam a pulverização foliar dos tratamentos quando se encontravam no estágio fenológico V3, sendo realizada a aplicação apenas no primeiro trifólio das plantas de soja, aplicando-se aproximadamente 1 mL por repetição (duas plantas), tomando-se o devido cuidado para não chegar ao nível de escorrimento, e foram mantidas nas condições da casa de vegetação. Decorridas 72 horas da aplicação dos tratamentos, realizou-se a inoculação do patógeno, cuja suspensão de esporos foi ajustada a  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>, sendo realizada a aplicação nos dois primeiros trifólios, aplicando-se aproximadamente 2 mL por repetição (duas plantas) e após, as plantas de soja permaneceram em câmara úmida por 12 horas a aproximadamente 25 °C, em seguida, mantidas em casa de vegetação.

Decorridos sete dias da inoculação do patógeno, iniciou-se a avaliação da severidade de doença, avaliando-se a porcentagem de área lesionada nos dois primeiros trifólios (trifólio com tratamento e inoculado, e o trifólio apenas inoculado) com base na escala diagramática de Dalla Pria et al. (1999). Os dois primeiros trifólios das duas plantas de soja em cada repetição foram avaliados a cada sete dias, durante 14 dias após a inoculação. Ao final das avaliações elaborou-se a curva de progresso da doença e calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), com apoio da equação adaptada de Shaner e Finney (1977).

Em um segundo ensaio, oito isolados de leveduras, eficientes na redução da severidade da antracnose em soja obtidos no ensaio anterior, foram novamente testados para avaliar o efeito indutor na expressão de proteínas relacionadas a defesa. Sendo assim, utilizou-se delineamento

experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial, contendo 10 tratamentos (oito leveduras, um controle inoculado e um controle sem inoculação do patógeno), três épocas de coleta de amostras (imediatamente antes dos tratamentos, imediatamente antes da inoculação do patógeno e três dias após a inoculação do patógeno) e quatro repetições. Os isolados de leveduras e o patógeno foram cultivados e as suspensões preparadas da mesma forma já mencionada para o ensaio anterior.

O ensaio foi realizado utilizando bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial estéril. Nas bandejas semeou-se sementes da cultivar BMX 59160 RSF IPRO a aproximadamente 2,5 cm de profundidade e 7 cm equidistantes entre si. Quando as plantas de soja apresentavam o primeiro trifólio completamente expandido (estágio fenológico V2), realizou-se a aplicação dos tratamentos sobre o primeiro trifólio expandido utilizando borrifadores contendo as suspensões das leveduras. Decorridas 72 h da aplicação dos tratamentos, realizou-se a inoculação do patógeno *C. truncatum*, pela aplicação sobre o primeiro trifólio expandido utilizando borrifador manual.

As coletas das amostras foram realizadas em três épocas diferentes: antes da aplicação dos tratamentos (zero h), 72 h após a aplicação dos tratamentos e antes da inoculação do patógeno e 72 h após a inoculação do patógeno (144 h). Coletou-se apenas o trifólio expandido das plantas, retirando-se a nervura central, sendo imediatamente pesados, embrulhados em papel alumínio e acondicionados em caixas de poliestireno expandido contendo gelo. Finalizada cada coleta, as amostras foram congeladas a -20 °C.

As amostras foram trituradas com 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 0,02 g de polivinilpirrolidona (PVP) em almofariz de porcelana previamente refrigerado. O homogeneizado foi centrifugado a 25.000g durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi armazenado em micro tubos com capacidade para 2 mL, sendo congelados a -20 °C para posterior análises bioquímicas.

Para determinação do conteúdo total de proteínas solúveis nas amostras utilizou-se o método de Bradford (1976), consistindo de 50 µL da amostra (sobrenadante), 750 µL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL de reagente de Bradford (125 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 62,5 mL álcool etílico 95%, 125 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 250 mL de água destilada). Após a adição da amostra proteica em tubos de borosilicato de vidro, o reagente foi adicionado sob agitação com auxílio de agitador de tubos vórtex, e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 min, sendo em seguida, realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro (TU – 1880 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer) a 595 nm. Cada amostra foi submetida a análise em triplicata. A

concentração de proteínas solúveis foi expressa em termos de equivalentes de  $\mu\text{g}$  de albumina de soro bovino (ASB) por mL de amostra ( $\mu\text{g}$  proteína  $\text{mL}^{-1}$ ), utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB ( $0,0259x + 0,0036$ ;  $R^2 = 0,9955$ ), variando de 0 a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para a atividade de peroxidase utilizou-se o método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT; NUCLES; KUC, 1982), cuja solução para a reação constituía-se de 950  $\mu\text{L}$  do substrato para enzima (306  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio, 12,5 mL de guaiacol 2 % e 87,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0)) e 50  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante). A reação foi determinada a 30 °C, sendo conduzida em espectrofotômetro a 470 nm pelo período de 90 segundos, anotando-se o valor de absorbância a cada 15 segundos. Posteriormente, calculou-se a média da variação da atividade de peroxidase em 15 segundos e em seguida extrapolando-se para um minuto. A atividade da enzima foi expressa em absorbância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Para determinação da atividade da polifenoloxidase utilizou-se a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). A solução para a reação constituía-se de 900  $\mu\text{L}$  do substrato (110,1 mg de catecol diluído em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,8), formando uma solução de catecol de 0,02 M) e 100  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante). A reação foi determinada a 30 °C, sendo conduzida em espectrofotômetro a 420 nm pelo período de 90 segundos, anotando-se o valor de absorbância a cada 15 segundos. Posteriormente, calculou-se a média da variação da atividade de polifenoloxidase em 15 segundos e em seguida extrapolando-se para um minuto. A atividade da enzima foi expressa em absorbância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Para a atividade da fenilalanina amônia-liase utilizou-se a metodologia descrita por Umesha (2006), sendo determinada através da quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina. A solução para reação constituiu-se de 100  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante), 400  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500  $\mu\text{L}$  da solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Para cada amostra também foi preparado um controle o qual continha 100  $\mu\text{L}$  da amostra e 900  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) sem fenilalanina. A reação foi incubada a 40 °C por 2 h, sendo em seguida, adicionados 60  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico (HCl) 5 M para cessar a reação. Após, realizou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 290 nm. A concentração de ácido *trans*-cinâmico foi expressa em termos de equivalentes de  $\mu\text{g}$  ácido *trans*-cinâmico por mL de amostra ( $\mu\text{g}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{mL}^{-1}$ ), utilizando-se curva padrão de concentrações de ácido *trans*-cinâmico ( $0,0135x - 0,0255$ ;  $R^2 = 0,9997$ ), variando de 0 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A atividade de fenilalanina amônia-liase foi calculada através da diferença entre as amostras

incubadas com e sem o substrato L-fenilalanina 0,05 M, sendo expressa em  $\mu\text{g}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{hora}^{-1} \text{mg}$  proteína $^{-1}$ .

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase utilizou-se o método indireto por meio da determinação de açúcares redutores, utilizando-se como substrato a laminarina. A solução para a reação constituiu-se de 150  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante) e 150  $\mu\text{L}$  da solução de laminarina (2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Para cada amostra também foi preparado um controle o qual continha apenas 150  $\mu\text{L}$  da amostra sem a presença de laminarina. Os tubos de borosilicato de vidro foram incubados a 40 °C por 1 h. Posteriormente, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  da solução de laminarina na amostra controle. Em seguida, para a determinação dos açúcares redutores foi utilizada a metodologia descrita por Lever (1972). Para a reação separou-se alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  de cada amostra, bem como de seu tubo controle e adicionando-se 1,5 mL da solução de PAHBAH (0,5 g hidrazida do ácido *p*-hidróxibenzóico diluído em 20 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M e adicionando-se 80 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M), permanecendo incubado em banho-maria a 100 °C por 10 min. Após o resfriamento acelerado utilizando gelo até atingir a temperatura ambiente ( $\cong$  25 °C), realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 410 nm. A concentração de açúcares redutores foi expressa em termos de equivalentes de  $\mu\text{g}$  glicose por mL de amostra ( $\mu\text{g}$  glicose  $\text{mL}^{-1}$ ), utilizando-se curva padrão de concentrações de glicose (0,0018x-0,0017;  $R^2=0,9994$ ), variando de 0 a 200  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$ . Posteriormente, a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi calculada a partir da diferença entre os açúcares reduzidos nas amostras antes e após a incubação, sendo expressa em  $\mu\text{g}$  glicose  $\text{min}^{-1} \text{mg}$  proteína $^{-1}$ .

Os dados de severidade da doença foram submetidos a análise de variância (ANAVA) pelo teste F e comparação de médias pelo teste Scott-Knott, com níveis de 5% de significância, realizadas com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dados referentes ao segundo ensaio foram submetidos a análise de variância (ANAVA) pelo teste F e comparação de médias com os controles pelo teste Dunnett, com níveis de 5% de significância, realizadas com auxílio do software GENES (CRUZ, 2013).

## **Resultados e Discussão**

O uso de diferentes isolados de leveduras proporcionou efeito significativo ( $p<0,05$ ) sobre a redução da severidade da antracnose em plantas de soja (Tabela 1). A maior parte dos isolados de leveduras (85%) mostraram-se eficientes em reduzir a severidade da doença em condições de casa de vegetação, indicando que as leveduras apresentam bom potencial e podem ser alternativas sustentáveis para o manejo da doença.



Todos os isolados de *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp., *Zygoascus hellenicus* e *Sporidiobolus johnsonii* se mostraram eficientes na redução da antracnose em plantas de soja, indicando possíveis espécies potenciais para o manejo de doenças. Além disso, 50% dos isolados de *Cryptococcus laurentii* e *Candida albicans* reduziram a severidade da doença, indicando que há alguma redução da doença por parte destas espécies, mas que as mesmas podem apresentar isolados ineficazes (Tabela 1).

Os isolados *C. laurentii* (AH 07-1), *C. laurentii* (AH 02-1), *C. laurentii* (AH 03-1), *C. albicans* (AH 11-3) e *C. albicans* (AH 09-1) não diferiram do controle, indicando que possivelmente estes isolados possuem alguma modificação gênica por deleção e/ou alteração de algum mecanismo atuante sobre o patógeno, que pode ser observado nos isolados da mesma espécie que reduziram a severidade da doença.

Calixto (2020) observou-se que os isolados *R. glutinis* (AH 18-1), *S. johnsonii* (AH 19-2) e *Z. hellenicus* (AH 14-1) reduziram a incidência de antracnose, respectivamente em 61,7%, 58,7% e 41,3% na metade inferior e 49,0%, 43,9% e 33,9% na metade superior das plantas de soja, ao conduzir o ensaio em condições de campo. Os isolados *S. johnsonii* (AH 19-2) e *Z. hellenicus* (AH 14-1) apresentaram reduções de 52,3% e 43,5% na severidade da antracnose em soja no presente ensaio, corroborando com os resultados encontrados pelo autor (Tabela 1).

França et al. (2015), ao estudarem isolados de leveduras contra o *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em pimentões em pós-colheita, observaram que os melhores resultados para porcentagem de inibição do crescimento (PIC) micelial e diâmetro das lesões em frutos de pimentão foram obtidos ao utilizar isolados de *Rhodotorula glutinis*, com PIC de 47%. No presente estudo, os isolados de *R. glutinis* apresentaram reduções de severidade da antracnose de 39% a 80% em relação ao tratamento controle. Estes resultados que indicam que a espécie *R. glutinis* pode ser eficiente e promissora no manejo de *Colletotrichum* sp., agente causador da antracnose, em diferentes culturas.

Hilber-Bodmer et al. (2017) discutem que como o ambiente da filosfera é considerado hostil, sujeito a flutuações muito rápidas de temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes, pH e radiação, os microrganismos habitantes competem interespecificamente para permanecer no ambiente, o que favorece a evolução das atividades antagônicas para afastar os microrganismos concorrentes. Assim, pode-se supor que as leveduras do ensaio, que foram isoladas de diferentes filoplanos (HELING, 2016), podem apresentar alguma evolução antagônica que as tornaram resistentes e altamente competidoras ao patógeno *C. truncatum*.

Tabela 1. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e porcentagem de redução da severidade da antracnose (*Colletotrichum truncatum*) em plantas de soja quando tratadas com isolados de leveduras.

Isolados de Leveduras	AACPD *	% de redução
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 19-1)	0,4516 a	80,4
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	0,6067 a	73,6
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	0,6244 a	72,9
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 17-3)	0,6504 a	71,7
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 12-3)	0,7467 a	67,5
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-4)	0,7476 a	67,5
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3)	0,7773 a	66,2
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	0,8196 a	64,4
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	0,8458 a	63,2
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	0,8546 a	62,9
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 07-2)	0,9435 a	59,0
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-1)	0,9596 a	58,3
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 15-4)	0,9698 a	57,9
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 19-2)	1,0981 a	52,3
<i>Pichia pini</i> (AH 18-3)	1,1691 a	49,2
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 17-2)	1,1709 a	49,1
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 14-2)	1,1924 a	48,2
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 12-1)	1,2060 a	47,6
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 19-3)	1,2062 a	47,6
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 18-2)	1,2080 a	47,5
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 17-4)	1,2508 a	45,6
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 01-1)	1,2600 a	45,2
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 15-2)	1,2627 a	45,1
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 05-2)	1,2649 a	45,0
<i>Candida albicans</i> (AH 05-3)	1,2864 a	44,1
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-1)	1,2991 a	43,5
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 15-1)	1,4024 a	39,0
<i>Candida albicans</i> (AH 11-2)	1,4064 a	38,9
<i>Sporidiobolus johnsonii</i> (AH 16-1)	1,4233 a	38,1
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 14-4)	1,6587 a	27,9
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 07-1)	1,7076 b	25,8
<i>Candida albicans</i> (AH 11-3)	1,9527 b	15,1
Controle	2,3009 b	0,0
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 02-1)	2,4730 b	-7,5
<i>Candida albicans</i> (AH 09-1)	2,7810 b	-20,9
<i>Cryptococcus laurentii</i> (AH 03-1)	2,9322 b	-27,4

\*: indica que as médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Scott-Knott. Dados transformados utilizando a equação:  $\sqrt{(x+0,5)}$ . Coeficiente de variação (CV) = 32,87%.

Diferentes espécies de leveduras têm sido descritas com potencial de antagonismo contra diferentes espécies de microrganismos fitopatogênicos (PAPP et al., 2021; HERNANDEZ-MONTIEL et al., 2021; ZHANG et al., 2020; FREIMOSER et al. 2019), bem como os diferentes mecanismos de ação possíveis. No entanto, conforme descreve Papp et al. (2021) cabe destacar que uma mesma espécie de levedura pode inibir certos microrganismos, enquanto outros não são inibidos nas mesmas condições ambientais. Ainda, em alguns casos nota-se que o efeito antagônico requer contato próximo e uma interação física entre a levedura e as células do patógeno, enquanto em outros casos, tal contato não é necessário, o que depende provavelmente do modo do mecanismo inibitório atuante nos diferentes patossistemas.

Os diferentes isolados de leveduras também proporcionaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade de algumas proteínas relacionadas a defesa em plantas de soja (Tabela 2), indicando a presença do efeito indutor de resistência como mecanismo de ação das leveduras na proteção das plantas.

Com relação ao teor de proteínas solúveis totais, verifica-se que após a aplicação das leveduras (72 h), somente o isolado *Zygoascus hellenicus* (AH 06-2) apresentou menor produção de proteínas totais em relação ao controle (Tabela 2). Após a inoculação do patógeno (144 h), todos os isolados, a exceção de *Rhodotorula aurantiaca* (AH 12-3), produziram maiores teores de proteínas solúveis totais em relação aos controles, mesmo que não tenham diferido estatisticamente. No entanto, considera-se que a aplicação das células de leveduras não induziu incremento no teor de proteínas solúveis, nem mesmo quando as plantas foram submetidas a infecção com o patógeno. Como o sistema defensivo é baseado em enzimas solúveis, esperava-se aumento no teor de proteínas solúveis totais. Sendo assim, possivelmente os isolados de leveduras sejam percebidos pelos receptores da planta, ativando a tradução do sinal, desencadeando a síntese de proteínas de membrana para melhorar o reconhecimento na própria membrana, além de enzimas do tipo quinases para acelerar o fluxo de informação, mas não na produção de proteínas solúveis, o que pode justificar os resultados encontrados. No entanto, quando o patógeno chega na planta, o fluxo de informação já foi melhorado e a resposta de defesa na presença do patógeno se torna muito mais rápida e eficiente, por isso se observa o aumento de algumas enzimas relacionadas a defesa só depois que o patógeno chega, e isso somente para alguma levedura específica, como é o caso de *R. aurantiaca* (AH 12-3) para peroxidase (Tabela 2). Isso indica que com a presença do patógeno, possivelmente há a expressão de outras proteínas solúveis não estudadas e/ou que outras rotas tenham sido ativadas, resultantes de uma interação planta-levedura-patógeno mais eficiente.

Ainda, nota-se que não há aumento do teor de proteínas solúveis totais ao longo das coletas, o que se deve a capacidade nutricional limitada das plantas nas bandejas utilizadas no ensaio, portanto, deve-se considerar a hipótese de que quando não há substrato suficiente, a planta redireciona aminoácidos, na chamada “síntese de novo”, onde proteínas de menor importância podem ter sido degradadas para sintetizar as proteínas de defesa, quando há o estímulo do processo infeccioso, e nestes casos, o teor de proteínas solúveis pode permanecer igual.

Para a atividade de peroxidase, somente a aplicação do isolado *Rhodotorula aurantiaca* (AH 12-3) promoveu incremento significativo após a inoculação do patógeno (144 horas após o tratamento) (Tabela 2). Este mesmo isolado não diferiu dos controles após a aplicação do tratamento, indicando que talvez o isolado tenha favorecido o mecanismo de informação para a síntese da peroxidase, mas o efeito só foi desencadeado quando a planta foi confrontada com o patógeno. Assim, configura-se a ocorrência de sinalização (*priming*), na qual a expressividade do teor de peroxidase só é aumentada após a chegada do patógeno nas plantas induzidas. 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 ao estresse. Nesse caso, com o mecanismo de informação potencializado, a resposta de defesa da planta em relação ao patógeno foi expressa em maior magnitude, o que pode ter proporcionado maior dificuldade para o patógeno se estabelecer na planta, o que pode justificar a redução de 67,5% na severidade da doença por este isolado (Tabela 1). Vale ressaltar, que a levedura pode possuir ação “*killer*”, ou seja, quando a mesma é aplicada na superfície do hospedeiro, ela produz compostos tóxicos para inibir outros microrganismos habitantes na filosfera, como o patógeno, dessa forma, o hospedeiro induz a produção de peroxidases, para proporcionar maior resistência a estes compostos tóxicos e consequentemente, observa-se a redução da severidade da doença.

O isolado *Zygoascus hellenicus* (AH 06-2) também apresentou atividade de peroxidase diferente, porém inferior aos controles, somente após a inoculação do patógeno, antes e após a aplicação das leveduras não houve efeito significativo (Tabela 2). Isto permite dizer que o isolado não atuou incrementando o processo de síntese da peroxidase, pois ele está constantemente ocorrendo na planta e que quando a planta foi desafiada com o patógeno, no decorrer do processo infeccioso, supõem-se que houve a degradação da enzima anteriormente formada para formação de outro mecanismo de ação, e a planta com este mecanismo inibido pela levedura não sintetizou novas peroxidases para defesa. Isto sugere que a redução na

severidade da doença de 62,9% para *Z. hellenicus* (AH 06-2) seja devida a outros mecanismos e/ou enzimas atuantes (Tabela 1).

Em geral, todos os isolados promoveram incremento na atividade de peroxidases após a aplicação dos tratamentos, embora não tenham diferido dos controles pelo método estatístico utilizado e, após a inoculação do patógeno, os isolados mantiveram esse aumento na expressão da enzima, com exceção dos isolados *P. guilliermondii* (AH 16-3) e *Z. hellenicus* (AH 06-2). Esse aumento constante na atividade da enzima ao longo do tempo e sem diferença dos controles para a maioria dos tratamentos, se deve a produção constante de lignina na planta à medida que ocorre o crescimento e multiplicação celular. Além de que, após o desafio com o patógeno a planta induz o processo de defesa produzindo proteínas como a peroxidase. A atividade da peroxidase está relacionada, segundo Schwan-Estrada; Stangarlin e Pascholati (2008), por catalisar a oxidação de álcoois fenólicos à lignina, fazendo com que ocorram mudanças na parede celular, proporcionando mais resistência contra as toxinas que são liberadas pelos patógenos e as situações adversas. Logo, sua alta atividade pode contribuir para reduzir o estabelecimento da doença, conseqüentemente, a severidade da doença, já que dificulta a entrada do patógeno (Tabela 1).

Para a atividade de polifenoloxidasas, as leveduras *P. pini* (AH 15-3), *R. aurantiaca* (AH 12-3) e *R. glutinis* (AH 14-3) induziram aumento na atividade da enzima diferindo dos controles após o tratamento. No entanto, após o confronto com o patógeno, todos os isolados de *Rhodotorula* spp. e o isolado *Zygoascus hellenicus* (AH 06-2) apresentaram uma redução na atividade da enzima (Tabela 2). A polifenoloxidase é uma enzima que atua oxidando moléculas de fenóis para quinonas, que são substâncias tóxicas ao patógeno, e até mesmo à célula vegetal em elevadas concentrações (MAYER; HAREL, 1979). Nestes casos, a planta pode armazenar compostos fenólicos na forma compartimentalizada nos vacúolos e apoplasto, e somente quando ocorre a patogênese formar a oxidação destes compostos pela polifenoloxidase previamente induzida, formando os compostos mais tóxicos, que podem desencadear a reação de hipersensibilidade e culminar na resistência à doença.

Ainda ao observar a atividade de polifenoloxidase verifica-se que os isolados *Pichia* spp. e *Rhodotorula* spp. induziram o aumento na atividade da enzima após o tratamento. No entanto, para *Pichia* spp. a expressão continuou aumentando após a inoculação do patógeno, ao contrário do que ocorre para os isolados de *Rhodotorula* spp., onde após a inoculação do patógeno a enzima teve um decréscimo acentuado, sendo inferior aos controles, indicando que a presença do patógeno pode ter desencadeado uma nova rota de defesa mais precisa e eficiente para essa interação. Supõem-se assim, que essas leveduras possam ter induzido a interação

planta-levedura, porém no caso da *Rhodotorula* spp., quando há presença do patógeno, a interação passa a ser planta-levedura-patógeno, com expressão de enzimas, como a polifenoloxidase, em níveis diferentes da interação anterior. Além disso, isto pode justificar o atraso no processo infeccioso, cujas moléculas formadas podem ter inibido o patógeno e reduzido a severidade da doença. Nestes casos, o aumento precoce pode ser benéfico para a planta, pois no caso da ocorrência do processo infeccioso, o investimento de energia e substrato pela planta na indução da resistência vale a pena, pois consegue retardar o processo infeccioso ou mesmo impedi-lo.

Para a atividade de fenilalanina amônia-liase não houve efeito significativo, ou seja, os isolados de levedura não atuaram promovendo incrementos sobre a atividade dessa enzima, sendo assim, não justifica a redução da severidade da doença por este mecanismo (Tabela 2). Quando não há incrementos na atividade desta enzima, sugere-se que toda a via do ácido cinâmico (fenilpropanoides) não sofre alterações. Isto porque, quanto maior a atividade de fenilalanina amônia-liase, maior é a concentração de compostos fenólicos e derivados. Logo, os compostos fenólicos produzidos em escala normal, estão sendo destinados como substrato para peroxidase ou polifenoloxidase, e não sobre ambas, o que pode justificar, por exemplo, para o isolado *R. aurantiaca* (AH 12-3) o aumento na síntese de peroxidase e o decréscimo em polifenoloxidase. Ou ainda, a não atividade da fenilalanina amônia-liase pode indicar a ativação da via por meio da enzima tirosina amônia-liase, não investigada, o que poderia justificar uma continuidade na produção de compostos fenólicos.

Para a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase somente houve efeito após os tratamentos, onde apenas o isolado *Z. hellenicus* (AH 06-2) induziu maior atividade da enzima. No entanto, todos os demais isolados também apresentaram atividade superior aos controles, porém não diferiram (Tabela 2). A maior atividade desta enzima para o isolado *Z. hellenicus* (AH 06-2) pode ser o mecanismo para justificar a redução na severidade da doença de 62,9%, visto que houve redução e/ou inibição do efeito de algumas outras enzimas, como a peroxidase e a polifenoloxidase por este mesmo isolado. Pode-se sugerir que a levedura possui ação endofítica, ou seja, quando aplicada, a mesma produz  $\beta$ -1,3-glucanase para degradar a parede celular vegetal e conseguir penetrar no hospedeiro, justificando o aumento da enzima após a aplicação do tratamento, em sequência, com a colonização endofítica do tecido vegetal pela levedura, observa-se a redução da atividade de peroxidase.

A enzima  $\beta$ -1,3-glucanase atua hidrolisando a  $\beta$ -1,3-glucana, cuja ação produz efeito direto na degradação da parede celular de fungos, cujos maiores componentes são a quitina e  $\beta$ -1,3-glucana, além disso, a hidrólise da  $\beta$ -1,3-glucana pode formar oligômeros de glicose, que

servem como molécula-sinal sendo reconhecidas e transduzidas pelas células da planta e ativando um largo espectro de respostas de defesa (MARTINS, 2008). Sendo assim, a promoção da indução da  $\beta$ -1,3-glucanase na planta levou a resposta rápida na degradação da parede celular do patógeno, quando desafiada, amenizando o processo infeccioso. Nestes casos, o aumento precoce da atividade da enzima é viável, pois o gasto metabólico utilizado pela planta para sintetizar a enzima, possivelmente seria o mesmo utilizado quando da chegada do patógeno, porém a planta já possui essas proteínas de defesas elaboradas, podendo utilizá-las rapidamente para evitar a ação do patógeno.

Existem duas formas de proporcionar a resistência sistêmica de uma planta, a resistência sistêmica adquirida (RSA) que tem como sinalizador o ácido salicílico e ocorre como consequência da ação do patógeno, e a resistência sistêmica induzida (RSI) que tem como sinalizador o ácido jasmônico e/ou etileno e desencadeia rotas metabólicas preparando a planta para uma potencial ativação de várias respostas de defesa celulares, quando da efetiva chegada do patógeno (PASCHOLATI; DALIO, 2018; ROMEIRO, 2008). Carvalho (2020) observou que a presença das leveduras *Rhodotorula glutinis* (AH 20-1) e *Sporidiobolus johnsonii* na superfície da planta ativou a biossíntese do ácido jasmônico de forma rápida (3 horas), pressupondo a ocorrência de RSI, enquanto, para *Rhodotorula glutinis* (AH 14-3), o tratamento apresentou efeito *priming*, onde houve efeito do ácido salicílico somente em plantas induzidas seis horas após a inoculação do patógeno, verificando a RSA. No presente trabalho, o mesmo isolado *R. glutinis* (AH 14-3) não induziu a atividade de nenhuma das proteínas relacionadas a defesa testadas após a infecção com o patógeno, e ainda produziu incremento para a polifenoloxidase após o tratamento, mas que não justifica o efeito de *priming*, pois quando houve o desafio a atividade da enzima diminuiu (Tabela 2). Verifica-se que há distinção da rota metabólica ativada entre as diferentes espécies de leveduras, assim pode-se considerar que cada levedura interage com a planta hospedeira estimulando reações específicas, direcionando mecanismos específicos, sendo eles de defesa ou não, porém considerando a atuação das diversas espécies sobre a superfície da planta, o que caracteriza a biodiversidade, os mecanismos podem ser complementares, formando um complexo sistema de defesa.

Tabela 2 – Teor de proteínas solúveis totais (mg g de tecido fresco<sup>-1</sup>), atividade de peroxidase (absorbância min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>), polifenoloxidase (absorbância min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>), fenilalanina amônia-liase (µg ácido *trans*-cinâmico hora<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>) e β-1,3-glucanase (µg glicose min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>) em trifólios de soja (*Glycine max*) quando submetidos aos tratamentos com leveduras.

<b>Proteínas solúveis totais</b>			
Tratamentos	Coletas (horas)		
	0 *	72 *	144 <sup>ns</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	2,8641 ab	2,5223 ab	2,3366
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	3,2307 ab	2,2131 ab	2,8219
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	2,9273 ab	2,4469 ab	2,3141
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 12-3)	3,2520 ab	1,9989 ab	1,3304
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3)	3,1940 ab	2,6842 ab	2,3797
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-4)	2,9534 ab	2,4538 ab	2,1432
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	2,5609 a	2,7807 ab	2,4437
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	3,8651 ab	1,5997 b	2,1099
Controle	3,5251 a	2,8300 a	1,8189
Controle inoculado	3,9653 b	2,4372 b	1,9974
<b>Peroxidase</b>			
Tratamentos	Coletas (horas)		
	0 <sup>ns</sup>	72 <sup>ns</sup>	144 *
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	29,4473	37,1951	49,2770 ab
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	27,4630	45,8843	44,6440 ab
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	36,0172	47,3247	66,2011 ab
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 12-3)	33,6532	48,0687	87,6724
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3)	29,9205	40,0927	58,4172 ab
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-4)	25,8451	46,2458	52,3289 ab
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	30,7320	40,5858	57,9895 ab
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	19,5203	31,3408	20,4795
Controle	30,1589	29,4009	56,0660 a
Controle inoculado	22,1709	32,0139	61,9276 b
<b>Polifenoloxidase</b>			
Tratamentos	Coletas (horas)		
	0 *	72 *	144 *
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	1,0958 ab	1,4189 b	1,8862 ab
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	1,1846 ab	1,6240 b	1,7059 ab
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	1,5389	1,8590	2,8649 b
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 12-3)	1,6860	2,0307	0,6269
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3)	1,6291	1,8410	0,6677
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-4)	1,4666 b	1,5026 ab	0,7950
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	1,4354 b	0,6783 ab	1,1300 ab
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	1,3615 b	0,9656 ab	0,7386
Controle	0,4937 a	0,5791 a	1,6418 a
Controle inoculado	0,6732 b	0,8661 b	2,0073 b



<b>Fenilalanina amônia-liase</b>			
Tratamentos	Coletas (horas)		
	0 <sup>ns</sup>	72 <sup>ns</sup>	144 <sup>ns</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	74,7453	98,3028	107,8073
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	96,0695	56,1683	185,1258
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	52,8605	53,2873	168,0490
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 12-3)	126,3888	254,1305	174,7693
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3)	171,0048	24,2338	132,4105
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-4)	161,3163	173,6990	76,7635
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	135,4475	139,2890	214,9215
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	22,5000	247,4668	166,8225
Controle	21,6755	70,6310	162,4793
Controle inoculado	69,5330	115,6908	64,9188

<b>β-1,3-glucanase</b>			
Tratamentos	Coletas (horas)		
	0 <sup>ns</sup>	72 <sup>*</sup>	144 <sup>ns</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-2)	7,0138	12,9970 ab	12,8193
<i>Pichia guilliermondii</i> (AH 16-3)	8,9090	13,3113 ab	12,8378
<i>Pichia pini</i> (AH 15-3)	10,1088	12,3025 ab	14,3500
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (AH 12-3)	2,6463	15,3718 ab	22,4893
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 14-3)	7,7795	16,9845 ab	20,3705
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AH 20-4)	8,4275	14,0980 ab	19,4880
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 05-5)	8,6110	12,3613 ab	19,9018
<i>Zygoascus hellenicus</i> (AH 06-2)	3,4310	25,3900	10,8193
Controle	6,9785	9,8445 a	15,1848
Controle inoculado	6,7425	9,9240 b	13,0030

O tratamento ocorreu logo após o tempo zero e a inoculação do patógeno 72 horas após o tratamento. \*: indica diferença significativa, dentro de cada tempo de coleta (colunas), pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ) quando comparada aos controles, onde médias seguidas de letras “a” não diferem do controle e médias seguidas de letras “b” não diferem do controle inoculado. <sup>ns</sup>: não significativo. Dados transformados utilizando a equação:  $\sqrt{(x+0,5)}$ . Coeficiente de variação (CV) = 9,42%, 12,04%, 12,61%, 81,71% e 23,38%, respectivamente as variáveis proteínas, peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liase e β-1,3-glucanase.

Constatou-se que as leveduras apresentam potencial para serem agentes antagonistas de controle biológico, por reduzirem a severidade da antracnose em soja, em níveis altamente significativos. No entanto, supõem-se que a indução de resistência pode não ser o principal mecanismo atuante para alguns dos isolados de leveduras. Acredita-se que os diferentes isolados de leveduras podem apresentar diferentes mecanismos de atuação no controle biológico de doenças, atuando por diferentes métodos, conforme descrevem Freimoser et al. (2019), Zhang et al. (2020) e Hernandez-Montiel et al. (2021), não investigados no estudo em questão. Logo, destaca-se o potencial das leveduras como agentes de biocontrole e alternativa

sustentável no manejo da antracnose em soja. Ainda, considerando a possibilidade de complementariedade na indução de resistência por cada isolado, sugere-se novos estudos considerando a co-inoculação de diferentes isolados de leveduras simultaneamente.

### **Conclusão**

As leveduras apresentaram potencial para redução da severidade da antracnose em plantas de soja, mas verifica-se que cada isolado de levedura pode contribuir de forma diferente na indução de enzimas relacionadas a defesa de plantas.

### **Referências**

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

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 Physiology**, Rockville, v. 161, i. 4, p. 2014-2022, apr. 2013.

CALIXTO, G. B. **Leveduras no controle de *Colletotrichum truncatum* e seu efeito na produtividade da soja**. 2020. 51 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2020.

CARVALHO, J. C. **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**. 2020. 101 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2020.

CHEN, S. N.; LUO, C. X.; HU, M. J.; SCHNABEL, G. Sensitivity of *Colletotrichum* species, including *C. fioriniae* and *C. nymphaeae*, from peach to demethylation inhibitor fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 12, p. 2434-2441, dec. 2016.

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

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C.; COSTA, J. L. S.; SOUZA, E. D. T.; BERNI, R. F. Diagnose das doenças. In: CATERI, M. G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. S. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, 1999. p. 17-34.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 1, p. 18-23, 2016.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v. 64, p. 351-359, 1999.

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

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

FREIMOSER, F. M.; RUEDA-MEJIA, M. P.; TILOCCA, B.; MIGHELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 35, n. 154, p. 1-19, oct. 2019.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. Doenças da Soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**: volume 2 - Doenças das Plantas Cultivadas. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. cap. 67, p. 657-675.

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**. Viçosa: Editora UFV, 2016. cap. 3, p. 93-105.

GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de doenças na cultura da soja. In: PITOL, C.; GITTI, D. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; LOURENÇÃO, A. L. F.; MELOTTO, A. M. **Tecnologia e produção: soja 2014/2015**. Curitiba: Midiograf, cap. 8, p. 134-156, 2015.

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

HELING, A. L. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial de leveduras como agentes de proteção de plantas de feijoeiro ao cretamento bacteriano comum**. 2016. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2016.

HERNANDEZ-MONTIEL; L. G.; DROBY, S.; PRECIADO-RANGEL, P.; RIVAS-GARCÍA, T.; GONZÁLEZ-ESTRADA, R. R.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P.; ÁVILA-QUEZADA, G. D. A sustainable alternative for postharvest disease management and phytopathogens biocontrol in fruit: antagonistic yeasts. **Plants**, Basel, v. 10, i. 12, n. 2641, p. 1-12, dec. 2021.

HILBER-BODMER, M.; SCHMID, M.; AHRENS, C. H.; FREIMOSER, F. M. Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 1-15, jan. 2017.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, p. 273-279, 1972.

MARTINS, E. M. F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 12, p. 387-410.

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

MAYER; A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, p. 193-215, 1979.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: volume 1 - Princípios e conceitos. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. cap. 17, p. 261-274.

MELLO, S. C. M.; ECKSTEIN, B.; MARQUES, E.; CARVALHO, D. D. C. Controle de doenças de plantas. In: FONTES, E. M. G.; VALADORES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. cap. 10, p. 291-325.

PAPP, L. A.; HORVÁTH, E.; PELES, F.; PÓCSI, I.; MIKLÓS, I. Insight into yeast-mycotoxin relations. **Agriculture**, v. 11, i. 12, n. 1291, p. 1-13, dec. 2021.

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. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. cap. 35, p. 423-452.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas à patógenos. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 13, p. 411-432.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 6, p. 227-248.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita**. 1ed. Viçosa: UFV, 2015. 333p.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 934p., 2012.

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

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, cap. 2, p. 41-56.

ZHANG, X.; LI, B.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; TIAN, S. Antagonistic yeasts: a promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. **Journal of Fungi**, Basel, v. 6, i. 3, n. 158, p. 1-15, aug. 2020.

### 3. ARTIGO II

#### SENSIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FILOPLANO À FUNGICIDAS

#### SENSITIVITY OF YEASTS FROM PHYLLOSPHERE TO FUNGICIDES

##### Resumo

O filoplano abriga diversas espécies de microrganismos que exercem papel fundamental na sanidade das culturas e na produtividade do ecossistema, mas as aplicações excessivas e inadequadas de fungicidas podem levar a redução e/ou inibição das espécies habitantes do filoplano. Objetivou-se avaliar a sensibilidade de leveduras isoladas de filoplano contra produtos químicos utilizados na agricultura no controle de doenças de plantas. Sendo assim, 37 isolados de diferentes espécies de leveduras oriundos de filoplano de várias plantas foram avaliados *in vitro* quanto a sensibilidade a cinco produtos fungicidas e duas caldas agrícolas, avaliando-se o tamanho do halo de inibição das leveduras quando em contato com os produtos químicos. Observou-se que as leveduras *Zygoascus hellenicus*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Pichia* spp. e *Sporobolomyces roseus* se mostraram insensíveis a maior parte dos produtos fungicidas testados, enquanto a levedura *Cryptococcus laurentii* foi inibida em algum grau por todos os produtos, há exceção da calda bordalesa. Com relação aos produtos, aqueles compostos por uma mistura de estrobilurinas e carboxamidas e os multisítios se mostraram menos tóxicos as leveduras, já os produtos contendo ingrediente ativo do grupo dos triazóis se mostraram com maior toxicidade. Ainda, os produtos atuantes sobre apenas um mecanismo de ação, a inibição da respiração, se mostraram mais seletivos às leveduras. Conclui-se que as leveduras apresentam insensibilidade à maior parte dos produtos fungicidas testados, no entanto, algumas espécies apresentam significativa sensibilidade à produtos fungicidas contendo princípio ativo do grupo dos triazóis.

**Palavras-chave:** carboxamida; estrobilurina; halo de inibição; insensibilidade; triazol.

##### Abstract

The phylloplane harbors several species of microorganisms that play a fundamental role in the health of the crops and in the productivity of the ecosystem, but excessive and inappropriate applications of fungicides can lead to a reduction and/or inhibition of the species inhabiting the phylloplane. The objective was to evaluate the sensitivity of yeasts strains from phylloplane against chemical products used in agriculture to control plant diseases. Thus, 37 strains of

different species of yeasts from phylloplane of several plants were evaluated in vitro for sensitivity to five fungicidal products and two agricultural sprays, evaluating the size of the inhibition halo of the yeasts when in contact with the chemical products. It was observed that the yeasts *Zygoascus hellenicus*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Pichia* spp. and *Sporobolomyces roseus* were insensitive to most of the tested fungicidal products, while the yeast *Cryptococcus laurentii* was inhibited to some degree by all products, with the exception of Bordeaux mixture. Regarding the products, those composed of a mixture of strobilurins and carboxamides and the multisites were shown to be less toxic to yeasts, whereas the products containing the active ingredient of the triazole group were shown to be more toxic. Also, the products acting on only one mechanism of action, the inhibition of respiration, proved to be more selective to yeasts. It is concluded that yeasts are insensitive to most of the tested fungicidal products, however, some species show significant sensitivity to fungicidal products containing the active principle of the triazole group.

**Key words:** carboxamide; inhibition halo; insensitivity; strobilurin; triazole.

## Introdução

O filoplano descreve a superfície da folha, nele estão abrigadas diversas comunidades microbianas, que incluem bactérias, fungos, algas, leveduras e nematóides. O filoplano fornece um nicho para essas comunidades microbianas diversificadas e, como tal, torna-se um ecossistema importante ecologicamente. Considera-se que a superfície foliar fornece o ambiente ideal para a microflora, uma vez que os exsudatos foliares fornecem nutrição, umidade, pH e temperatura para a sobrevivência destes microorganismos (GOSWAMI; GOEL; MAJUMDAR, 2021). Destaca-se que esses microrganismos tendem a ser resistentes à diferentes condições, pois estão sujeitos a diferentes fluxos de temperatura, umidade e radiação solar ao longo do dia e da noite.

Perreault e Laforest-Lapointe (2022) citam que os microrganismos associados à folha demonstram influenciar a aptidão e o crescimento do hospedeiro, a resiliência a estresses abióticos e a resistência a patógenos. Além disso, destacam correlações positivas entre a diversidade da microbiota associada às árvores e a produtividade do ecossistema. Diante de tantos benefícios ao hospedeiro, os microrganismos dos filoplanos têm sido estudados como bioprotetores e estimuladores de crescimento em plantas hospedeiras.

No entanto, nos atuais sistemas agricultáveis, diante da excessiva demanda por produtividades mais altas e os desafios encontrados no campo, o uso de agrotóxicos vem sendo utilizado exponencialmente, para sanar os problemas fitossanitários e oferecer melhores



condições nos cultivos, evitando perdas econômicas. Os agrotóxicos têm sido apontados como vilões ambientais, por levar a contaminação do ambiente e de seres vivos, quando não utilizados conforme as recomendações. Ressalta-se que um dos efeitos ambientais indesejáveis dos agrotóxicos é a contaminação de espécies que não interferem negativamente no processo de produção que se tenta controlar, denominadas espécies não-alvos. Dessa maneira, além do impacto sobre uma população específica, a dispersão de agrotóxicos no sistema agrícola pode causar um desequilíbrio na interação natural entre espécies, como as interações benéficas entre planta-microrganismos dos filoplanos.

Dentre os agrotóxicos, os fungicidas são normalmente utilizados para o controle de doenças em diversas culturas, mas apesar dos fungicidas terem como principal objetivo o controle dos organismos fitopatogênicos, efeitos podem ser observados, após sua aplicação, sobre outros microrganismos do filoplano. Walter et al. (2007) testaram o uso de diferentes produtos agroquímicos sobre microrganismos da filosfera da macieira, e observaram que os produtos fungicidas pararam e/ou reduziram severamente o crescimento de quase todos os microrganismos estudados. Além disso, a nível de campo, o número total de organismos se recuperou em 2-6 dias, mas a riqueza de espécies (soma das unidades taxonômicas reconhecíveis) diminuiu. Concluindo que os agroquímicos afetaram claramente os microrganismos de superfície cultiváveis não-alvo. Semelhante aos resultados encontrados por Karlsson et al. (2014) que observaram menor número de unidades taxonômicas nas amostras tratadas com fungicidas e que a abundância das espécies foi reduzida. Cadez, Zupan e Raspor (2010) observaram que a aplicação de fungicidas nas concentrações recomendadas pelos fabricantes reduziu seletivamente as comunidades microbianas dos bagos de uva, mas além do intervalo de segurança, os autores supõem que ocorre a recolonização dessas leveduras, isto porque as concentrações dos fungicidas diminuem.

Conforme Gonçalves et al. (2012) muitos fungicidas diminuem a atividade antagonista de alguns microrganismos no filoplano, enquanto outros a aumentam. Essas alterações afetam o balanço dinâmico no filoplano, podendo levar ao desenvolvimento de doenças de plantas secundárias ou intensificar doenças já existentes. Os compostos fungicidas, especialmente os descritos com atividade em múltiplos alvos, podem afetar os microrganismos não alvos, como é o caso das leveduras, que habitam a superfície de folhas, flores e frutos, levando-as à morte.

As leveduras por serem habitantes naturais dos ecossistemas colonizam a superfície das estruturas vegetais atuando como agentes de controle biológico natural, devido aos efeitos na redução da incidência e/ou severidade das doenças de plantas, pois podem exercer papel na

indução de resistência, na promoção do crescimento, na competição por espaço e nutrientes, além da antibiose e do parasitismo (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

As leveduras são microrganismos que auxiliam a manter o equilíbrio natural da microbiota vegetal, beneficiando o hospedeiro através da colonização das superfícies, no entanto, quando são utilizados pesticidas agrícolas as comunidades de leveduras podem ser alteradas e/ou inibidas. Kucharska, Wachowska e Czaplicki (2020) citam que os fungicidas podem atuar seletivamente em várias espécies de leveduras, podendo levar a completa inibição para algumas espécies e ser insensíveis para outras, o que pode levar a um desequilíbrio na microbiota. Portanto, o desafio é expandir os conhecimentos sobre o comportamento e sensibilidade das leveduras quando submetidas a aplicações dos produtos fungicidas rotineiramente utilizados na agricultura. Tais informações são de fundamental relevância para que possam ser desenvolvidas e empregadas medidas mais sustentáveis no manejo de doenças de plantas.

Objetivou-se com este trabalho, avaliar a sensibilidade de leveduras isoladas de filoplano de diferentes espécies vegetais contra produtos químicos e caldas rotineiramente utilizados na agricultura no controle de doenças de plantas.

## **Material e Métodos**

O ensaio foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* Marechal Cândido Rondon/PR. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial, contendo oito tratamentos (sete produtos fungicidas e um controle), 37 isolados de leveduras, e quatro repetições.

Foram utilizados 37 isolados de leveduras da coleção de leveduras do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, das seguintes espécies: *Candida albicans*, *Cryptococcus laurentii*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pini*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporidiobolus johnsonii*, *Sporobolomyces roseus* e *Zygoascus hellenicus*, preservadas sob óleo mineral estéril e mantidos em geladeira (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016). As leveduras foram retiradas do preservado e cultivadas em placas de Petri contendo meio ágar-YEPG (20 g glicose, 10 g peptona, 5 g extrato de levedura, 20 g ágar e 1000 mL de água destilada) para serem utilizadas no ensaio. A partir de placas de Petri com as leveduras cultivadas com sete dias de idade, realizou-se o preparo das suspensões das leveduras, diluindo-se alçadas das colônias em micro tubos contendo solução salina (NaCl 0,85%), cujo tubo foi levemente agitado para completa homogeneização das suspensões. Posteriormente,

preparou-se as suspensões de cada uma das leveduras correspondendo a  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, calibrando-as com auxílio de Câmara de Neubauer.

Os produtos fungicidas testados foram preparados conforme as recomendações dos fabricantes, sendo eles: 1 - bixafem + protioconazol + trifloxistrobina (concentração de bixafem 125 g L<sup>-1</sup>, protioconazol 175 g L<sup>-1</sup> e trifloxistrobina 150 g L<sup>-1</sup>, equivalente a dose 0,5 L ha<sup>-1</sup> do produto comercial, para volume de calda 100 L ha<sup>-1</sup>); 2 – trifloxistrobina + tebuconazol (concentração de trifloxistrobina 100 g L<sup>-1</sup> e de tebuconazol 200 g L<sup>-1</sup>, equivalente a dose 0,6 L ha<sup>-1</sup> do produto comercial, para volume de calda 100 L ha<sup>-1</sup>); 3 – fluxapiroxade + piraclostrobina (concentração de fluxapiroxade 167 g L<sup>-1</sup> e piraclostrobina 333 g L<sup>-1</sup>, equivalente a dose 0,35 L ha<sup>-1</sup> do produto comercial, para volume de calda 100 L ha<sup>-1</sup>); 4 – azoxistrobina + benzovindiflupir (concentração de azoxistrobina 300 g kg<sup>-1</sup> e benzovindiflupir 150 g kg<sup>-1</sup>, equivalente a dose 300 g ha<sup>-1</sup> do produto comercial, para volume de calda 200 L ha<sup>-1</sup>); 5 – oxiclreto de cobre (concentração de oxiclreto de cobre 588 g L<sup>-1</sup>, equivalente a dose 1,5 L ha<sup>-1</sup> do produto comercial, para volume de calda 200 L ha<sup>-1</sup>); 6 – calda sulfocálcica (concentração 0,3 °Baumé, adequada para aplicação em fase vegetativa – equivalente a diluição de 1 L de calda pura e 129 L de água para uma calda de 30 °Baumé); 7 – calda bordalesa (concentração de cal virgem 10 g L<sup>-1</sup> e sulfato de cobre 10 g L<sup>-1</sup>, utilizada pura equivalente a concentração de 1%); e como controle utilizou-se somente água destilada esterilizada.

Em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-YEPG estéril dispensou-se 100 µL da suspensão da levedura sobre o meio espalhando-se sobre toda a superfície com auxílio de alça de Drigalski. Após, foram depositados discos de papel de filtro com 8 mm de diâmetro embebidos com as soluções dos fungicidas em estudo, sendo estes discos distribuídos na borda circular das placas e o disco controle (água destilada) ao centro. As placas de Petri foram vedadas com plástico filme de PVC e incubadas em câmara incubadora (tipo BOD) a 25 °C por 48 horas.

Decorrido o tempo de incubação (48 horas), avaliou-se o halo de inibição formado em cada disco de papel com auxílio de paquímetro, medindo-se da borda do disco até o fim do halo de inibição. O tamanho dos halos de inibição formados para cada produto em cada isolado de levedura foram tabulados em planilha eletrônica e submetidos a média e classificados de acordo com o grau de sensibilidade proposto na Tabela 1. Posteriormente, os isolados de leveduras foram agrupados em cada respectiva classificação.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANAVA) pelo teste F e as médias, quando significativas, agrupadas pelo teste Scott-Knott, com níveis de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Tabela 1. Classificação de grau de sensibilidade de acordo com o diâmetro do halo de inibição formado.

Grau de Sensibilidade	Diâmetro do halo de inibição
Insensível (I)	0 a 1 mm
Baixa Sensibilidade (BS)	1 a 4 mm
Sensível (S)	4 a 16 mm
Alta Sensibilidade (AS)	> 16 mm

## Resultados e Discussão

Para caracterizar o efeito dos fungicidas amplamente utilizados na agricultura sobre populações de leveduras habitantes do filoplano, agrupou-se os isolados estudados nas categorias: insensível, baixa sensibilidade, sensível e alta sensibilidade. O número de isolados de leveduras de acordo com o grau de sensibilidade proposto podem ser observados na Tabela 2. Os isolados de leveduras apresentaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) quanto ao tamanho dos halos de inibição em cada produto antimicrobiano (Figura 1).

Tabela 2. Número de isolados de leveduras quanto ao seu grau de sensibilidade aos produtos antimicrobianos testados.

Tratamentos	Grupo químico/ biológico	Número de Isolados de Leveduras			
		I	BS	S	AS
Controle	-	37	0	0	0
Oxicloreto de cobre	M	29	8	0	0
Calda Sulfocálcica	M	25	12	0	0
Calda Bordalesa	M	34	3	0	0
Trifloxistrobina + tebuconazol	E + T	18	7	4	8
Bixafem + protioconazol + trifloxistrobina	C + T+ E	27	7	3	0
Fluxaproxade + piraclostrobina	C + E	34	3	0	0
Azoxistrobina + benzovindiflupir	E + C	35	0	2	0

Onde: na horizontal, I - insensível; BS - baixa sensibilidade; S - sensível e AS - alta sensibilidade; e na vertical, M - multissítios; E - estrobilurina; T - triazol e C - carboxamida.

De modo geral, a maior parte dos isolados de leveduras apresentaram baixa sensibilidade ou foram insensíveis aos produtos antifúngicos testados (Tabela 2). No entanto, os produtos compostos por trifloxistrobina + tebuconazol, bixafem + protioconazol + trifloxistrobina e azoxistrobina + benzovindiflupir apresentaram isolados considerados sensíveis à estes ingredientes ativos. E apenas o produto trifloxistrobina + tebuconazol apresentou isolados com alta sensibilidade.

Os produtos oxiclureto de cobre, calda sulfocálcica e calda bordalesa se mostraram bastante seletivos, apresentando todos os isolados com classificação insensível ou baixa sensibilidade (Tabela 2), são produtos considerados multissítios que possuem diferentes mecanismos de ação (FRAC, 2021). No entanto, estes produtos não podem ser considerados inócuos, pois exerceu efeito sobre alguns isolados, indicando que há efeito sobre as populações presentes no filoplano, ainda que este efeito seja baixo.

Nas Figuras 1A e 1B, pode-se observar este efeito inibitório sobre alguns isolados de leveduras, onde 60% e 100% dos isolados de *C. albicans*, 16,6% e 33,3% dos isolados de *R. glutinis* e 25% e 50% dos isolados de *S. johnsonii* foram inibidos para os produtos oxiclureto de cobre e calda sulfocálcica, respectivamente. Ainda 50% dos isolados de *C. laurentii* sofreram algum grau de inibição para ambos os produtos e o isolado de *S. roseus* foi inibido apenas para o oxiclureto de cobre. No entanto, ainda que tenham diferido no tamanho de inibição entre si para os tratamentos oxiclureto de cobre e calda sulfocálcica, todos isolados de leveduras apresentaram halo inibitório não superior a 4 mm.

Esses resultados enfatizam a possibilidade de uso destes produtos em sistemas de agricultura orgânica conforme Instrução Normativa nº 46 do MAPA (2011), por serem produtos mais seletivos aos inimigos naturais presentes na superfície das plantas, levando a menor desequilíbrio dos ambientes agrícolas.

O produto composto de trifloxistrobina + tebuconazol é considerado o menos seletivo dentre os produtos testados, apresentando oito isolados (21,6%) com alta sensibilidade ao produto químico, com elevada inibição do crescimento. O mesmo também apresentou quatro (10,8%) dos isolados como sensíveis e sete (18,9%) deles com baixa sensibilidade (Tabela 2). Na Figura 1C observa-se o efeito do produto sobre cada isolado, onde 12 isolados apresentaram-se com efeito inibitório superior e sete isolados com efeito intermediário de acordo com o teste de médias Scott-Knott. Considerando os isolados com efeito inibitório superior e intermediário nota-se que todos os isolados de *C. albicans* e *P. guilhermondi*, 66,6% dos isolados de *C. laurentii*, 50% dos isolados de *S. johnsonii* e *Z. hellenicus*, 25% dos isolados de *R. aurantiaca* e 16,6 % dos isolados de *R. glutinis* apresentam algum grau de inibição pelo produto químico, comprovando a sua baixa seletividade aos organismos não-alvos.

Já o produto composto por bixafem + protioconazol + trifloxistrobina não apresentou nenhum isolado com alta sensibilidade, mas apresentou três (8,1%) dos isolados como sensíveis ao fungicida e sete (18,9%) isolados com baixa sensibilidade (Tabela 2), e ao observar a Figura 1D percebe-se dois isolados com efeito inibitório superior e 12 isolados com efeito intermediário de acordo com o teste de médias Scott-Knott. Considerando os isolados com

efeito superior e intermediários, todos os isolados de *S. johnsonii* e *S. roseus*, 60% dos isolados de *C. albicans*, e 50% dos isolados de *C. laurentii*, 33,3% dos isolados de *R. glutinis* e 16,6% dos isolados de *Z. hellenicus* apresentaram algum tamanho de inibição.

Ambos os produtos químicos (trifloxistrobina + tebuconazol e bixafem + protioconazol + trifloxistrobina) possuem eficiência para controle de um amplo espectro de grupos fúngicos, atuando sobre a inibição da respiração e da biossíntese de esterol em membranas (FRAC, 2021). Estes produtos químicos não são seletivos, pois embora possuem isolados com baixa sensibilidade, estão exercendo efeitos negativos sobre um número elevado de isolados e de diferentes espécies de leveduras.

O produto fluxapiroxade + piraclostrobina apresentou apenas três isolados (8,1%) com baixa sensibilidade e o restante como insensível. Já o produto fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir afetou negativamente apenas dois dos isolados (5,4%), que se apresentaram sensíveis ao produto, o restante mostrou-se como insensível (Tabela 2). Ao observar as Figuras 1E e 1F nota-se que ambos os produtos fluxapiroxade + piraclostrobina e azoxistrobina + benzovindiflupir apresentaram três e dois isolados com efeito superior, respectivamente, de acordo com o teste de médias Scott-Knott. Esses isolados correspondem à apenas 33,3% dos isolados de *C. laurentii* e 20% de *C. albicans* para o produto fluxapiroxade + piraclostrobina, enquanto que para o produto azoxistrobina + benzovindiflupir, 16,6% e 25% dos isolados de *C. laurentii* e *S. johnsonii*, respectivamente. Resultados que comprovam a alta seletividade e baixa toxicidade destes produtos em relação aos organismos não alvos, onde a maioria das espécies de leveduras não apresentaram nenhuma inibição.

Dessa forma, ambos os produtos (fluxapiroxade + piraclostrobina e azoxistrobina + benzovindiflupir) podem ser considerados seletivos, pelo baixo dano sobre a comunidade de leveduras, embora ainda tenha efeitos negativos sobre alguns isolados. O baixo dano encontrado pode ser justificado pelo único mecanismo de ação dos produtos, que embora tenham dois princípios ativos diferentes, ambos estão atuando somente sobre a inibição da respiração (FRAC, 2021).

Os resultados demonstrados na Tabela 2 e na Figura 1 se assemelham, supondo que o sistema de classificação proposto na Tabela 1 seja eficiente para se mensurar o efeito inibitório dos produtos fungicidas sobre as leveduras.

Conforme Sumbly et al. (2021) frequentemente quando a resistência, no caso a insensibilidade, se desenvolve a um produto químico em um grupo, os fungos tendem a ser resistentes a outros produtos químicos deste mesmo grupo. O que é observado no ensaio, onde os fungicidas ainda que com princípios ativos diferentes, atuantes sobre o mesmo mecanismo

de ação e pertencentes aos mesmos grupos, possuem efeitos semelhantes sobre o número de isolados observados. No entanto, os isolados de leveduras possuem comportamentos diferentes com relação aos produtos, onde um mesmo isolado pode ser altamente inibido para um produto químico e insensível para outro produto do mesmo mecanismo de ação (Figura 1).

Percebe-se que os produtos com mais de um mecanismo de ação, atuando sobre diferentes sítios alvos obtiveram maiores efeitos sobre os isolados, sugerindo que os produtos atuantes sobre um único mecanismo de ação, mas com sítios alvos diferentes sejam mais seletivos, embora não sejam inócuos. No entanto, em se tratando de controle de doenças a nível de campo nas principais culturas agrícolas, os melhores resultados têm sido encontrados ao utilizar produtos compostos com mais de um mecanismo de ação.

De modo geral, todos os isolados de *Z. hellenicus* são insensíveis aos produtos multissítios e misturas de carboxamidas e estrobilurinas, sendo inibidos apenas pelos produtos contendo triazóis. Já os isolados de *R. aurantiaca*, *Pichia* spp. também são insensíveis aos mesmos produtos, além do produto composto por carboxamida, estrobilurina e triazol. O isolado de *S. roseus* é insensível a todos produtos, há exceção do oxiclreto de cobre. Os isolados de *R. glutinis* são insensíveis as duas misturas de carboxamidas e estrobilurinas, mas a *C. albicans* e *S. johnsonii* são insensíveis para apenas uma mistura de carboxamida e estrobilurina, sendo azoxistrobina + benzovindiflupir para *C. albicans* e fluxaproxade + piraclostrobina para a *S. johnsonii*. Além disso, todos os isolados de todas as espécies são considerados insensíveis a calda bordalesa (Figura 1).

Em relação aos produtos químicos, pode-se constatar que os produtos compostos por uma mistura de estrobilurinas e carboxamidas se mostraram menos tóxicos as leveduras. Enquanto, os produtos contendo ingrediente ativo do grupo dos triazóis se mostraram com maior toxicidade. Semelhante ao trabalho de Kucharska, Wachowska e Czaplicki (2020) avaliando produtos compostos por triazóis, onde os produtos compostos por triazóis e benzimidazóis se mostraram mais tóxicos e aquele que possuía mistura de estrobilurina e triazol foi o que apresentou a menor toxicidade para as leveduras. A maior toxicidade encontrada em ambos os trabalhos, deve-se ao produto do grupo químico dos triazóis.

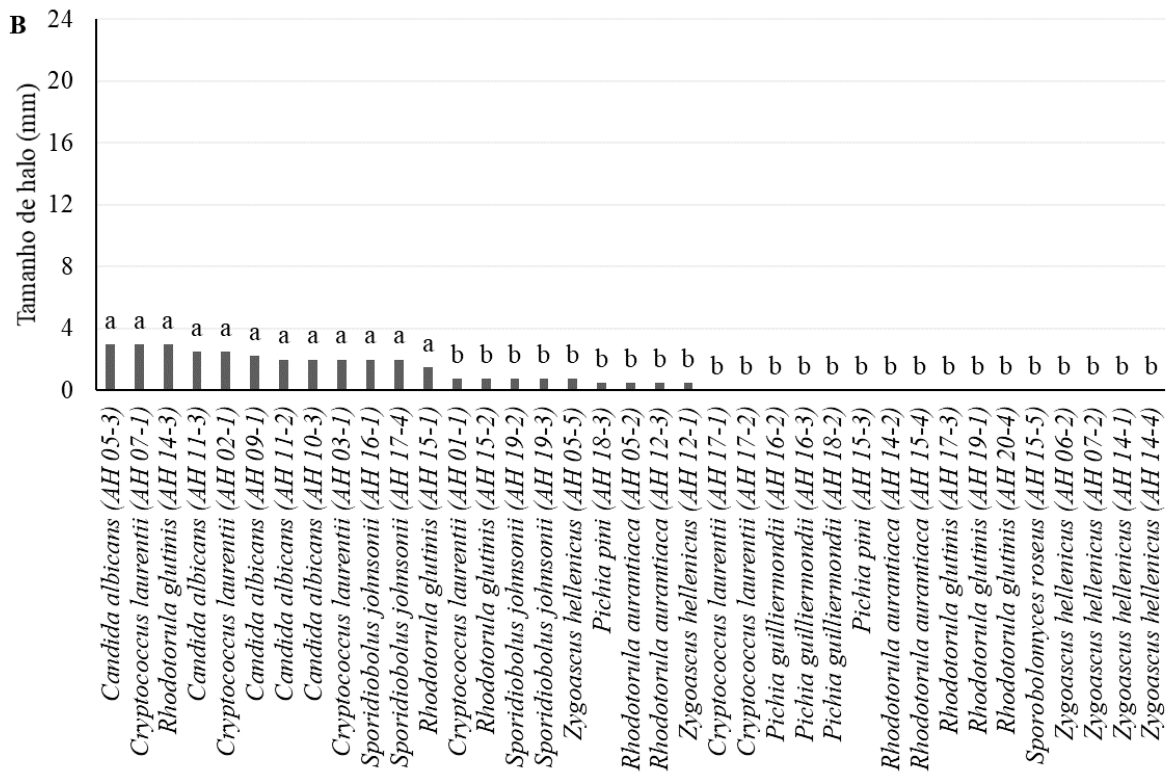
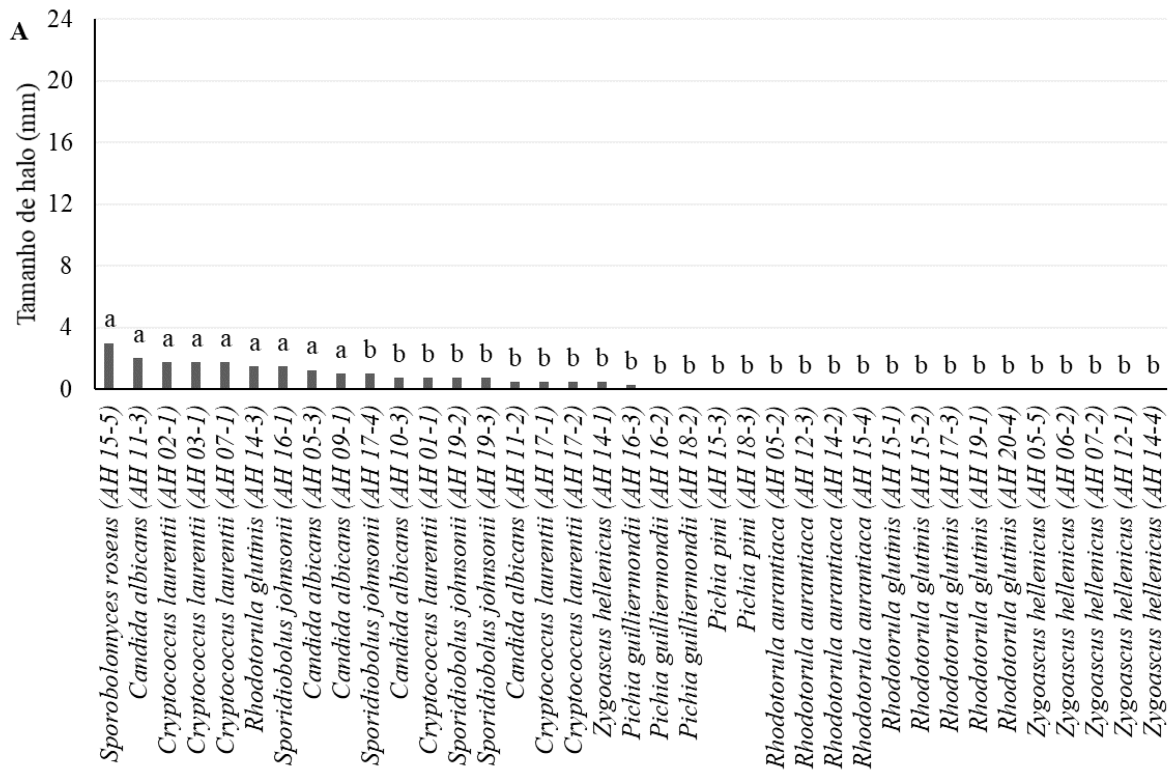
Os produtos do grupo químico dos triazóis (tebuconazol e prothioconazol) atuam sobre a inibição da síntese de esterol em membranas (REIS; REIS; FORCELINI, 2007). Os esteróis são importantes reguladores das propriedades físicas da membrana plasmática, como a fluidez e a permeabilidade, e um importante esterol responsável por manter a estrutura e a função da membrana plasmática é o ergosterol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A atuação dos triazóis sobre a enzima esterol 14 $\alpha$ -demetilase leva a inibição da formação de precursores do

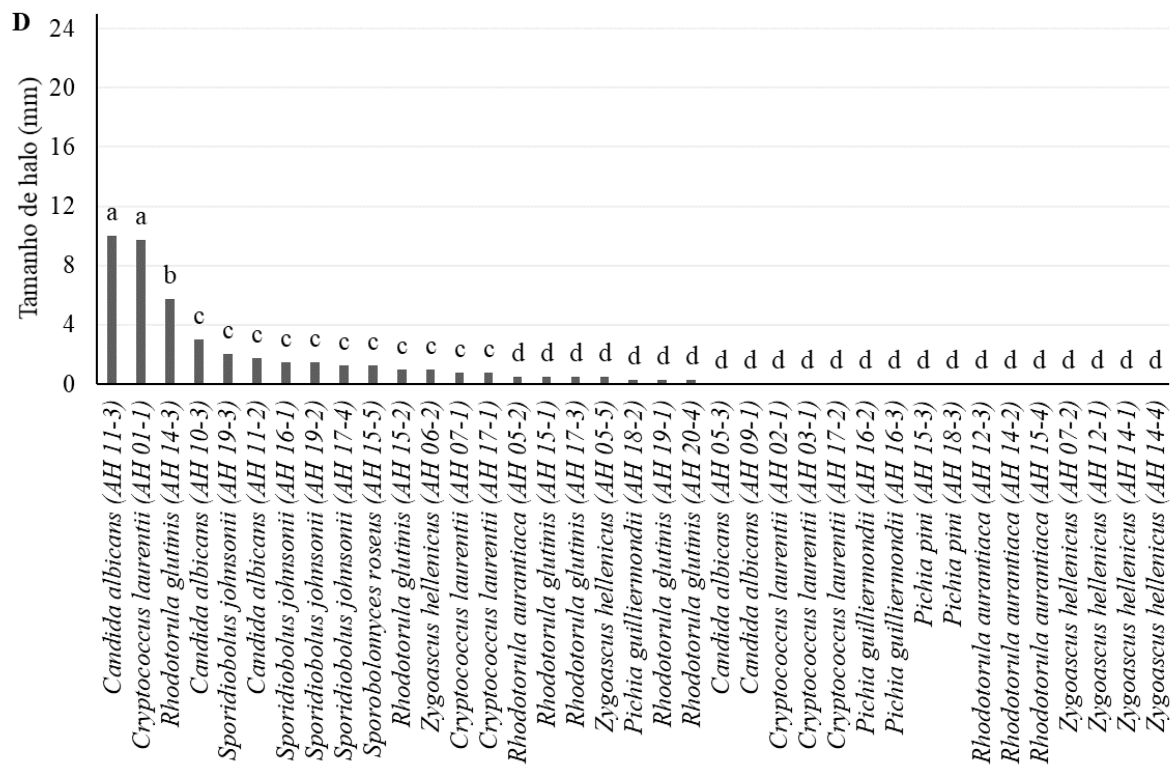
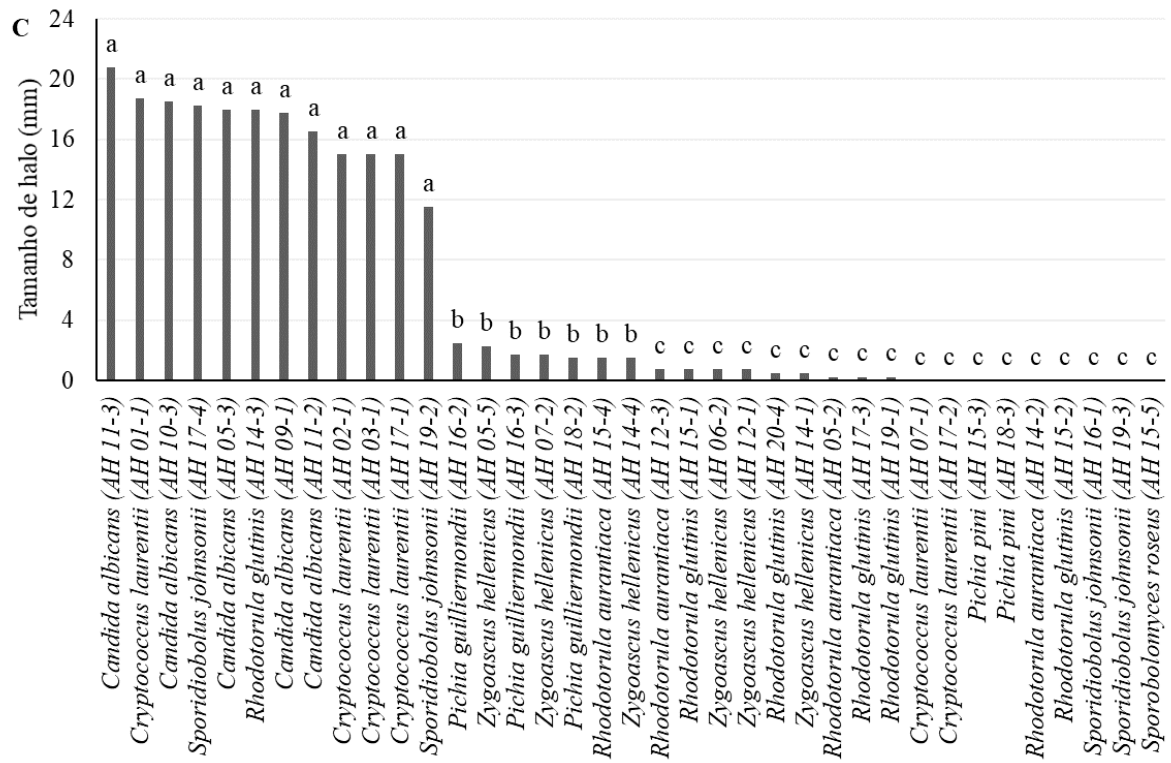
ergosterol, levando a uma alteração na permeabilidade e formação da membrana, além de levar as células ao colapso. Alterações na permeabilidade da membrana facilitam a entrada e saída de água e de agentes nocivos à célula, o que pode justificar a baixa seletividade dos produtos trifloxistrobina + tebuconazol e bixafem + protioconazol + trifloxistrobina, contendo ingredientes ativos dos triazóis, às leveduras. A inibição da formação do ergosterol, nestes casos, pode ainda ter facilitado a entrada dos outros produtos fungicidas presentes nas misturas para atuarem nas demais organelas, como as mitocôndrias, levando um maior número de isolados de leveduras à inibição.

As estrobilurinas (azoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina), por sua vez, atuam na inibição do complexo citocromo bc1 (complexo III), dentro das mitocôndrias, onde a ligação de um inibidor ao sítio da quinona oxidase bloqueia a transferência de elétrons no complexo III. Enquanto as carboxamidas (bixafem, fluxapiraxade e benzovindiflupir) atuam no complexo succinato-dehidrogenase (complexo II), impedindo a oxidação de succinato para fumarato no complexo II, também afetando a cadeia de transporte de elétrons (REIS; REIS; FORCELINI, 2007). Ambas atuam no processo da respiração na mitocôndria, afetando também a síntese de energia (ATP - adenosina trifosfato), por consequência, a inibição leva a morte das células (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os produtos compostos por estrobilurinas e carboxamidas por atuarem a nível de mitocôndria, estão sujeitos a dificuldade de penetração impostas pelas membranas, tanto celular como mitocondrial, além da ação dos componentes receptores que podem identificar e/ou detoxificar essas moléculas antes da penetração, o que pode ter reduzido a ação destes agentes nocivos sobre os isolados de leveduras no presente trabalho.

Cadez, Zupan e Raspor (2010) notaram que nenhum dos fungicidas de outros grupos químicos como dicarboximida, fenilpirrol e anilinopirimidina, afetou significativamente a abundância de diferentes espécies de leveduras. Indicando que estes fungicidas possam ser considerados seletivos e devem ser utilizados no controle de doenças em oposição aos produtos com maior toxicidade encontrados no trabalho, como é o caso dos triazóis.







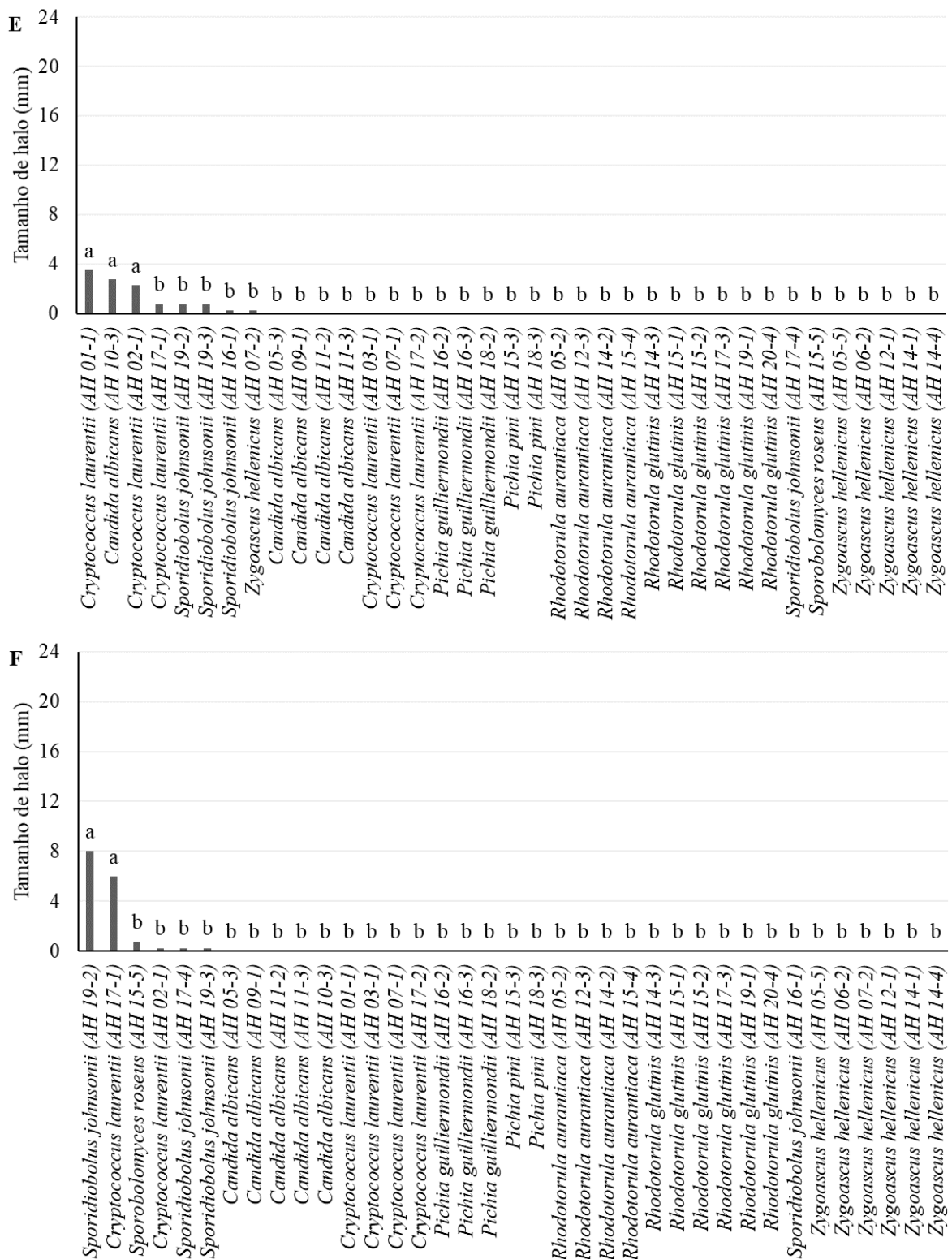


Figura 1. Tamanho de halo de inibição (mm) de isolados de leveduras quando em contato com os tratamentos, onde em A: oxiclureto de cobre\*, em B: calda sulfocálcica\*, em C: trifloxistrobina + tebuconazol\*, em D: bixafem + protioconazol + trifloxistrobina\*, em E: fluxapiroxade + piraclostrobina\*, em F: azoxistrobina + benzovindiflupir\*. Os tratamentos controle e calda bordalesa não apresentaram significância entre os isolados de leveduras (dados não mostrados). Dados transformados utilizando a equação:  $\sqrt{(X+0,5)}$ . Coeficiente de variação (CV) = 48,07%. \* Isolados de leveduras seguidos de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Wachowska, Irzykowski e Jedryczka (2018) ao estudarem o efeito de agroquímicos sobre leveduras que colonizam grãos de trigo observaram que as comunidades de leveduras presentes nos grãos dependem da quantidade de fungicidas usados nas atividades agrícolas, exercendo efeitos inibitórios variados sobre os isolados, refletindo na qualidade final do grão. Cadez; Zupan e Raspor (2010) também observaram em um experimento *in vitro* que a aplicação de fungicidas nas concentrações recomendadas pelos fabricantes reduziu seletivamente as comunidades microbianas de bagas de uva. Ainda, Kosel; Raspor e Cadez (2019) concluíram que os resíduos de fungicidas prejudicaram a viabilidade de isolados de leveduras desejáveis e promoveram o crescimento de vários isolados deteriorantes e, portanto, resultando em um impacto negativo no aroma do vinho. Os resultados descritos afetam negativamente na qualidade do produto e como entende-se que estes produtos passam por processos de fermentação para obtenção de pão no caso do trigo e sucos e/ou vinhos no caso da uva, uma redução na composição microbiana afete negativamente no processo fermentativo, reduzindo a qualidade do produto final. Assim, supõem-se que alterações na qualidade dos produtos possam ser oriundas devido à redução e/ou alteração das comunidades microbianas colonizadoras dos tecidos vegetais devido a ação e/ou presença de resíduos de fungicidas.

Ainda, a inibição de um maior número de microrganismos habitantes da superfície foliar pode levar a desequilíbrios da microflora de modo severo podendo um agente fitopatogênico ter maior espaço para desenvolvimento e vir a causar doença nos tecidos vegetais, principalmente, quando os microrganismos afetados foram extintos ou possuem desenvolvimento mais lento levando mais tempo para recolonizar a superfície. Conforme Ghini (1991), a redução da microflora saprofítica, oportuniza o desenvolvimento de novos patógenos ou patógenos de plantas anteriormente considerados secundários, da mesma forma, os patógenos que são resistentes ao fungicida, provavelmente, se beneficiarão com a redução da microflora epifítica, causando o aumento da incidência e/ou severidade da doença.

Observando-se a sensibilidade das leveduras aos produtos nota-se que as espécies possuem comportamentos diferentes quanto ao produto utilizado, sendo que a maior frequência de isolados de leveduras se apresentaram como insensíveis aos produtos fungicidas. Kucharska, Wachowska e Czaplicki (2020) também observaram que os isolados de levedura diferiram quanto à sensibilidade aos fungicidas analisados no teste de difusão em disco. Esta informação traz uma reflexão importante no sentido de que embora os produtos químicos testados tenham um amplo espectro de ação, agindo sobre uma infinidade de microrganismos e os levando a morte, uma parcela considerável dos microrganismos não são afetados por estes produtos. O

que pode estar relacionado a diversidade genética entre os isolados de leveduras, onde pode haver presença de resistência e/ou degradação das moléculas.

As leveduras utilizadas no ensaio são provenientes de isolamento em folhas e flores de diversas plantas realizado por Heling (2016), em especial de área em que não houve registros de uso de defensivos agrícolas em anos anteriores. Assim, quando estas foram submetidas ao contato com alguns fungicidas rotineiramente utilizados percebe-se que grande parte é insensível a ação destes produtos, podendo ser importantes ferramentas para o uso como agentes de controle biológico, principalmente em sistemas convencionais, onde o controle biológico tem sido utilizado com aplicações intercaladas com fungicidas.

Wachowska, Irzykowski e Jedryczka (2018) observaram que a maioria dos isolados de leveduras obtidos das plantas que foram protegidas com fungicidas são resistentes à maioria dos agroquímicos testados, sugerindo que as leveduras sofrem seleção apresentando formas resistentes quando expostas à pressão de seleção exercidas pelos agroquímicos. No entanto, este fato não é observado no estudo em questão, pois os isolados foram obtidos de ambientes sem aplicações anteriores de agroquímicos, o que sugere outro mecanismo atuante sobre estes isolados, sugerindo que a capacidade de detoxificar as moléculas fungicidas está presente nas populações de leveduras não sujeitas a pressão de seleção.

Diante do exposto, deve-se dar continuidade aos estudos no que remete a eficiência dos isolados de leveduras insensíveis aos fungicidas no controle de doenças em diferentes patossistemas, buscando compreender os mecanismos que levam a expressão da insensibilidade, para que estes isolados possam ser alternativas e/ou aliados ao controle químico no manejo de doenças, objetivando a redução da aplicação dos produtos químicos não seletivos e a manutenção dos inimigos naturais nos sistemas agrícolas.

## **Conclusão**

As leveduras apresentam insensibilidade à maior parte dos produtos fungicidas testados, no entanto, algumas espécies apresentam significativa sensibilidade à produtos fungicidas contendo princípio ativo do grupo dos triazóis.

## **Referências**

CADEZ, N.; ZUPAN, J.; RASPOR, R. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. **FEMS Yeast Research**, Cork, v. 10, i. 5, p. 619-630, aug, 2010.

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

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. **FRAC code list 2021**: fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). 2021. Disponível em: [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2). Acesso em: 11 fev. 2022.

GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. p. 201-217.

GONÇALVES, F. J.; ARAUJO, L. G.; SILVA, G. B.; FILIPPI, M. C. C. Controle químico da brusone em arroz de terras altas: efeitos nos fungos não alvos do filoplano. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 77-81, 2012.

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**. Viçosa: Editora UFV, 2016. cap. 3, p. 93-105.

GOSWAMI, S.; GOEL, N.; MAJUMDAR, R. S. Phylloplane microbes impact host physiology: a review. **Journal of Plant Protection Research**, Poznan, v. 61, n. 3, p. 213-221, sep. 2021.

HELING, A. L. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial de leveduras como agentes de proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum**. 2016. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2016.

KARLSSON, I.; FRIBERG, H.; STEINBERG, C.; PERSSON, P. Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere. **Plos One**, v. 9, i. 11, p. 1-12, nov. 2014.

KOSEL, J.; RASPOR, P.; CADEZ, N. Maximum residue limit of fungicides inhibits the viability and growth of desirable non-Saccharomyces wine yeasts. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Milton, v. 25, i. 1, p. 43 -52, jan. 2019.

KUCHARSKA, K.; WACHOWSKA, U.; CZAPLICKI, S. Wheat phyllosphere yeasts degrade propiconazole. **BMC Microbiology**, v. 20, i. 242, p. 1-14, aug. 2020.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46 de 6 de outubro de 2011**. 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf/view>. Acesso em: 11 fev. 2022.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: volume 1 - Princípios e Conceitos. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. cap. 17, p. 261-274.

PERREAULT, R.; LAFOREST-LAPOINTE, I. Plant-microbe interactions in the phyllosphere: facing challenges of the anthropocene. **The ISME Journal**, London, v. 16, p. 339-345, sep. 2022.

REIS; E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 5ed. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 153p., 2007.

SUMBY, K. M., CALIANI, N. S., JIRANEK, V. Yeast diversity in the vineyard: how it is defined, measured and influenced by fungicides. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Milton, v. 27, i. 2, p. 169–193, jan. 2021.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 934p., 2012.

WACHOWSKA, U.; IRZYKOWSKI, W.; JEDRYCZKA, M. Agrochemicals: Effect on genetic resistance in yeasts colonizing winter wheat kernels. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Plymouth, v. 162, p. 77-84, oct. 2018.

WALTER, M.; FRAMPTON, C. M.; BOYD-WILSON, K. S. H.; HARRIS-VIRGIN, P.; WAIPARA, N. W. Agrochemical impact on growth and survival of non-target apple phyllosphere microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, i. 1, p. 45-55, jan. 2007.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

As leveduras apresentaram potencial para controle da antracnose em plantas de soja. No estudo constatou-se que 85% dos isolados de leveduras, sendo todos os isolados de *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp., *Zygoascus hellenicus* e *Sporidiobolus johnsonii* e 50% dos isolados de *Cryptococcus laurentii* e *Candida albicans* foram eficientes na redução severidade da antracnose em soja em condições de casa de vegetação.

Por outro lado, verificou-se que cada isolado de levedura pode contribuir de forma diferente na indução de enzimas relacionadas à defesa vegetal, isto porque nenhuma das oito leveduras selecionadas induziu aumento no teor de proteínas solúveis e não promoveram incrementos na atividade de fenilalanina amônia-liase. Mas apenas o isolado *R. aurantiaca* (AH 12-3) apresentou efeito *priming* incrementando a atividade de peroxidase após a inoculação do patógeno, neste caso, sugerindo a eficácia da indução de resistência. Enquanto, o isolado *Z. hellenicus* (AH 06-2) induziu atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase com o tratamento, mas inibiu a atividade de peroxidase com a chegada do patógeno, sugerindo a alteração na expressão das enzimas pela planta de acordo com a interação à que é submetida, para evitar gastos metabólicos desnecessários e a resposta mais rápida de defesa. Além disso, a indução de resistência pode não ser o principal mecanismo de ação atuante de algumas das leveduras estudadas na redução da doença. Dessa forma, supõem-se que exista a complementariedade na indução de resistência e de outros mecanismos de defesa da planta, quando um conjunto de diferentes espécies e isolados de leveduras estejam atuando simultaneamente.

As leveduras *Zygoascus hellenicus*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Pichia* spp. e *Sporobolomyces roseus* apresentaram insensibilidade a maior parte dos produtos fungicidas testados, enquanto a levedura *Cryptococcus laurentii* foi inibida em algum grau por todos os produtos, há exceção da calda bordalesa. Ainda, os produtos compostos por uma mistura de estrobilurinas e carboxamidas, atuantes sobre apenas um mecanismo de ação, a inibição da respiração, e os produtos multisítios se mostraram menos tóxicos as leveduras, já os produtos fungicidas contendo ingrediente ativo do grupo dos triazóis, atuantes sobre a inibição da síntese de esterol em membranas, se mostraram com maior toxicidade.

Dessa forma, o estudo mostra que o uso de leveduras para o controle de doenças em culturas agrícolas pode ser alternativa e/ou aliada ao controle com produtos fungicidas, desde que observadas algumas restrições. Assim, as leveduras *Rhodotorula aurantiaca*, *Zygoascus hellenicus* e *Pichia* spp. mostram-se alternativas promissoras para o manejo da antracnose em soja, pois promoveram a redução da severidade da doença em níveis significativos e não são



inibidas pelos produtos fungicidas que não possuem princípios ativos do grupo dos triazóis em sua composição. E ainda, a indução de resistência pela síntese de peroxidase pela levedura *R. aurantiaca* (AH 12-3) e o aumento na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase para *Z. hellenicus* (AH 06-2), podem ser um dos mecanismos de ação utilizados para o controle da doença.

Em contrapartida, as leveduras *Cryptococcus laurentii* e *Candida albicans* não são indicadas para o manejo da antracnose em soja, pois alguns isolados não promoverem a redução da severidade da doença ou são sensíveis a maioria dos produtos fungicidas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENGBAWY, A.; ABDELKHALEK, S. T.; QURESHI, S. R.; WANG, M. Q. Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: ecological risks and human health implications. **Toxics**, Basel, v. 9, i. 3, n. 42, p. 1-33, 2021.

BOUFLEUR, T. R.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; TIKAMI, I.; ROGERIO, F.; THON, M. R.; SUKNO, S. A.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; BARONCELLI, R. Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 22, i. 4, p. 393-409, feb. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **AGROFIT - Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 11 fev. 2022.

CHEN, S. N.; LUO, C. X.; HU, M. J.; SCHNABEL, G. Sensitivity of *Colletotrichum* species, including *C. fioriniae* and *C. nymphaeae*, from peach to demethylation inhibitor fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 12, p. 2434-2441, dec. 2016.

CHEN, S.; WANG, Y.; SHCNABEL, G.; PENG, C. A.; LAGISHETTY, S.; SMITH, K.; LUO, C.; YUAN, H. Inherent resistance to 14 $\alpha$ -demethylation inhibitor fungicides in *Colletotrichum truncatum* is likely linked to CYP51A and/or CYP51B gene variants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 108, n. 11, p. 1263-1275, nov. 2018.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, 4º levantamento, safra 2021/2022, v. 9, n. 4, jan. 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 01 fev. 2022.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. cap. 10, p. 227-277.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 1, p. 18-23, 2016.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11 p. (Special Report, 80).

FREIMOSER, F. M.; RUEDA-MEJIA, M. P.; TILOCCA, B.; MIGHELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 35, n. 154, p. 1-19, oct. 2019.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. Doenças da Soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**: volume 2 - Doenças das Plantas Cultivadas. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. cap. 67, p. 657-675.

GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de doenças na cultura da soja. In: PITOL, C.; GITTI, D. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; LOURENÇÃO, A. L. F.; MELOTTO, A. M. **Tecnologia e produção: soja 2014/2015**. Curitiba: Midiograf, cap. 8, p. 134-156, 2015.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

HERNANDEZ-MONTIEL; L. G.; DROBY, S.; PRECIADO-RANGEL, P.; RIVAS-GARCÍA, T.; GONZÁLEZ-ESTRADA, R. R.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P.; ÁVILA-QUEZADA, G. D. A sustainable alternative for postharvest disease management and phytopathogens biocontrol in fruit: antagonistic yeasts. **Plants**, Basel, v. 10, i. 12, n. 2641, p. 1-12, dec. 2021.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: volume 1 - Princípios e Conceitos. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. cap. 17, p. 261-274.

MELLO, S. C. M.; ECKSTEIN, B.; MARQUES, E.; CARVALHO, D. D. C. Controle de doenças de plantas. In: FONTES, E. M. G.; VALADORES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. cap. 10, p. 291-325.

NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; MERTZ-HENNING, L. M.; FOLONI, J. S. S.; MORAES, L. A. C.; GONÇALVES, S. L. Ecofisiologia da soja. In: SEIXAS,

C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. cap. 2, p. 33-54.

NOGUEIRA, A. P. O.; SEDIYAMA, T.; BARROS, H. B.; TEIXEIRA, R. C. Morfologia, crescimento e desenvolvimento. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologia de produção e usos da soja**. 1ed. Londrina: Mecenias, 2009. cap. 2, 314 p.

OLIVEIRA, A. V.; RABELO, P. R.; PORTES, C. S.; COELHO, A. R. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por leveduras killer visando aplicação em morangos pós-colheita. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 13, n. 3, 2011.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: volume 1 - Princípios e Conceitos. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. cap. 35, p. 423-452.

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

RAMOS, D. M. B.; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Inibição in vitro de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). **Acta Scientiarum - Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 397-402, set. 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. **Indução de resistência em plantas a patógenos**, Maringá: UEM/MPA, 2014. 272 p.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita**. 1ed. Viçosa: UFV, 2015. 333p.

SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; GODOY, C. V.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; DIAS, W. P.; ALMEIDA, A. M. R. Manejo de doenças. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. cap. 10, p. 227-264.

SHARMA, S. K.; GUPTA, G. K.; RAMTEKE, R. *Colletotrichum truncatum* [(Schw.) Andrus & W.D.Moore], the causal agent of anthracnose of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] – A review. **Soybean Research**, Indore, v. 9, p. 31-52, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 934p., 2012.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, cap. 2, p. 41-56.

YANG, H; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. Multiplex real-time PCR detection and differentiation of *Colletotrichum* species infecting soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, p. 1559-1568, nov. 2015.

ZAMBOLIN, L.; CHAVES, G. M. Conceito de doenças em plantas. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. **O essencial da fitopatologia: agentes causais**. Viçosa: UFV, 2012. cap. 1, p. 1-18.

ZHANG, C.; DIAO, Y.; WANG, W.; HAO, J.; IMRAN, M.; DUAN, H.; LIU, X. Assessing the risk for resistance and elucidating the genetics of *Colletotrichum truncatum* that is only sensitive to some DMI fungicides. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 1779, sep. 2017.

ZHANG, X.; LI, B.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; TIAN, S. Antagonistic yeasts: a promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. **Journal of Fungi**, Basel, v. 6, i. 3, n. 158, p. 1-15, aug. 2020.