

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARIANA FERREIRA SAAB

Leveduras como antagonistas à fitopatógenos da soja e indutor de resistência

Maringá
2018

MARIANA FERREIRA SAAB

Leveduras como antagonistas à fitopatógenos da soja e indutor de resistência

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S111L

Saab, Mariana Ferreira

Leveduras como antagonistas à fitopatógenos da soja e indutor de resistência / Mariana Ferreira Saab. -- Maringá, PR, 2018.

xii, 84 f.

Orientadora: Profa. Dra. Katia Regina Freitas Schwan-Estrada.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2018.

1. Soja - Controle biológico. 2. Indução de resistência em plantas. 3. Soja - Doenças - Controle. I. Schwan-Estrada, Katia Regina Freitas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós- Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 23.ed. 633.34

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA FERREIRA SAAB

Leveduras como antagonistas à fitopatógenos da soja e indutor de resistência

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Agronomia:
em 23 de Fevereiro de 2018.

COMISSÃO JULGADORA

PhD. Dr. Mário Serrano

Dra. Maria Balbi Peña

Dra. Edilaine Grabicoski

PhD. Dra. Rosane Freitas Schwan

Dr. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Nasser Saab (*in memoriam*) e Marlene Ferreira Saab pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido meu sol e escudo e por alcançar-me com sua bondade a cada manhã.

À professora Kátia Regina Freitas Schwam-Estrada, pela oportunidade e por tornar-me mais que uma aluna, mas também filha.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e seus professores, por tornarem possível a concretização desta etapa.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior, pela bolsa de estudo.

À minha família Pai Nasser (*in memoriam*), Mãe Marlene, Davi, Steffany, Flávio, Nayana e Lucas Silvério, por estimularem a realização do doutorado.

À minha Pastora Márcia, amigas Eledir e Dileuza, tia Cleuza e tio Zilmar (*in memoriam*), pelas orações e conselhos.

Aos amigos Reinaldo, Érika, Vilma, Regianne e Fabianne e companheiros de laboratório Virlene, Carolina Bertuzzi, Janaina, Jéssica, Larisse, Clei, Danilo, Vinícius, Lilianne, Juliana e Antônio, pelo carinho de sempre.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

Leveduras como antagonistas à fitopatógenos da soja e indutor de resistência

RESUMO GERAL

A soja representa, no nível mundial, o papel de principal oleaginosa produzida e consumida. Entre os fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças, como consequência, sobretudo, da monocultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de três leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* para o controle de fitopatógenos da soja causadores de Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), Mancha alvo (*Corynespora cassiicola*) e Podridão radicular de fitóftora (*Phytophthora sojae*). Assim, foram realizados experimentos *in vitro* para avaliar o crescimento micelial dos patógenos sob efeito do fermentado produzido pelas leveduras e *in vivo* avaliou-se a atividade de enzimas relacionadas à patogênese e ao acúmulo de fitoalexinas. Em casa de vegetação avaliou-se a severidade de plantas de soja inoculadas com *C. cassiicola* e variáveis de crescimento e trocas gasosas em plantas inoculadas e não inoculadas. Adicionalmente, realizou-se análise quantitativa em tempo real da PCR dos genes marcadores de ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), para detectar se o filtrado produzido pela levedura *H. opuntiae* induz respostas de defesa através dessas vias de sinalização em plantas de *Arabidopsis thaliana*, considerada planta modelo para estudo da expressão gênica. Os isolados de *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* foram eficientes em reduzir o crescimento micelial de *C. cassiicola*, *S. sclerotiorum* e *P. sojae*. *S. cerevisiae* destacou-se na dose de 25 % ao estimular maiores reduções do crescimento micelial dos fitopatógenos. Os fermentados produzidos por *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* mostraram-se efetivos na indução da atividade das enzimas peroxidase, catalase e glucanase, especialmente 12 e 48 horas após a aplicação dos tratamentos. *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* também apresentaram potencial em induzir a produção de gliceolina e deoxiantocianidina. A levedura *S. cerevisiae* destacou-se das demais em casa de vegetação, apresentando menor severidade, porém não superou o fungicida, assim como estimulou maior crescimento, especialmente em plantas não inoculadas. O teor de clorofila foi semelhante entre as leveduras e superior aos controles em plantas inoculadas. Plantas tratadas com fermentado de *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* apresentaram menor concentração interna de CO₂

(Ci), e maior relação transpiração/condutância estomática (E/g_s). O filtrado de *H. opuntiae* proporcionou a indução das respostas defensivas dependentes de SA, ET e JA.

Palavras-chave: *Glycine max.* Doenças. Controle biológico. Mecanismos de defesa. Ativação gênica.

Yeast as antagonists to soybean phytopathogens and resistance

ABSTRACT

Soybeans represent, at the world level, the main oleaginous role produced and consumed. Among the factors limiting the achievement of high yields in soybeans are diseases, as a consequence, above all, of monoculture. The objective of this work was to evaluate the potential of three yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* and *Lachancea thermotolerans*, for the control of soybean phytopathogens that cause White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*), Target spot (*Corynespora cassiicola*) and Phytophthora root rot (*Phytophthora sojae*). Thus, in vitro experiments were performed to evaluate the mycelial growth of the pathogens under the effect of the fermentation produced by the yeasts and in vivo the activity of enzymes related to pathogenesis and accumulation of phytoalexins was evaluated. In greenhouse the severity of soybean plants inoculated with *C. cassiicola* and growth and gas exchange variables were evaluated in inoculated and non-inoculated plants. In addition, real-time quantitative PCR analysis of salicylic acid (AS), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) marker genes was performed to detect whether the filtrate produced by yeast *H. opuntiae* induces defense responses through these signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* plants, considered a model plant for the study of gene expression. The isolates of *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* and *H. opuntiae* were efficient in reducing the mycelial growth of *C. cassiicola*, *S. sclerotiorum* and *P. sojae*. *S. cerevisiae* was noted at a dose of 25% by stimulating further reductions in the mycelial growth of phytopathogens. Ferments produced by *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* and *H. opuntiae* were effective in inducing peroxidase, catalase and glucanase enzymes, especially 12 and 48 hours after the treatments. *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* also had potential in inducing the production of glyce- linol and deoxythyanocyanidine. The yeast *S. cerevisiae* was distinguished from the others in greenhouse, presenting lower severity, but did not exceed the fungicide, as well as stimulated higher growth, especially in non-inoculated plants. Chlorophyll content was similar between yeasts and higher than controls in inoculated plants. Plants treated with fermented *S. cerevisiae* and *H. opuntiae* showed lower internal CO₂ concentration (CI), and higher transpiration / stomatal conductance (E / gs). The filtrate of *H. opuntiae* provided induction of the SA, ET and JA dependent defensive responses.

Keywords: Glycine max. Diseases. Biological control. Mechanisms of defense. Gene activation.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹, porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e número de esporos mL⁻¹ (NE) após 20 dias de incubação de *Corynespora cassiicola*, em função do desdobramento da interação entre isolados de levedura (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*) dentro das concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %).14

Tabela 2. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹, porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e número de escleródios (NE) após 20 dias de incubação de *Sclerotinia sclerotiorum*, em função do desdobramento da interação entre isolados de levedura (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*) dentro das concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %).16

Tabela 3. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹ e porcentagem de inibição do crescimento (PIC) de *Phytophthora sojae*, em função do desdobramento da interação entre isolados de levedura (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*) dentro das concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %).18

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Atividade específica da enzima peroxidase de guaiacol (absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24, 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.35

Tabela 2. Atividade específica da enzima catalase (absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24 e 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.36

Tabela 3. Atividade específica da enzima polifenoloxidase (absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24 e 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.36

Tabela 4. Atividade específica da enzima glucanase ($\text{mg glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24, 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.....37

Tabela 5. Atividade específica da enzima quitinase (absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (24 e 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.....37

Tabela 6. Produção de gliceolina em cotilédones de soja (absorbância 285 nm grama de massa fresca⁻¹), em hipocótilos de feijão (absorbância 280 nm grama de massa fresca⁻¹) e deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo (absorbância 480 nm grama de massa fresca⁻¹).....38

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Altura, em cm, de plantas de soja, em função do desdobramento da interação entre tratamentos e plantas inoculadas ou não com *Corynespora cassiicola*.....57

Tabela 2. Teor de clorofila (valores expressos em mg g^{-1} tecido fresco) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre tratamentos e plantas inoculadas ou não com *Corynespora cassiicola*..... 61

Tabela 3. Produtividade (expressa Kg ha^{-1}) e severidade (%) da das doenças Oídio, Crestamento foliar de cercospora e Ferrugem em soja.....61

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. (A) Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia^{-1} , (B) porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e (C) número de esporos mL^{-1} após 20 dias de incubação de *Corynespora cassiicola*, em função do desdobramento da interação entre as concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %) dentro dos isolados de levedura *L. thermotolerans* (- - -), *S. cerevisiae* (.....) e *H. opuntiae* (—).....15

Figura 2. (A) Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia^{-1} , (B) porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e (C) número de escleródios após 20 dias de incubação de *Sclerotinia sclerotiorum*, em função do desdobramento da interação entre as concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %) dentro dos isolados de levedura *L. thermotolerans* (- - -), *S. cerevisiae* (.....) e *H. opuntiae* (—).....17

Figura 3. (A) Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia^{-1} e (B) porcentagem de inibição do crescimento (PIC) de *Phytophthora sojae*, em função do desdobramento da interação entre as concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %) dentro dos isolados de levedura *L. thermotolerans* (- - - -), *S. cerevisiae* (.....) e *H. opuntiae* (—).....19

CAPÍTULO 3

Figura 1. Progresso da doença ao longo do tempo, 5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação do patógeno. Tratamentos seguidos de mesma letra minúscula, dentro de cada tempo de avaliação, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....56

Figura 2. Área abaixo da curva de progresso da doença. Tratamentos seguidos de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....57

Figura 3. Massa fresca (g) de parte aérea (A) e raiz (B) e massa seca (g) parte aérea (C) e raiz (D) em plantas de soja inoculadas e não inoculadas com patógeno. Tratamentos seguidos de mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) para desdobramento da interação dos tratamentos dentro de plantas inoculadas e não inoculadas. Tratamentos seguidos de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) para desdobramento da interação de plantas inoculadas e não inoculadas dentro dos tratamentos.....58

Figura 4. Efeito dos tratamentos sobre a (A) assimilação líquida de CO_2 (A), (B) transpiração (E), (C) condutância estomática (gs), (D) concentração interna de CO_2 (C_i), (E) carboxilação instantânea de CO_2 (A/C_i) e (F) relação transpiração/condutância estomática (E/gs) de plantas

de soja. Tratamentos seguidos de mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....60

CAPÍTULO 4

Figura 1. (A) Crescimento micelial de *B. cinerea* 72 hpi com diferentes doses do fermentado produzido por *H. opuntiae*. (B) Fotografias representativas do ensaio. As barras representam as médias de 5 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas, de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).....75

Figura 2. Tamanho das lesões em folhas de *A. thaliana* tratadas 24 h com diferentes doses do fermentado de *H. opuntiae* e medidas 72 hpi com *B. cinerea*. As barras representam as médias de 5 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas, de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).....76

Figura 3. Tamanho das lesões em folhas de *A. thaliana* induzidas por 24, 48, 72, 96 e 120 hpt com 50 % do fermentado de *H. opuntiae* e seguidas da inoculação com *B. cinerea*. As barras representam as médias de 8 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas, de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).....77

Figura 4. Tamanho das lesões em folhas de *A. thaliana* 72 hpi com *B. cinerea*. As folhas (local) e raízes (sistêmico) foram induzidas com 50 % do fermentado de *H. opuntiae*. As barras representam as médias de 8 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas, de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).....78

Figura 5. Análise da expressão de genes envolvidos nas rotas de defesa induzidas por AS (PR1 e ICS1), JA (PDF1.2), ET (ACS6 e PR4) e ROS (UPOX e ZAT12). Para normalizar a expressão, utilizou-se os genes constitutivos CF150 e At4g26410. Cada barra representa a média de duas réplicas.....79

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO 1	7
Atividade antagônica <i>in vitro</i> dos isolados de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> e <i>Lachancea thermotolerans</i> a patógenos causadores de doenças em soja.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 Cultivo das leveduras.....	12
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2	26
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> e <i>Lachancea thermotolerans</i> na indução de enzimas relacionadas à patogênese e ao acúmulo de fitoalexinas	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Cultivo das leveduras.....	30
2.2 Tratamento de plântulas de soja.....	30
2.3 Obtenção dos extratos proteicos	30
2.4 Análises bioquímicas	31
2.4.1 Quantificação de proteínas totais	31
2.4.2 Atividade de peroxidase de guaiacol (E C 1.11.1.7).....	31
2.4.3 Atividade de catalase (E C 1.11.1.6).....	31
2.4.4 Atividade da polifenoloxidase (E C 1.10.3.2).....	32
2.4.5 Atividade da β -1,3- glucanase (E C 3.2.1.6).....	32

2.4.6 Atividade da quitinase (E C 3.2.1.14)	32
2.4.7 Indução de fitoalexinas.....	33
3. RESULTADOS	35
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 3	47
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> e <i>Lachancea thermotolerans</i> no controle de fitopatógenos em casa de vegetação e a campo e seu efeito sobre o crescimento das plantas de soja.....	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Cultivo das leveduras e das plantas de soja	52
2.2 Inoculação do patógeno e severidade da doença	52
2.3 Efeito das leveduras no crescimento das plantas	53
2.4 Determinação de variáveis de trocas gasosas e teor de clorofila.....	53
2.5 Ensaio a campo	54
3.RESULTADOS	56
4.DISCUSSÃO	62
5.CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 4	68
Atividade de <i>Hanseniaspora opuntiae</i> no sistema planta-patógeno <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Botrytis cinerea</i>	68
RESUMO	69
ABSTRACT	70
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 Efeito in vitro do filtrado de <i>H. opuntiae</i> sobre <i>B. cinerea</i>	73
2.2 Material vegetal e inoculação com <i>B. cinerea</i>	73
2.3 Extração de RNA e RT-PCR	74

3. RESULTADOS	75
4. DISCUSSÃO	80
5. CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83

INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max*, L. Merrill) representa, no nível mundial, a principal oleaginosa produzida e consumida. Tal fato justifica-se pela importância do produto, tanto para o consumo animal através do farelo da soja quanto para o consumo humano através do óleo. No Brasil, a partir dos anos 1970, a produção da soja passou a ter grande relevância para o agronegócio, verificada pelo aumento da área cultivada no país. Embora a utilização de novas tecnologias tenha contribuído no decorrer desses anos para o aumento da produtividade, ainda existem muitos problemas fitossanitários que podem comprometer o rendimento de grãos (MAPA, 2014).

Entre os fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos estão as doenças, como consequência, sobretudo, da monocultura. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. Para Martins (2007), as doenças mais importantes são a ferrugem asiática, mofo-branco, mancha-alvo, oídio e o complexo de doenças de final de ciclo. Embora lance mão de diferentes estratégias de manejo, nenhuma dessas doenças diminuiu a importância de suas epidemias quando as condições do ambiente são favoráveis (FORCELINI, 2010).

A busca por alternativas para produzir alimentos sem resíduos de agroquímicos, com menor impacto ambiental, de maneira econômica, tem sido o desejo de muitos agricultores. O uso de produtos químicos para o controle de pragas e doenças é um método sedutor, pela sua simplicidade e resultados satisfatórios em curto prazo. Entretanto, as consequências do seu uso indiscriminado, como contaminação do ambiente e do próprio homem, além da ocorrência de fitopatógenos resistentes, têm despertado o interesse pela busca de outros meios de controle. Assim, o manejo fitossanitário apresenta-se como um importante aspecto de investigação, principalmente no que se refere a métodos alternativos de controle (CASA; CÂMARA, 2011).

O controle de doenças, pelo uso de produtos alternativos, é um dos aspectos da agricultura agroecológica, que inclui o controle biológico, a indução de resistência em plantas e o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

A indução de respostas de defesa em plantas contra patógenos é conhecida desde o início do século XX. Entretanto, sua fase mais promissora concentra-se na atualidade, sendo pesquisada em inúmeras espécies de plantas, distribuídas entre diversas famílias botânicas,

tanto em dicotiledôneas quanto em monocotiledôneas, revelando-se efetiva contra fungos, vírus, bactérias, insetos, ácaros e nematoides (FABRY, 2006).

O fenômeno da indução de resistência é definido como o aumento da capacidade da defesa das plantas contra patógenos, adquirida após a ativação de mecanismos de resistência (BENHAMOU; BELANGER, 1998). O envolvimento de macromoléculas em interações patógeno-planta, do ponto de vista de resistência e de fisiologia do parasitismo, é conhecida há bastante tempo, seja como mecanismos pré-existentes, seja como pós-formados (STICHER et al., 1997).

Os mecanismos de resistência pré-formados estão presentes nas plantas antes do contato com o patógeno, como a cutícula, tricomas, compostos como fenóis e alcaloides. Os pós-formados são produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno como geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), reforço de paredes celulares (papilas, halos, lignificação), síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) e acúmulo de fitoalexinas (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Das alterações decorrentes da interação planta-patógeno, a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) talvez seja a mais evidente. A quantidade de proteínas presente ou inativada no tecido vegetal pode sofrer grandes alterações quando desafiada por patógenos ou agentes elicitores, indicando a ativação dos mecanismos de defesa da planta e a importância de se estudar as enzimas chaves na indução de resistência (VICIELLI, 2008). Van Loon et al. (1994) propuseram uma nomenclatura para as PRPs, classificando-as em “famílias”, sendo as mais estudadas peroxidase, polifenoloxidase, catalase, quitinase e β -1,3-glucanase.

As fitoalexinas são compostos secundários, antimicrobianos, de baixa massa molecular e sintetizados pelas plantas em resposta a estresses. De modo geral, a forma de ação das fitoalexinas sobre os fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas. Estes efeitos refletem-se na inibição da germinação, desidratação ou alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (AGUERO et al., 2000).

Dentre os microrganismos considerados como potenciais agentes de controle biológico, destacam-se as leveduras que constituem um grupo microbiano com diferentes propriedades, que as caracterizam como candidatas ao controle de fungos filamentosos causadores de doenças em plantas. Estão presentes naturalmente na superfície de plantas, conseguem reproduzir-se de forma rápida e ocupam, de forma competitiva, os locais de

infecção fúngica. A literatura relata mecanismos observados em leveduras como biocontroladores de doenças de folhas e frutos como competição por nutrientes e espaço; produção de enzimas que degradam parede celular, como β -1,3-glucanase e quitinase; produção de metabólitos antifúngico; indução de resistência no hospedeiro; além de produzirem compostos promotores de crescimento vegetal de forma direta, como a produção de hormônios vegetais, ou indireta, pelo controle de patógenos (ROSA MAGRI et al., 2011).

Vários agentes podem induzir a produção de sinais em plantas, disparando reações que a protegem, de forma curta ou duradoura, contra uma ampla gama de fitopatógenos. Os agentes indutores ou ativadores de resistência podem ser microrganismos saprofitos, patógenos de plantas, metabólitos microbianos, extratos de plantas, agentes químicos, entre outros (DI PIERO et al., 2005).

A cascata de sinalização resultante das interações elicitor-planta envolve, entre outras moléculas, o ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), o ácido jasmônico (JA) e seu metil ester, metil jasmonato (MeJa) e o etileno (ET), como principais compostos capazes de induzir a expressão de muitos genes relacionados à defesa por meio de diferentes rotas (PERVIEUX et al., 2004).

Estudos indicaram que a ativação da transcrição desses genes relacionados com respostas de defesa em plantas é regulada por diferentes moléculas sinalizadoras e que os respectivos produtos estão envolvidos em processos distintos relacionados à resistência. A comparação da expressão de genes de plantas, induzidos em diferentes condições e após o tratamento com patógenos elicitores e moléculas sinalizadoras de respostas de defesa, como o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, verificou mudanças no padrão de expressão de genes de *Arabidopsis thaliana*, considerada planta modelo para estudo da expressão gênica (SCHENK et al., 2000).

Assim, a disponibilidade de diferentes tratamentos, seja químico ou biológico, permite ao agricultor alternar as medidas de controle adotadas. Desse modo, reduzem-se problemas advindos do uso exclusivo e indiscriminado de produtos químicos. Isso facilita o manejo fitossanitário da lavoura, diminui níveis de contaminação do ambiente e atende as exigências do mercado consumidor que busca produtos livres de resíduos químicos.

Neste sentido, o objetivo geral do trabalho foi avaliar três espécies de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, Meyen, E.C. Hansen, 1883; *Hanseniaspora opuntiae*, Cadez, Poot, Raspor & M. T. Smith; *Lachancea thermotolerans*, Kurtzman, C. P., 2003, para o

controle de fitopatógenos causadores de doenças em soja e seu potencial em induzir resistência em plantas.

Os objetivos específicos foram:

- Testar o efeito do fermentado produzido pelas leveduras no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Corynespora cassiicola*, *Phytophthora sojae*;
- Avaliar o fermentado produzido pelas leveduras como indutor da atividade de enzimas relacionadas à patogênese e ao acúmulo de fitoalexinas;
- Determinar a eficiência do fermentado produzido pelas leveduras no controle de fitopatógenos em casa de vegetação e a campo e seu efeito sobre o crescimento das plantas de soja e variáveis fotossintéticas;
- Verificar o potencial do filtrado produzido pela levedura *H. opuntiae* em induzir respostas de defesas em plantas de *A. thaliana* através análise quantitativa em tempo real da PCR dos genes marcadores de SA, JA e ET.

REFERÊNCIAS

AGUERO, M.E.; GEVENS, A.; NICHOLSON, R.L. Interaction of *Cochliobolus heterostrophus* with phytoalexin inclusions in *Sorghum bicolor*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, p.267-271, 2002.

BENHAMOU, N.; BELANGER, R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium damping-off* in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, v. 14, p. 13-21, 1998.

BONALDO, S. M. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolun*. 2005. 166 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CASA J; CÂMARA, F.L.A. Avaliação na severidade de doenças do tomateiro nos sistemas orgânico e biodinâmico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 272-273, 2011.

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

FABRY, C.F.S. **Indução de resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em tomateiro por rizobactérias**. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 73p. 2006.

FORCELINI, C.A. **Doenças em soja: entendendo as diferenças entre biotróficos e necrotróficos**. Revista Plantio Direto, edição 120. Aldeia Norte Editora, Passo Fundo, RS, 2010.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Soja**. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/975595/tecnologias-de-producao-de-soja---regiao-central-do-brasi-2014>>. Acesso em: 5. mar. 2017.

MARTINS, F. G.; **Desenvolvimento de modelos de ponto crítico para quantificação de danos causados pelo complexo de doenças foliares em soja**. 2007. 190f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, Passo Fundo.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN Filho, A., KIMATI, H. & AMORIM, L. (Editores). **Manual de fitopatologia** - princípios e conceitos. Vol. I. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. p. 417-454.

PERVIEUX, I.; BOURASSA, M.; LAURANS, F.; HAMELIN, R. E SÉGUIN, A. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 331-341, 2004.

ROSA-MAGRI, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 54, p. 1-5, 2011.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 54-56, 2003.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.M.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, North Carolina, v. 35, p. 235-270, 1997.

VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**. v. 12, p. 245-264, 1994.

VICIELLI, C. A. **Controle da mancha angular e análise bioquímica de resistência em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus***. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2008.

CAPÍTULO 1

Atividade antagônica *in vitro* dos isolados de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*,
Hanseniaspora opuntiae e *Lachancea thermotolerans* a patógenos causadores de doenças em
soja

Atividade antagônica *in vitro* dos isolados de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* a patógenos causadores de doenças em soja

RESUMO

A soja é a cultura agrícola brasileira mais importante no cenário nacional. Sua produtividade pode ser afetada por diversos fatores, dentre esses as doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e nematoides. A aplicação de fungicidas é o método mais difundido para controle de doenças. Como alternativa ao uso de produtos químicos, pode-se empregar o controle biológico, sendo que as leveduras têm sido relatadas como agentes eficazes no controle de doenças de plantas. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a potencialidade antagônica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* à *Corynespora cassiicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora sojae*, agentes causais da Mancha alvo, Mofo branco e Podridão radicular de fitóftora em soja, respectivamente. Avaliou-se o crescimento micelial *in vitro* dos fitopatógenos sob efeito das concentrações 5, 10, 15, 20 e 25% do fermentado, produzido pelas leveduras, diluído em meio batata dextrose ágar. Os resultados encontrados são promissores, pois as leveduras foram eficientes na redução do crescimento micelial dos fitopatógenos estudados.

Palavras-chave: Antagonismo. Controle biológico. *Glycine max* (L.). Levedura.

In vitro antagonistic activity of yeast isolates *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* and *Lachancea thermotolerans* to pathogens causing diseases in soybean

ABSTRACT

Soy is the most important Brazilian agricultural crop in the national scenario. Its productivity can be affected by several factors, among them diseases caused by fungi, viruses, bacteria and nematodes. The application of fungicides is the most widespread method for disease control. As an alternative to the use of chemicals, yeasts have been reported as effective biological control agents in controlling plant diseases. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* antagonistic potential of yeast isolates *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* and *Lachancea thermotolerans* to *Corynespora cassiicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phytophthora sojae*, causal agents of the Target Spot, White Mold, and Phytophore radicular rot in soy, respectively. The *in vitro* mycelial growth of the phytopathogens was evaluated under the effect of concentrations 5, 10, 15, 20 e 25% of the fermented yeast, diluted in potato agar dextrose medium. The results obtained are promising because the three isolates of yeasts were efficient to reduce the mycelial growth of the phytopathogens studied.

Keywords: Antagonism. Biological control. *Glycine max* (L.). Yeasts.

1. INTRODUÇÃO

A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nos últimos anos, correspondendo aproximadamente a 53 % da área de grãos plantada no país (MAPA, 2017). O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos e eficiência no manejo pelos produtores. O grão é o componente essencial na fabricação de ração animal e com uso crescente na alimentação humana. Embora a utilização de novas tecnologias tenha contribuído no decorrer dos anos para o aumento da produtividade, ainda existem muitos problemas fitossanitários que podem comprometer o rendimento de grãos.

A produtividade da cultura pode ser afetada por diversos fatores, destacando-se o déficit hídrico e problemas fitossanitários, como pragas, plantas daninhas e doenças. A cultura da soja é atacada por várias doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. Conforme a parte da planta afetada, estas doenças podem ser agrupadas como podridões de semente e da plântula, podridões de raízes, doenças da haste e do colo e doenças foliares. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra (MAPA, 2014).

A aplicação de fungicidas é o método mais difundido para controle de doenças no Brasil. A adoção contínua do controle químico pode acarretar o surgimento de patógenos resistentes aos produtos utilizados, além da contaminação do ambiente e ressurgimento de algumas doenças antes consideradas secundárias. A necessidade de métodos mais seguros tem estimulado a busca de alternativas ao uso de produtos químicos (GHINI; KIMATI, 2000).

Uma variedade de microrganismos antagonistas vem sendo utilizada para o controle de diferentes patógenos. As leveduras têm sido relatadas como agentes de controle biológico eficazes no controle de doenças de plantas. Como antagonistas, as leveduras podem atuar sobre os fitopatógenos através de antibiose, parasitismo, competição por nutrientes ou podem induzir à resistência (BETTIOL; GHINI, 1995).

Na última década, pesquisas têm demonstrado a eficácia do controle biológico, através da ação de isolados de leveduras, no controle de doenças fúngicas em pós-colheita (LEELASUPHAKUL et al., 2008) e pode-se extrapolar essa investigação para avaliar o potencial desses microrganismos como alternativa de controle de fitopatógenos em grandes culturas como a soja.

Considerando a importância da cultura da soja no cenário nacional e as perdas causadas por fitopatógenos, este trabalho teve por objetivo avaliar a potencialidade antagônica *in vitro* das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea*

thermotolerans à *Sclerotinia sclerotiorum*, Lib. De Bary; *Corynespora cassiicola*, Berk.& M. A. Curtis, C. T. Wei; e *Phytophthora sojae*, Kaufman & Gerdman, agentes causais do Mofobranco, Mancha alva e Podridão radicular de fitóftora em soja, respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo das leveduras

Os fungos leveduriformes utilizados neste trabalho, *S. cerevisiae* CCMA 0757, *H. opuntiae* CCMA 0760 e *L. thermotolerans* CCMA 0763, pertencentes à Coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética da Universidade Federal de Lavras, foram mantidos em geladeira a 3 °C (+/- 2) e posteriormente transferidos para placas com meio BDA (batata dextrose ágar).

As leveduras foram cultivadas em caldo de cana a 25 °C (+/- 2), a partir da concentração inicial de 10^4 células mL⁻¹ de uma suspensão em água das células das leveduras crescidas em meio BDA, determinada em câmara de Neubauer. O meio de cultura de caldo de cana foi previamente preparado na proporção 3:1 (v:v; de caldo de cana e água) autoclavados a 120 °C por 20 minutos. O fim do período de cultivo, sete dias, foi determinado ao encerrar o processo fermentativo, observado pelo fim da produção de gás carbônico e pela mudança de coloração do meio, que se tornou mais clara.

As leveduras foram testadas para o controle dos fitopatógenos da soja, causadores da Mancha alvo (*C. cassicola*), Mofo branco (*S. sclerotiorum*) e Podridão radicular (*P. sojae*). Os isolados fitopatogênicos foram mantidos em meio BDA, em câmara incubadora, com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Para os testes do controle *in vitro*, foram preparados meio BDA, no qual foram incorporadas, quando ainda fundente, as doses 5, 10, 15, 20 e 25% do fermentado autoclavado das leveduras e vertidos em placas de petri (Ø =100 mm). Como controles, foram utilizadas placas contendo meio BDA, no qual foi diluído o caldo de cana, a 25%, não fermentado autoclavado, correspondendo à dose zero.

Após o preparo das placas com os tratamentos, discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, provenientes de colônias puras dos fitopatógenos, foram repicados para as placas mantidas em câmara incubadora a 25 °C, 12 horas luz/escuro. A avaliação do crescimento micelial foi realizada diariamente, medindo-se o diâmetro médio das colônias até que seja tomado 2/3 da área das placas. Os valores de crescimento foram utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial diário (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento (PIC), por meio das fórmulas apresentadas a seguir:

$$\text{IVCM} = (\text{área final da colônia} / \text{número dias de incubação}) \times 100$$

$$\text{PIC} = (\text{área controle} - \text{área tratamento} / \text{área controle}) \times 100$$

Após 20 de incubação, realizou-se a contagem dos esporos de *C. cassicola*, através de uma suspensão de micélio retirado das placas, em câmara de Neubauer, e a contagem do número de escleródios formados de *S. sclerotiorum*.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com três leveduras, cinco doses (3 x 5) com cinco repetições. As interações entre tratamento e as concentrações foram submetidas à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), para o desdobramento dos tratamentos dentro de cada nível de concentração. O desdobramento das concentrações dentro de cada tratamento foi submetido à análise de regressão ($p < 0,05$), utilizando o pacote estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS

Com os dados de crescimento micelial de *C. cassiicola*, realizou-se desdobramento da interação entre isolados de levedura dentro das concentrações para índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e número de esporos mL⁻¹ após 20 dias de incubação (Tabela 1). As leveduras *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* reduziram significativamente o IVCM, de modo semelhante, nas doses 10 e 15%. Contudo, quando comparado às demais leveduras, *S. cerevisiae* apresentou o menor IVCM na dose de 20% e *H. opuntiae* na dose de 5%. Para a PIC, a levedura *L. thermotolerans* diferiu de forma significativa das demais na dose de 15 %, entretanto, as maiores porcentagens de inibição foram observadas com *S. cerevisiae* nas doses 20 e 25% com inibição de 49 e 60%, respectivamente. Quanto ao número de esporos, *H. opuntiae* diferiu das demais leveduras com redução significativa nas doses 5 e 15% e apresentou resultado semelhante à *L. thermotolerans* na dose de 25%.

Tabela 4. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹, porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e número de esporos mL⁻¹ (NE) após 20 dias de incubação de *Corynespora cassiicola*, em função do desdobramento da interação entre isolados de levedura (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*) dentro das concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %)

CONCENTRAÇÃO	TRATAMENTO								
	<i>L. thermotolerans</i>			<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. opuntiae</i>		
	IVCM	PIC%	NE	IVCM	PIC%	NE	IVCM	PIC%	NE
0	8,05 A	0,0 A	41 A	8,05 A	0,0 A	41 A	8,05 A	0,0 A	41 A
5	6,31 B	30 B	16 B	6,26 B	22 A	22 B	5,35 A	31 B	4,6 A
10	5,09 A	36 B	16,2 A	5,21 A	35 B	4,4 A	6,05 B	17 A	7,4 A
15	4,81 A	45 C	22,6 B	4,87 A	37 B	13,4 B	5,69 B	28 A	3,4 A
20	4,81 B	43 A	4,2 A	3,88 A	49 B	3,2 A	4,65 B	41 A	2,4 A
25	4,81 B	41 A	3,4 A	3,15 A	60 C	15,2 B	3,57 A	53 B	1,2 A
CV (%)	10	16	58	10	16	58	10	16	58

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O desdobramento da interação entre as concentrações dentro dos isolados de levedura foi significativo para todos os isolados nas três variáveis analisadas para *C. cassiicola* (Figura 1 A, B e C). *L. thermotolerans* proporcionou menor IVCM na concentração de 12 %, maior PIC na dose de 16 % e menor número de esporos em 25 %. *S. cerevisiae* estimulou menor IVCM e maior PIC para maior dose avaliada (25 %) e menor número de esporos na dose de 18 %. *H. opuntiae* também estimulou menor IVCM, maior PIC e menor esporulação na dose 25 %.

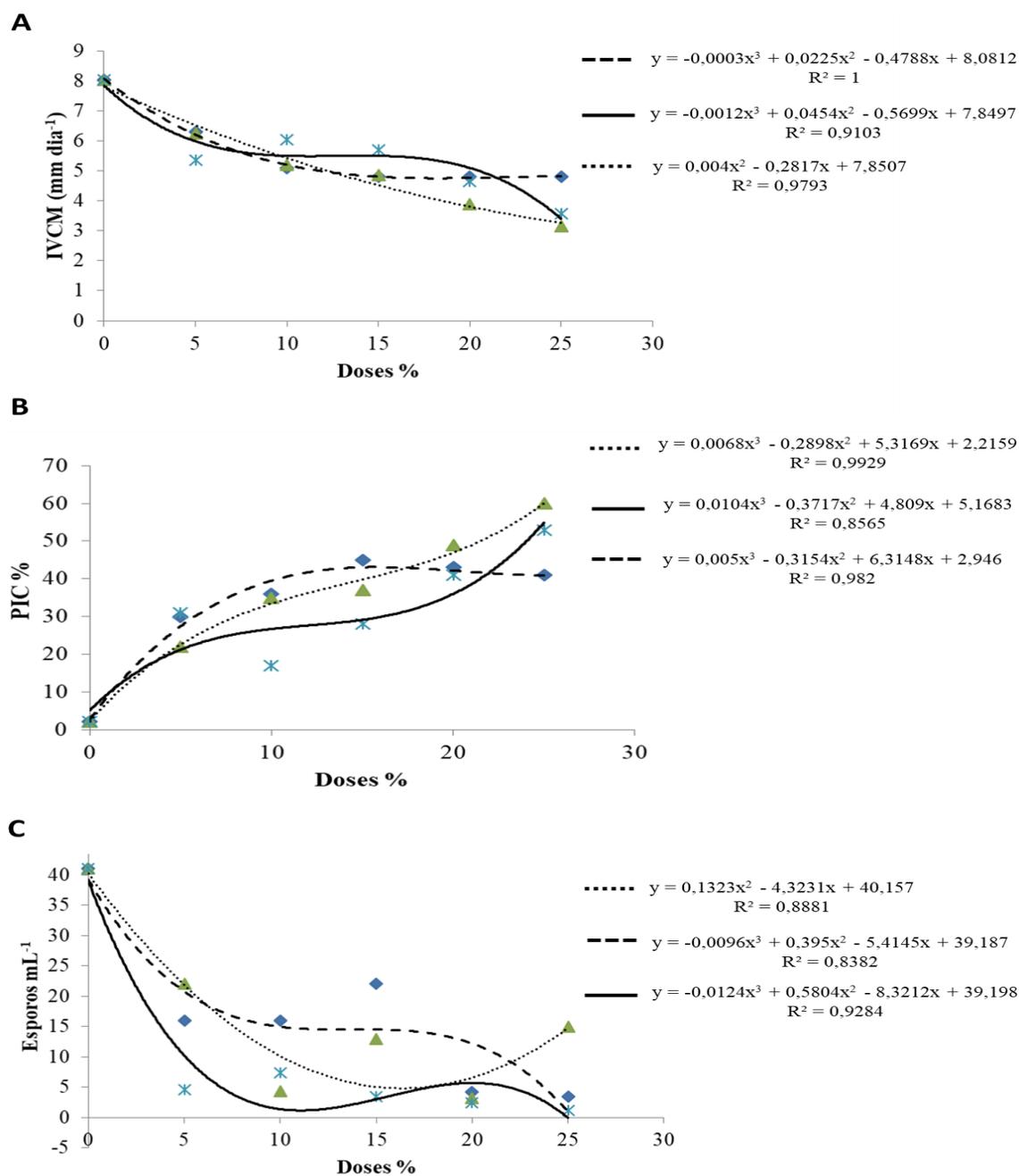


Figura 4. (A) Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹, (B) porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e (C) número de esporos mL⁻¹ após 20 dias de incubação de *Corynespora cassiicola*, em função do desdobramento da interação entre as concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %) dentro dos isolados de levedura *L. thermotolerans* (- -), *S. cerevisiae* (.....) e *H. opuntiae* (—).

O desdobramento da interação entre os isolados de levedura dentro das concentrações para IVCN, PIC e número de escleródios após 20 dias de incubação de *S. sclerotiorum* (Tabela 2) revelou que *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* apresentaram resultados semelhantes com menor IVCN e maior PIC nas doses 10, 15 e 25%. Contudo, *H. opuntiae* diferiu significativamente das demais leveduras, tanto para IVCN como para PIC na dose de 20%. Quanto à formação das estruturas de resistência, as diferenças significativas entre os isolados foram para *L. thermotolerans* nas doses de 15% e *S. cerevisiae* na dose de 25 %.

Tabela 5. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCN) mm dia⁻¹, porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e número de escleródios (NE) após 20 dias de incubação de *Sclerotinia sclerotiorum*, em função do desdobramento da interação entre isolados de levedura (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*) dentro das concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %)

CONCENTRAÇÃO	TRATAMENTO								
	<i>L. thermotolerans</i>			<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. opuntiae</i>		
	IVCN	PIC%	NE	IVCN	PIC%	NE	IVCN	PIC%	NE
0	15,9 A	0,0 A	6,8 A	15,9 A	0,0 A	6,8 A	15,9 A	0,0 A	6,8 A
5	15,1 A	3,0 A	22 A	13,7 A	15 A	25 A	13,6 A	13 A	16 A
10	15,9 B	0,0 A	21 A	13,5 A	16 B	27 A	13,7 A	12 B	25 A
15	13,3 B	18 A	10 A	10,6 A	31 B	28 B	10,3 A	34 B	23 B
20	13,3 C	16 A	17 A	10,3 B	31 B	36 B	7,21 A	52 C	23 A
25	11,7 B	26 A	24 B	8,07 A	60 B	12 A	7,84 A	50 B	23 B
CV (%)	13	31	35	13	31	35	13	31	35

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

As variáveis analisadas para *S. sclerotiorum* no desdobramento da interação entre as concentrações dentro dos isolados de levedura foram significativas para os todos isolados (Figura 2 A, B e C). Observou-se o efeito linear dose dependente indiretamente proporcional nos três isolados para IVCN, ou seja, quanto maior a dose, menor a velocidade de crescimento diário do patógeno. Para PIC também houve efeito dose dependente, quanto maior a dose maior o percentual de inibição para leveduras *L. thermotolerans* e *H. opuntiae*. O fermentado de *S. cerevisiae* proporcionou maior PIC na dose de 25%. As interações para número de escleródios foram significativas e, comparando-se numericamente a quantidade dessas estruturas de resistência, os três isolados induziram aumento em todas as doses quando comparado à dose zero.

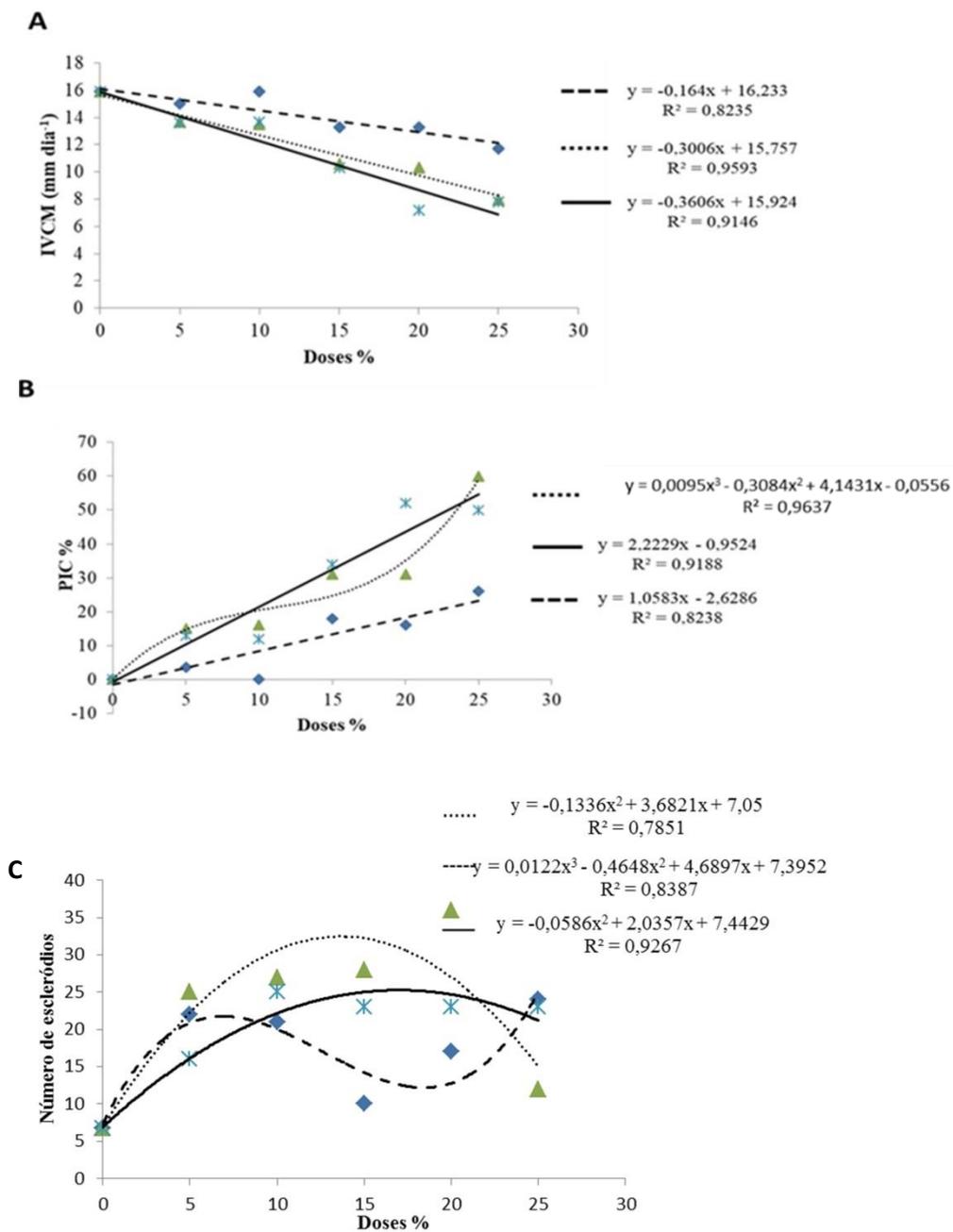


Figura 5. (A) Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹, (B) porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e (C) número de escleródios após 20 dias de incubação de *Sclerotinia sclerotiorum*, em função do desdobramento da interação entre as concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %) dentro dos isolados de levedura *L. thermotolerans* (- -), *S. cerevisiae* (.....) e *H. opuntiae* (—).

O desdobramento da interação entre isolados de levedura dentro das concentrações com dados de crescimento micelial de *P. sojae* (Tabela 3) revelou *S. cerevisiae* como melhor isolado para reduzir o crescimento micelial do patógeno. Apresentou menor IVCm nas doses

5, 10, 20 e 25%, sendo que a dose de 15% não diferiu de *H. opuntiae*. *S. cerevisiae* também apresentou maior PIC, quando comparado com as demais leveduras, nas doses 5, 10 e 25%, e não diferiu de *H. opuntiae* nas doses de 15 e 20%. *L. thermotolerans*, nas doses 10 e 25%, apresentou maior PIC quando comparada à levedura *H. opuntiae*.

Tabela 6. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹ e porcentagem de inibição do crescimento (PIC) de *Phytophthora sojae*, em função do desdobramento da interação entre isolados de levedura (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*) dentro das concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %)

CONCENTRAÇÃO	TRATAMENTO					
	<i>L. thermotolerans</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>H. opuntiae</i>	
	IVCM	PIC%	IVCM	PIC	IVCM	PIC
0	8,37 A	0,0 A	8,37 A	0,0 A	8,37 A	0,0 A
5	7,45 B	9 A	5,16 A	38 B	7,42 B	13 A
10	5,84 B	30 B	1,86 A	73 C	7,20 C	13 A
15	5,85 B	26 A	1,01 A	86 B	0,92 A	81 B
20	3,80 C	54 A	1,29 A	82 B	2,35 B	71 B
25	1,89 B	73 B	0,06 A	96 C	3,56 C	56 A
CV (%)	15	20	15	20	15	20

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O desdobramento da interação entre as concentrações dentro dos isolados de levedura foi significativo para os todos isolados nas variáveis analisadas para *P. sojae* (Figura 3 A e B). *L. thermotolerans* estimulou menor IVCM na dose 25 % e efeito dose dependente para PIC. *S. cerevisiae* proporcionou menor IVCM na dose de 25 % e maior PIC na dose de 20 %. *H. opuntiae* proporcionou menor IVCM na dose de 19 % e maior PIC na dose de 20 %.

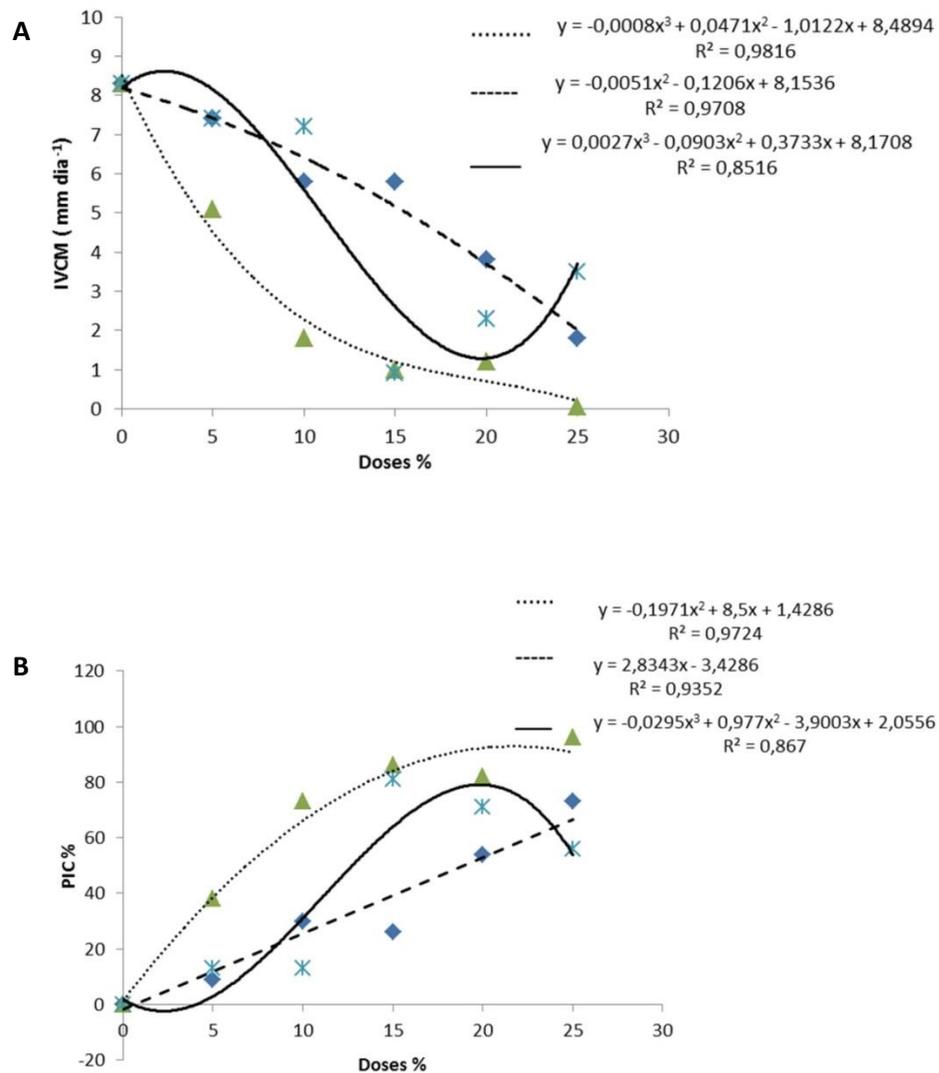


Figura 6. (A) Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) mm dia⁻¹ e (B) porcentagem de inibição do crescimento (PIC) de *Phytophthora sojae*, em função do desdobramento da interação entre as concentrações (0, 5, 10, 15, 20 e 25 %) dentro dos isolados de levedura *L. thermotolerans* (- - -), *S. cerevisiae* (.....) e *H. puntiae* (—).

4. DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* são importantes indicativos preliminares para verificar o potencial do microrganismo a ser avaliado. Quando ocorre efeito fungitóxico direto sobre o patógeno, ainda pode-se considerar a possibilidade de outros mecanismos de ação, como a indução de resistência. Segundo Droby et al. (2009) o estudo do antagonismo *in vitro* é crucial na avaliação de um agente de biocontrole, pois identificam principalmente os antagonistas que são produtores de antibióticos.

Os isolados estudados induziram uma redução na velocidade de crescimento dos três fitopatógenos quando comparados à dose zero. O potencial do fermentado autoclavado produzido pelas leveduras é mais evidente ao analisar o percentual de inibição de crescimento dos fungos, isso sugere que durante o processo de fermentação são liberados metabólitos com efeito prejudicial aos patógenos. *C. cassiicola* e *S. esclerotiorum* apresentaram reduções no crescimento micelial de 60 e 50 % na dose de 25 % dos tratamentos *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, respectivamente. As reduções do crescimento sob *P. sojae* foram ainda maiores, sendo que as leveduras *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae*, na dose de 25%, o percentual de inibição de crescimento do patógeno foi de 73 % e 96 %, respectivamente, e *H. opuntiae* inibiu 81% na dose de 15%.

A potencialidade antagônica *in vitro* de isolados de leveduras a fitopatógenos é testada em muitos trabalhos. Baseando-se na porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em pimentão, em relação à testemunha, identificaram-se isolados de *Rhodotorula glutinis*, que inibiram em torno de 50 % o crescimento do fitopatógeno. A utilização de *R. glutinis* no controle da antracnose do pimentão pode ser considerada uma alternativa aos fungicidas sintéticos e, embora não apresente mesma eficiência, seu uso pode prevenir o aparecimento de resistência de fungos fitopatogênicos, tornando o controle biológico uma medida mais eficaz (FRANÇA et al., 2015).

Leveduras avaliadas em co-cultivo com fungos filamentosos inibiram a esporulação, mas não causaram interferência no crescimento micelial dos fungos. Isolados de *Debaryomyces hansenii* inibiram em média 32 % da esporulação e isolados de *Pichia anomala* inibiram a esporulação, em média, 27 %. Microrganismos usados como agentes do controle biológico podem agir impedindo que estruturas ou mecanismos de virulência sejam desencadeados sem interferir no crescimento do microrganismo patogênico (RAMOS et al., 2010). Dong et al. (2004) também relataram que a presença de *Bacillus thuringiensis* inibiu o

desenvolvimento da virulência de *Erwinia carotovara*, mas não impediu seu crescimento na planta.

Os isolados de leveduras utilizados neste trabalho foram eficientes em inibir o crescimento micelial dos três fitopatógenos, mas não apresentaram mesmo comportamento em relação à esporulação de *C. cassiicola* e à formação de escleródios de *S. sclerotiorum*. Embora a quantidade esporos de *C. cassiicola* tenha diminuído, principalmente nas maiores doses, não é possível afirmar com segurança o efeito inibidor na esporulação, devido à alta variabilidade desses dados.

A formação de escleródios de *S. sclerotiorum* foi estimulada com os fermentados das três leveduras em todas as doses avaliadas, quando comparadas à dose zero, que consistia meio BDA diluído em caldo de cana 25 %. Durante o processo de fermentação, supõe-se que os nutrientes presentes no caldo de cana sejam consumidos pelas leveduras, principalmente açúcares, e que o déficit de nutrientes possa ter estimulado a formação de estruturas de resistência. À medida que diminui a disponibilidade de nutrientes, ocorre a atração e fusão de hifas, dando início à formação de escleródios, processo que envolve mudanças celulares, mobilização e deposição de muitas substâncias (LE TORNEAU, 1979).

Alguns trabalhos utilizando antagonistas para controle de doenças em plantas relatam o estímulo na formação de esporos de fitopatógenos. Muitas vezes não se utiliza o antagonista em confronto direto com patógeno, e sim preparações como filtrados ou fermentados. O efeito estimulador na produção e germinação de esporos por fitopatógenos pode estar relacionada à presença de substâncias estimuladoras nas fermentações produzidas pelas leveduras. Filtrados obtidos de culturas das cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. estimularam a germinação de conídios de *Colletotrichum sublineolum* (DI PIERO; PASCHOLATI, 2002).

Resultados diferentes foram encontrados por Kupper et al. (2013) ao analisarem o efeito de isolados de *S. cerevisiae* na germinação de *Penicillium digitatum*, com diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio. Observaram que dois isolados da levedura, quando avaliados sozinhos, ou seja, sem adição de sacarose, inibiram mais a germinação do patógeno, com valores de porcentagens de inibições de 78 e 85,7 %. Quando a menor concentração de sacarose (0,5 %) foi utilizada, esses dois isolados afetaram ainda mais a germinação de *Penicillium* e concentrações de sacarose acima de 1,5 % favoreceram a germinação do fitopatógeno.

Embora a composição química do fermentado produzido pelas leveduras não tenha sido objeto de estudo desse trabalho, é possível concluir que apresentam efeito inibidor sobre

o crescimento micelial de *C. cassicola*, *S. sclerotiorum* e *P. sojae*. Assim, existe possibilidade desses agentes de biocontrole, por apresentarem a antibiose como um de seus mecanismos de ação, serem uma alternativa a ser utilizada no manejo integrado da cultura da soja.

5. CONCLUSÕES

Os fermentados dos isolados de *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* foram eficientes em reduzir o crescimento micelial de *C. cassicola*, *S. sclerotiorum* e *P. sojae*.

O fermentado autoclavado de *S. cerevisiae*, na dose de 25 %, estimulou as maiores reduções do crescimento micelial dos fitopatógenos.

A formação de escleródios em *S. sclerotiorum* foi estimulada pelo fermentado produzido por *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* em todas as doses avaliadas.

REFERÊNCIAS

BETTIOL, W. ; GHINI, R. Controle biológico. In: Manual de fitopatologia. BERGAMIN FILHO, A. ; AMORIM, L. ; KIMATI, H. (Eds.) São Paulo, Ceres, 919 p. 1995.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito das cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc* sp. sobre *Colletotrichum sublineolum* e na interação do patógeno com plantas de sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.163-169, 2002.

DONG, Y. H.; ZHANG, X. F.; XU, J. L.; ZHANG, L. H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 954-960, 2004.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p. 137- 145, 2009.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], pp. 109-112 . Disponível em: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

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

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 78, 2000.

KUPPER, K. C.; CERVANTES, A. L. L.; KLEIN, M. N.; SILVA, A. C. Avaliação de microrganismos antagonistas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 425-436, 2013.

LEELASUPHAKUL W.; HEMMANEEA P.; CHUENCHITT S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p.113–121, 2008.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, v.69, p.887-890, 1979.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Soja**. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/975595/tecnologias-de-producao-de-soja---regiao-central-do-brasi-2014>>. Acesso em: 5. mar. 2017.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Soja**. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos> >. Acesso em: 1 jul. 2017.

RAMOS, D.M.B.; SILVA, C.F.S.; 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, p. 397-402, 2010.

CAPÍTULO 2

Saccharomyces cerevisiae, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* na indução de enzimas relacionadas à patogênese e ao acúmulo de fitoalexinas

Saccharomyces cerevisiae, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* na indução de enzimas relacionadas à patogênese e ao acúmulo de fitoalexinas

RESUMO

A resistência induzida em plantas envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência através de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos, que promovem ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina. As leveduras podem induzir resistência em plantas contra doenças, além de atuar diretamente sobre o patógeno por antibiose ou competição. Nesse trabalho, procurou-se demonstrar a capacidade de fermentados produzidos por *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* em alterar o metabolismo de plantas de soja, com base na atividade das enzimas peroxidase, catalase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase, quitinase e no acúmulo de fitoalexinas. Plântulas de soja foram tratadas com fermentado produzido pelos fungos leveduriformes e coletas para as análises enzimáticas foram realizadas nos tempos 12, 24, 48 horas após tratamento (hpt). Para fitoalexinas, utilizou-se o fermentado produzido pelas leveduras para tratar mesocótilos de sorgo, cotilédones de soja e hipocótilos de feijão, para quantificação de deoxiantocianidina, gliceolina e faseolina, respectivamente. O fermentado produzido por *L. thermotolerans* mostrou-se efetivo na indução da atividade das enzimas peroxidase, catalase e polifenoloxidase 12 hpt; *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* induziram a atividade das enzimas catalase e polifenoloxidase 12 hpt e peroxidase e quitinase 24 hpt; *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* apresentaram potencial em induzir a produção de gliceolina.

Palavras-chave: Leveduras. Indução de resistência. Proteínas relacionadas à patogênese. Fitoalexinas.

Saccharomyces cerevisiae, *Hanseniaspora opuntiae* and *Lachancea thermotolerans* in inducing the activity of enzymes related to pathogenesis and accumulation of phytoalexins

ABSTRACT

Induced resistance in plants involves the activation of latent mechanisms of plant resistance through treatments with biotic or abiotic agents that promote the activation of genes that encode pathogenesis-related proteins and enzymes involved in the synthesis of phytoalexins and lignin. Yeasts can induce resistance in plants against diseases, besides acting directly on the pathogen by antibiosis or competition. The objective of this work was to demonstrate the ability of fermented *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* to alter the metabolism of soybean plants, based on the activity of the enzymes peroxidase, catalase, polyphenoloxidase, β -1,3 glucanase, chitinase and in the accumulation of phytoalexins. Soybean seedlings were treated with fermented yeast produced and samples for the enzymatic analyzes were performed at 12, 24, 48 hours after treatment (hpt). For phytoalexins the yeast produced to treat mesocotyls of sorghum, soy cotyledons and bean hypocotyls was used for the quantification of deoxyanthocyanidine, glycerol and phaseolin, respectively. The fermentation produced by *L. thermotolerans* was effective in inducing the activity of enzymes peroxidase, catalase and polyphenoloxidase 12 hpt; *S. cerevisiae* and *H. opuntiae* induced the activity of the enzymes catalase and polyphenoloxidase 12 hpt and peroxidase and chitinase 24 hpt; *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* had the potential to induce the production of glycerol.

Keywords: Yeasts. Induction of resistance. Proteins related to pathogenesis. Phytoalexins.

1. INTRODUÇÃO

A resistência induzida em plantas, também conhecida como indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida, envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997).

Os elicitores podem ser representados por fungos, células bacterianas, partículas virais ou substâncias produzidas por eles, podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos. Isso demonstra a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade eliciadora (PASCHOLATI, 2011).

Após o reconhecimento, uma cascata de sinais é acionada, o que leva à ativação dos mecanismos de defesa das plantas, resultando em alterações na atividade de enzimas chaves no metabolismo primário e secundário (PASCHOLATI, 2011). A indução de resistência ocorre pela ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina (VAN LOON et al., 2006).

As leveduras são estudadas na proteção de plantas de diversas espécies vegetais, atuando por diferentes mecanismos. Podem induzir resistência em plantas contra doenças, além de atuar diretamente sobre o patógeno por antibiose ou competição (GOUVEA et al., 2009). A proteção deve-se a mecanismos operando ao nível de pré e pós penetração dos tecidos vegetais pelos patógenos, porém pouco se conhece a respeito dos mesmos (SILVA; PASCHOLATI, 1992).

Devido à necessidade de minimizar os problemas com relação a populações de patógenos resistentes a fungicidas e atender à demanda de alimentos de melhor qualidade, produtores e pesquisadores buscam formas alternativas para controle de fitopatógenos. Dentre as estratégias, destacam-se o controle biológico e a indução de resistência a doenças de plantas.

Diante do exposto, para a elucidação dos mecanismos de ação de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* no fenômeno de proteção de plantas contra fitopatógenos, o presente trabalho procurou demonstrar a capacidade de fermentados produzidos por essas leveduras em alterar o metabolismo de plantas de soja, com base na atividade das enzimas peroxidase, catalase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase, quitinase e no acúmulo de fitoalexinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo das leveduras

Os fungos leveduriformes *S. cerevisiae* CCMA 0757, *H. opuntiae* CCMA 0760 e *L. thermotolerans* CCMA 0763, pertencentes à Coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética da Universidade Federal de Lavras, foram cultivados em caldo de cana, a 25 °C, a partir da concentração inicial de 10^4 células mL⁻¹, de uma suspensão em água das células das leveduras crescidas em meio batata-dextrose-ágar (BDA), determinada em câmara de Neubauer. O meio de cultura de caldo de cana foi previamente preparado na proporção 3:1 (v:v) de caldo de cana e água, autoclavados a 120 °C por 20 minutos.

O fim do período de cultivo, aproximadamente sete dias, foi determinado ao encerrar o processo fermentativo, observado pelo fim da produção de gás carbônico e pela mudança de coloração do meio, que se tornou mais clara.

2.2 Tratamento de plântulas de soja

Sementes de soja, cultivar INT 6100, foram semeadas em areia autoclavada. Quando as plântulas estavam no estágio V1 (folhas unifoliadas abertas), foram tratadas até o ponto de escorrimento, com caldo de cana fermentado e autoclavado dos fungos leveduriformes, na concentração de 25%. Como controle, utilizou-se caldo de cana não fermentado e autoclavado, diluído a 25% em água, água e indutor Acibenzolar-S- Metílico (ASM), produto comercial Bion® (5g. 100 L de água⁻¹).

A fim de verificar a indução de mecanismos bioquímicos na folha, coletas foram realizadas nos tempos 12, 24, 48 horas após tratamento (hpt) com o fermentado. Para enzima quitinase, as coletas foram realizadas somente 24 e 48 hpt. As folhas foram pesadas, acondicionadas em papel alumínio e mantidas em congelador a (-20°C) para posterior quantificação das enzimas.

2.3 Obtenção dos extratos proteicos

As amostras de tecido foliar retiradas das plantas de soja foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 4 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo 0,1 mM EDTA e 1% (p/p) de PVP (poli-vinil-pirrolidona). Este produto foi centrifugado durante 30 min a 15.000 g a 4 °C e o sobrenadante obtido foi considerado como

extrato enzimático. Este extrato foi utilizado para a determinação do conteúdo proteico e da atividade das enzimas peroxidase de guaiacol, catalase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase e quitinase.

2.4 Análises bioquímicas

2.4.1 Quantificação de proteínas totais

Para quantificação de proteínas, foi empregado o teste de Bradford (1976). A cada 50 μ L de extrato enzimático foram acrescentados, sob agitação, 2,5 mL do reagente de Bradford. Após cinco minutos, a leitura da absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas, expressa em mg proteína mL⁻¹, foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB).

2.4.2 Atividade de peroxidase de guaiacol (E C 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase de guaiacol foi determinada através da medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol, misturando-se 100 μ L do extrato proteico e 2,9 mL de solução com 250 μ L de guaiacol e 306 μ L de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A reação ocorreu a 30 °C e a leitura realizada pelo método espectrofotométrico direto a 470 nm por um período de 2 min. A diferença entre a leitura no primeiro minuto e a leitura inicial foi utilizada para a determinação da atividade da enzima e os resultados expressos em absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

2.4.3 Atividade de catalase (E C 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pelo método de TOMANKOVÁ (2006), através do complexo estável formado pelo molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio. A alíquota de 100 μ L do extrato de cada planta foi incubado em 500 μ L de mistura de reação, contendo 60 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 60 mM pH 7,4 a 38 °C durante 4 min. Após este período, a adição de 500 μ L de 32,4 mM de molibdato de amônio foi feita para deter o consumo de peróxido de hidrogênio pela enzima presente no extrato. Foi preparado um branco para cada amostra, através da adição de molibdato de amônio a mistura de reação, omitindo o período de incubação. A diferença entre a absorbância do branco e a amostra incubada indicou a quantidade de peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) utilizado pela enzima. A leitura das amostras é realizada a 405 nm. A concentração de H₂O₂ é determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.4 Atividade da polifenoloxidase (E C 1.10.3.2)

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com a metodologia de Duangmal e Apenten (1999), pela mensuração da conversão do catecol em quinona. O substrato foi composto por catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação ocorreu a 30 °C, para isto, 900 µL do substrato foram misturados com 100 µL do extrato proteico. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm a cada 10 s durante 2 min. A diferença entre a leitura final e a leitura inicial foi utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorvância $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.4.5 Atividade da β -1,3- glucanase (E C 3.2.1.6)

Para a determinação da atividade da β -1,3-glucanase, 150 µL do extrato proteico foram adicionados a 150 µL de laminarina ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) em tampão de extração (acetato de sódio 100 mM pH 5,2). A reação foi conduzida a 40 °C durante 60 min, em banho-maria. O controle foi realizado pela mesma reação, adicionando-se laminarina imediatamente antes da determinação de açúcares (sem incubação). Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método de Lever (1972), retirando uma alíquota de 50 µL dos tubos incubados e não-incubados, adicionando 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) 0,5 % em NaOH 0,5 M. Essa mistura foi mantida em banho-maria fervente por 10 minutos e resfriada em banho de gelo. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 410 nm, descontando-se os valores de absorvância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando curva padrão de concentrações de glicose.

2.4.6 Atividade da quitinase (E C 3.2.1.14)

A atividade desta enzima foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Silva et al., (2008), na qual ocorre liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV” a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para isso, 600 µL do tampão de extração (acetato de sódio 100 mM pH 5,2) foram misturados com 200 µL de extrato proteico e 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2 mg L^{-1}). Após incubação a 40 °C por 20 min, a reação foi paralizada com 200 µL de HCl 1M, seguido de resfriamento em gelo e

centrifugação a 10.000 g por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 550 nm, tendo como referência 800 µL de tampão de extração + 200 µL de “CM-chitin-RBV + 200 µL de HCl 1,0 M. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.4.7 Indução de fitoalexinas

Por serem bioensaios-padrão e indicativo de possível produção de fitoalexinas em outras culturas, a capacidade dos tratamentos para induzir o acúmulo de fitoalexinas foi avaliada em cotilédones de soja (gliceolina), hipocótilos estiolados de feijão (faseolina) e mesocótilos estiolados de sorgo (deoxiantocianidina). Os tratamentos foram compostos pelo fermentado autoclavado das leveduras, na concentração de 25%. Como controle, foram utilizados o caldo de cana não fermentado e autoclavado, diluído a 25% em água, água destilada estéril, indutor ASM (Bion®) e a suspensão em água do micélio dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora sojae* e *Corynespora cassiicola*.

Para a determinação de gliceolina, conforme a metodologia descrita por Ziegler e Pontzen (1982), cotilédones de soja com aproximadamente 10 dias após a semeadura foram destacados das plântulas e lavados em água. Sob os cotilédones, foi realizado um corte superficial, depositando cinco cotilédones seccionados em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre a superfície lesionada de cada cotilédone, foram aplicados 20 µl dos tratamentos. As placas foram mantidas a 25 °C, no escuro, por 24 horas. Em seguida, os cotilédones foram agitados por uma hora em 15 mL de água destilada estéril e a absorbância foi determinada a 285 nm em espectrofotômetro.

O acúmulo de faseolina foi determinada segundo a metodologia de Bailey e Burden (1983), onde sementes de feijão foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1 % por 5 min., lavadas em água estéril e semeadas em areia esterilizada, sendo mantidas em câmara climatizada a 24 °C no escuro por sete dias. Em seguida, os hipocótilos estiolados, com 5 cm de comprimento, foram destacados das plântulas e lavados em água estéril. Quatro segmentos dos hipocótilos (aproximadamente 1 g) foram colocados em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril. Os tratamentos foram aplicados sobre os hipocótilos na alíquota de 100 µL. As placas de Petri foram mantidas a 25 °C no escuro. Após 48 horas, transferiu-se os hipocótilos para tubos de ensaio contendo 10 mL de etanol e mantidos a 4 °C por 48 horas para extração da fitoalexina formada. Após este período, agitou-se os tubos por 1 hora e efetuou-se leitura em espectrofotômetro a 280 nm.

No bioensaio para determinação de deoxiantocianidina, sementes de sorgo foram desinfestadas superficialmente com NaOH 10 % por 10 minutos e lavadas repetidamente com água destilada até eliminação dos resíduos. As sementes foram acondicionadas em rolos de papel germitest, mantidas no escuro por sete dias, em recipiente contendo água destilada, seguidas de quatro horas no claro. Os mesocótilos das plântulas foram excisados e imergidos em microtubos (3 por microtubo) contendo 1,5 mL de cada tratamento. Os microtubos foram mantidos em câmara úmida a 27 °C. Decorridas 60 horas, os mesocótilos foram pesados, divididos em três partes iguais e colocados em tubos de ensaio contendo metanol 80 % para extração da fitoalexina. Foram realizadas leituras a 480 nm em espectrofotômetro, de acordo com a metodologia de Nicholson et al. (1988).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (fermentado a 25% das leveduras *S. cerevisiae*, *H. opuntiae* e *L. thermotolerans*, caldo de cana 25%, Bion e água), três horários de coleta e cinco repetições para análises enzimáticas; nove tratamentos (fermentado a 25% das leveduras *S. cerevisiae*, *H. opuntiae* e *L. thermotolerans*, caldo de cana 25%, Bion, água e a suspensão em água do micélio dos fitopatógenos *S. sclerotiorum*, *P. sojae* e *C. cassiicola*) e cinco repetições para fitoalexinas. As interações entre tratamentos e horários de coleta foram submetidas à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o pacote estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS

Atividade específica da enzima peroxidase de guaiacol em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre tratamentos e horários de coleta, demonstrou efeito significativo (Tabela 1). *L. thermotolerans* induziu uma resposta significativa e superior a todos os demais tratamentos 12 hpt, entretanto, observou-se uma queda na atividade da enzima nos demais horários avaliados. *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* destacaram-se de modo semelhante ao Bion 24 hpt, superando *L. thermotolerans*, água e caldo de cana. No horário 48 hpt não houve diferença entre leveduras, água e caldo de cana. Embora a atividade enzimática induzida por *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* não tenha se alterado de forma significativa ao longo do tempo, o Bion foi o único tratamento a sobressair-se no último horário de avaliação.

Tabela 1. Atividade específica da enzima peroxidase de guaiacol (absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24, 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.

TRATAMENTO	HORÁRIO		
	12 H	24 H	48 H
<i>L. thermotolerans</i>	0,396 Cc	0,085 Aa	0,208 Bb
<i>S. cerevisiae</i>	0,279 Ba	0,158 Ba	0,209 Ba
<i>H. opuntiae</i>	0,288 Ba	0,176 Ba	0,208 Ba
CALDO DE CANA	0,230 Bb	0,066 Aa	0,150 Bb
ÁGUA	0,013 Aa	0,013 Aa	0,013 Aa
BION	0,273 Bb	0,129 Ba	1,203 Cc
CV (%)			38

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

As leveduras também induziram diferentes respostas para atividade da enzima catalase, em função do desdobramento da interação entre tratamentos e horários de coleta (Tabela 2). *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae*, *H. opuntiae* e Bion induziram atividade enzimática de modo semelhante e superior aos controles água e caldo de cana 12 hpt. No horário 24 hpt, somente *H. opuntiae* e Bion permaneceram superiores aos controles. Embora a atividade enzimática tenha aumentado 48hpt em relação a 24 hpt para as três leveduras, apenas o Bion superou o controle caldo de cana.

Tabela 2. Atividade específica da enzima catalase (absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24 e 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.

TRATAMENTO	HORÁRIO		
	12 H	24 H	48 H
<i>L. thermotolerans</i>	0,857 Cb	0,297 Aa	0,669 Bb
<i>S. cerevisiae</i>	1,107 Cc	0,374 Aa	0,728 Bb
<i>H. opuntiae</i>	1,309 Cb	0,654 Ba	1,124 Cb
CALDO DE CANA	0,614 Bb	0,249 Aa	3,000 Dc
ÁGUA	0,108 Aa	0,100 Aa	0,103 Aa
BION	1,056 Cb	0,458 Ba	5,886 Ec
CV (%)	22		

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O desdobramento da interação entre tratamentos e horários de coleta para enzima polifenoloxidase evidenciou diferenças na atividade indutora (Tabela 3). *S. cerevisiae*, *H. opuntiae* e *L. thermotolerans* induziram, no primeiro horário de avaliação, aumento da atividade dessa enzima, quando comparada aos controles, incluindo Bion. Nos demais horários de avaliação, leveduras e controles não diferiram entre si, exceto Bion, que se destacou 48 hpt.

Tabela 3. Atividade específica da enzima polifenoloxidase (absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24 e 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.

TRATAMENTO	HORÁRIO		
	12 H	24 H	48 H
<i>L. thermotolerans</i>	0,247 Bb	0,046 Aa	0,049 Aa
<i>S. cerevisiae</i>	0,233 Bb	0,064 Ab	0,028 Ab
<i>H. opuntiae</i>	0,243 Bb	0,104 Aa	0,043 Aa
CALDO DE CANA	0,035 Aa	0,022 Aa	0,022 Aa
ÁGUA	0,038 Aa	0,035 Aa	0,038 Aa
BION	0,062 Aa	0,058 Aa	0,236 Bb
CV (%)	65		

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para atividade específica da enzima glucanase, não foi observado efeito indutor significativo das leveduras, quando comparadas aos controles (Tabela 4). Já para atividade específica da enzima quitinase (Tabela 5), observou-se efeito significativo para *S. cerevisiae*, *H. opuntiae* e Bion 24hpt. No Horário 48 hpt, embora a atividade enzimática induzida por *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* tenha aumentado significativamente, quando comparada ao horário anterior, não superou o controle caldo de cana, tampouco o Bion.

Tabela 4. Atividade específica da enzima glucanase (mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (12, 24, 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.

TRATAMENTO	HORÁRIO		
	12 H	24 H	48 H
<i>L. thermotolerans</i>	0,072 Bb	0,012 Aa	0,038 Aa
<i>S. cerevisiae</i>	0,048 Bb	0,039 Bb	0,010 Aa
<i>H. opuntiae</i>	0,056 Bb	0,038 Ba	0,032 Ba
CALDO DE CANA	0,051 Bb	0,013 Aa	0,046 Cb
ÁGUA	0,029 Aa	0,020 Ba	0,027 Ba
BION	0,065 Bb	0,031 Ba	0,063 Cb
CV (%)	40		

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 5. Atividade específica da enzima quitinase (absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre horários de coleta (24 e 48 horas após tratamento) dentro dos tratamentos (*L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* e *H. opuntiae*, caldo de cana, água e Bion) e dos tratamentos dentro dos horários de coleta.

TRATAMENTO	HORÁRIO	
	24 H	48 H
<i>L. thermotolerans</i>	0,076 Aa	0,066 Aa
<i>S. cerevisiae</i>	0,166 Ba	0,306 Bb
<i>H. opuntiae</i>	0,193 Ba	0,502 Cb
CALDO DE CANA	0,085 Aa	0,448 Cb
ÁGUA	0,042 Aa	0,037 Aa
BION	0,166 Ba	0,703 Db
CV (%)	27	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

As leveduras *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* induziram, de forma significativa, a produção de gliceolina em cotilédones de soja, assim como a suspensão de micélio dos fitopatógenos *P. sojae* e *S. sclerotiorum*, superando os controles caldo de cana, água e Bion. Para a produção de faseolina em hipocótilos de feijão, não houve diferença significativa entre leveduras, micélio de fitopatógenos e os controles caldo de cana e Bion. Avaliando a produção de deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo, observou-se que as leveduras e suspensão de micélio de *S. sclerotiorum* diferiram de forma significativa dos controles água e Bion, porém não superaram caldo de cana (Tabela 6).

Tabela 6. Produção de gliceolina em cotilédones de soja (absorbância 285 nm grama de massa fresca⁻¹), faseolina em hipocótilos de feijão (absorbância 280 nm grama de massa fresca⁻¹) e deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo (absorbância 480 nm grama de massa fresca⁻¹).

TRATAMENTO	Gliceolina	Faseolina	Deoxiantocianidina
<i>L. thermotolerans</i>	0,84D	2,250 B	24,946 C
<i>S. cerevisiae</i>	0,64C	2,264 B	25,481 C
<i>H. opuntiae</i>	0,34B	2,655 B	22,196 C
CALDO DE CANA	0,34B	2,071 B	26,695 C
ÁGUA	0,15A	1,285 A	13,660 B
BION	0,10A	2,021 B	9,3140 A
<i>P. sojae</i>	0,65C	2,126 B	26,028 B
<i>S. sclerotiorum</i>	0,60C	2,391 B	23,298 C
<i>C. cassiicola</i>	0,24B	2,376 B	14,759 B
CV (%)	20	21	14

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os mecanismos de defesa da planta podem ser induzidos por elicitores bióticos, como fungos filamentosos, leveduras e moléculas por eles produzidas (oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos); ou abiótico (PASCHOLATI, 2011). As leveduras foram relatadas como potenciais agentes biocontroladores de patógenos por El-Tarabily e Sivasithamparam (2006), promovendo o crescimento das plantas e indução de resistência, por meio da produção das substâncias como fenilalanina amônia liase, fitoalexinas, peroxidases e etileno.

Neste experimento, os três isolados de leveduras apresentaram potencial em induzir maior atividade de peroxidase de guaiacol (GPOX), sendo que *L. thermotolerans* destacou-se 12 hpt e *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* 24 hpt. A peroxidase, no processo de defesa, reforça a parede celular através da formação de lignina, suberina e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (RANIERI et al., 2001), aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que atuam na sinalização e agem como agente antimicrobiano, e induz a produção de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999).

A ação da levedura *S. cerevisiae* foi avaliada no perfil eletroforético de peroxidase em plantas de milho e sorgo e observou-se que a suspensão de células ou o filtrado da levedura, tratadas termicamente ou não, foram capazes de alterar o padrão de atividade da enzima peroxidase (RONCATTO; PASCHOLATTI, 1998). Relatos da produção de peroxidases por *Auroeobasidium pullulans*, em frutos feridos de maçãs, indicam que isolados dessa levedura podem reduzir a incidência de doenças, por agir como indutor de resistência (HAISSAM, 1996).

A ativação dos mecanismos de defesa está relacionada à intensificação da formação de EROs e, devido à sua natureza danosa, as plantas utilizam sistemas enzimáticos como superóxido dismutase, peroxidases e catalase para diminuir o dano nas células do hospedeiro (SEDLAROVA et al., 2007).

A catalase (CAT) detoxifica H_2O_2 em plantas, catalisando sua dismutação em oxigênio e água, reduzindo o excesso de EROs durante o estresse oxidativo. Por outro lado, uma diminuição da atividade de enzimas como a catalase pode gerar o acúmulo de níveis críticos de H_2O_2 , que são necessários para a ativação de uma resposta de hipersensibilidade (VAN BREUSEGEM et al., 2001). A CAT teve seus picos de atividade registrados 12 hpt, induzida pelas três leveduras, e 24 hpt, induzida por *H. opuntiae*.

S. cerevisiae, *H. opuntiae* e *L. thermotolerans* induziram maior atividade de polifenoloxidase (PFO) 12 hpt. A PFO favorece a formação de H₂O₂ pela oxidação rápida dos fenóis. As quinonas, produtos de oxidação do ácido clorogênico pela PFO, podem atuar na defesa de plantas, gerando um ambiente tóxico que inibe o crescimento do patógeno, e formar barreiras fenólicas polimerizadas na parede celular, que dificultam a entrada de agressores (LI; BSTEFFENS, 2002).

As enzimas hidrolíticas, como as β -1,3 glucanase (GLU) e quitinase (QUI), atuam diretamente degradando a parede celular de fungos ou interrompendo sua deposição, o que contribui para a morte do patógeno. Também agem indiretamente, levando fragmentos da parede celular que atuam como elicitores de respostas de defesa na planta hospedeira (MAUCH et al., 1988). Neste trabalho, a GLU não teve sua atividade aumentada sob efeito do tratamento com fermentado produzido pelas leveduras. A enzima QUI teve sua atividade aumentada sob efeito de *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* somente 24 hpt.

Preparações de *S. cerevisiae*, com presença de células vivas ou não, alteraram o metabolismo da planta, aumentando a atividade das enzimas quitinase e glucanase, envolvidas na resistência sistêmica adquirida (GOUVEA et al., 2009).

O potencial de *S. cerevisiae* como agente de controle biológico está associada a mecanismos de indução de resistência, comprovados pelo aumento de enzimas, como peroxidase e quitinase (EL-SAYED, 2000). O aumento de atividade dessas enzimas foi também observado por Boava et al., (2010) em plantas de eucalipto previamente tratadas com *S. cerevisiae*. A mesma levedura, estudada por Khalid (2014), reduziu a incidência da doença causada por *Sclerotium rolfsii* em plantas de feijão, resultando em aumento na atividade da peroxidase, polifenoloxidase e quitinase.

Tomates tratados com *Pichia guilliermondii* apresentam alterações bioquímicas defensivas a *Rhizopus nigricans*, através das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, superóxido dismutase, catalase, quitinase e β -1,3-glucanase (ZHAO, 2008).

Em relação ao acúmulo de fitoalexinas, os isolados de *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* apresentaram potencial em induzir a produção de gliceolina. As fitoalexinas são definidas como compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, sintetizadas e acumuladas nas plantas após estresses físicos, químicos ou biológicos, como o contato com microorganismos, e seu papel na resistência a patógenos está relacionado com sua capacidade de reduzir ou impedir a atividade de agentes patogênicos (BRAGA, 2008).

Stangarlin et al., (2010) avaliaram a indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja pela levedura *Saccharomyces boulardii* e concluíram que tanto a levedura como seus derivados, como filtrado de cultura e produto à base de células, induzem a síntese das fitoalexinas gliceolina em soja e deoxiantocianidinas em sorgo.

Wulff e Pascholati, (1998) estudaram procedimentos para a purificação de elicitores de fitoalexinas em sorgo extraídos das células da levedura *S. cerevisiae* por autoclavagem, indicando serem termoestáveis. O acúmulo de fitoalexinas nos mesocótilos foi mais elevado quanto maiores os teores de proteínas das amostras elicitoras. Concluíram que *S. cerevisiae* estimula o acúmulo de fitoalexinas e tem potencial para ser utilizada como agente de controle alternativo no tratamento de doenças fúngicas em sorgo.

A atividade enzimática e o acúmulo de fitoalexinas, observados neste trabalho, podem ter sido induzidos por metabólitos produzidos pelas leveduras no processo fermentativo e que resistiram à autoclavagem e/ou à presença de componentes da parede celular das mesmas. Segundo Cabib et al., (1982), a parede celular de leveduras é constituída de uma camada externa de manoproteínas (polímeros de manose ligados a proteínas), com alguma quantidade de quitina, uma camada intermediária de glucana que confere rigidez à célula e a camada interna com conteúdo maior de proteínas.

Assim, as alterações ocorridas na atividade da enzimática, em resposta ao tratamento com fermentados, provavelmente deve-se ao fato das leveduras ou seus metabólitos, agindo como elicitores, sensibilizarem a planta, que altera seu metabolismo normal em resposta ao possível agressor.

5. CONCLUSÕES

O fermentado produzido por *L. thermotolerans* mostrou-se efetivo na indução da atividade das enzimas peroxidase, catalase e polifenoloxidase 12 hpt.

O fermentado produzido por *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* induziu a atividade das enzimas catalase e polifenoloxidase 12 hpt e peroxidase e quitinase 24 hpt.

O fermentado produzido por *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* apresentou potencial em induzir a produção de gliceolina.

REFERÊNCIAS

BAILEY, J. A.; BURDEN, R. S. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused by tobacco necrosis virus. **Physiological Plant Pathology**, v. 3, p. 171-177, 1983.

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

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

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ**, p. 305-346, 2008.

CABIB, E.; ROBERTS, S; BOWERS, B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, p. 763-793, 1982.

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

EL-SAYED S. Microbial agents as a plant growth promoting and roots protector. 10th ed. **Egypt: Microbiology conference**; p. 12-14, 2000.

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

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], pp. 109-112 . Disponível em: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

GOUVEA, A ; KUHN, O. J; MAZARO, S. M; MIO L. L. M; DESCHAMPS, C; BIASI, L. A; FONSECA, V. C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do

morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 527-533. 2009.

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: Rechcigl, N.A. & Rechcigl, J.E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, cap. 8, p. 177-199, 1997.

HAISSAM, J. M. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. **A van Leeuwenhoek**. v. 99, p. 93–105, 1996.

KHALID E. E. Biological control of bean damping-off caused by *Sclerotium rolfsii*. **Egypt Journal of Phytopathology**. 2014.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. **Plant Physiology**, v. 120, p. 501-512, 1999.

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

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, v. 215, p. 239–247, 2002.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 244-249, 1999.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase e β -1,3- glucanase. **Plant Physiology**, v. 88, p. 936-942, 1988.

NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HIPSKIND, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33. p. 271-278, 1988.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1 p. 593-633, 2011.

RANIERI, A. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 25-35, 2001.

RONCATTO, M. C, PASCHOLATTI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia agricola** v. 55, p. 395-402, 1998.

SEDLAŘOVA, M. et al. Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 607-616, 2007.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. da S.; MACAGNAN, D.; HALFELD,-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase enzyme activities. **Biological Control**, v. 29, p. 288-295, 2004.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. V. P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 137-144, 2008.

SILVA, S.R.; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v. 99, p. 159-167, 1992.

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

TOMANKOVA, K. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 22-32, 2006.

VAN BREUSEGEM, F. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-62, 2006.

ZHAO Y, TU K, SHAO X, JING W, SU Z. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. **Postharvest Biology Technology**, v. 49, p. 113–120, 2008.

ZIERGLER; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan- elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannn-glycoprotein of *Phytophthora megasperma f.sp.glycinea*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 300-310, 1982.

CAPÍTULO 3

Saccharomyces cerevisiae, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* no controle de fitopatógenos em casa de vegetação e a campo e seu efeito sobre o crescimento das plantas de soja

Saccharomyces cerevisiae, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* no controle de fitopatógenos em casa de vegetação e a campo e seu efeito sobre o crescimento das plantas de soja

RESUMO

A soja, principal cultura do agronegócio brasileiro, apresenta como um dos grandes fatores na queda do rendimento as doenças, sendo as mais impactantes a ferrugem asiática, mofo-branco, mancha-alvo, oídio e o complexo de doenças de final de ciclo. O controle biológico, através do uso de microrganismos, como leveduras, apresenta-se como uma ferramenta para o combate das doenças, em substituição ou em conjunto com os agroquímicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a eficiência de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* no controle de fitopatógenos, avaliando severidade das doenças em casa de vegetação e a campo e seu efeito sobre o crescimento das plantas de soja através das variáveis altura e massa fresca e seca de raiz e parte aérea, assim como a verificação das trocas gasosas através da assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração, concentração intercelular de CO₂, assimilação instantânea de CO₂ e relação transpiração/condutância estomática. Os fermentados produzidos pelas leveduras reduziram o progresso da doença mancha alvo em soja em casa de vegetação. O teor de clorofila em plantas tratadas com fermentado e inoculadas com patógeno aumentou de forma expressiva, porém as variáveis fotossintéticas não foram afetadas. Quanto ao crescimento, as plantas de soja tratadas com fermentado produzido pelas leveduras apresentaram maior altura, porém não superaram em massa fresca e seca de raiz e parte aérea as plantas controle. A campo, o fermentado produzido pelas leveduras não apresentou um controle efetivo dos fitopatógenos de ocorrência natural.

Palavras-chave: Doenças da soja. Severidade. Controle biológico. Leveduras.

Saccharomyces cerevisiae, *Hanseniaspora opuntiae* and *Lachancea thermotolerans* in the control of phytopathogens in greenhouse and the field and their effect on the growth of soybean plants

ABSTRACT

Soybean, the main crop of the Brazilian agribusiness, presents as one of the great factors in the fall of yield the diseases being the most striking the Asian rust, white mold, target spot, powdery mildew and end-of-cycle disease complex. Biological control, through the use of microorganisms as yeasts, is presented as a tool to combat diseases in substitution or in conjunction with agrochemicals. Thus, the objective of this work was to determine the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* and *Lachancea thermotolerans* in the control of phytopathogens, evaluating the severity of the diseases in greenhouse and field and their effect on the growth of soybean plants through the variables height and fresh and dry mass of root and aerial part as well as the verification of the gas exchanges through the net assimilation of CO₂, stomatal conductance, transpiration, intercellular concentration of CO₂, instant assimilation of CO₂ and transpiration / stomatal conductance relationship. Ferments produced by the yeast reduced the progress of the disease target spot in soybeans under greenhouse conditions. The chlorophyll content in plants treated with fermented and inoculated with pathogen increased significantly, but the photosynthetic variables were not affected. Regarding the growth, soybean plants treated with fermented yeast produced higher height, but did not outperform the control plants in fresh and dry root and shoot mass. At the field level, the fermented yeast produced did not present an effective control of naturally occurring plant pathogens.

Keywords: Soybean diseases. Severity. Biological control. Yeasts.

1. INTRODUÇÃO

A soja, principal cultura do agronegócio brasileiro e uma das principais culturas a nível mundial, apresenta como um dos grandes fatores na queda do rendimento as doenças. A sanidade das plantas é de grande importância para economia, pois as doenças de plantas reduzem a produção, causando prejuízos econômicos. Para Martins (2007), um dos principais fatores que contribuem para reduzir o rendimento da cultura da soja são as doenças, e as mais impactantes são a ferrugem asiática, mofo-branco, mancha-alvo, oídio e o complexo de doenças de final de ciclo.

A estratégia mais utilizada para o manejo de doenças é o uso de cultivares de plantas resistentes. Porém, para algumas doenças, ainda não é disponível ou eficaz e exige outros métodos de controle, dentre os quais o mais empregado é a aplicação de fungicidas (MOHANRAJ et al., 2002).

O controle biológico apresenta-se como uma ferramenta para o combate das doenças, em substituição ou em conjunto com os agroquímicos, tornando a produção de alimentos mais sustentável. As leveduras apresentam diferentes propriedades que as caracterizam como candidatas ao controle de fitopatógenos. A habilidade destes microrganismos em assimilar diversos compostos orgânicos aumenta sua capacidade de dispersão e sobrevivência em distintos ambientes. Outros modos de ação antagônica são a produção de enzimas hidrolíticas, produção de compostos antibióticos, indução de resistência no hospedeiro, além de produzirem compostos promotores de crescimento vegetal (ROSA, 2009).

A promoção de crescimento proporcionada por microrganismos pode ocorrer de forma direta, através da produção de hormônios vegetais, da disponibilização de nutrientes, da absorção e translocação de minerais, e de forma indireta, pelo controle de patógenos (BOTTINI et al., 2004).

A redução no crescimento e a consequente diminuição na produtividade das plantas pode estar relacionada à redução na atividade fotossintética, limitada por fatores abióticos e bióticos. A maior parte da produção biológica das plantas ocorre em resposta à atividade fotossintética. Assim, a verificação das trocas gasosas constitui-se como importante ferramenta na determinação de adaptação e estabilidade de plantas frente às adversidades do ambiente e ao ataque de fitopatógenos (PAIVA et al., 2005).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a eficiência de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Lachancea thermotolerans* no controle de fitopatógenos em casa de vegetação e a campo e seu efeito sobre o crescimento das plantas de soja através das variáveis altura e massa fresca e seca de raiz e parte aérea, assim como a verificação das trocas gasosas através da assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração, concentração intercelular de CO₂, assimilação instantânea de CO₂ e relação transpiração/condutância estomática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo das leveduras e das plantas de soja

Os fungos leveduriformes *S. cerevisiae* CCMA 0757, *H. opuntiae* CCMA 0760 e *L. thermotolerans* CCMA 0763, pertencentes à Coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética da Universidade Federal de Lavras, foram cultivados em caldo de cana, a 25 °C, a partir da concentração inicial de 10^4 células mL⁻¹, de uma suspensão em água das células das leveduras crescidas em meio batata-dextrose-ágar (BDA), determinada em câmara de Neubauer. O meio de cultura de caldo de cana foi previamente preparado na proporção 3:1 (v:v) de caldo de cana e água, autoclavados a 120 °C por 20 minutos.

O fim do período de cultivo, aproximadamente sete dias, foi determinado ao encerrar o processo fermentativo, observado pelo fim da produção de gás carbônico e pela mudança de coloração do meio, que se tornou mais clara.

As plantas de soja, cultivar INT 6100, foram cultivadas em vasos de três litros, contendo solo não peneirado e não autoclavado. Quando as plantas estavam no estágio V4 (terceiro trifólio totalmente expandido) foram tratadas a cada sete dias, durante quatro semanas, até o ponto de escorrimento, com caldo fermentado dos fungos leveduriformes na concentração de 25%. Como controle, utilizou-se caldo de cana não fermentado e autoclavado, diluído a 25% em água, fungicida Mancozeb (200g. 100 L de água⁻¹) e indutor Acibenzolar-S- Metílico (ASM), produto comercial Bion® (5g. 100 L de água⁻¹).

2.2 Inoculação do patógeno e severidade da doença

A inoculação do patógeno *C. cassiicola* foi realizada 24h após o primeiro tratamento das plantas com o fermentado produzidos pelas leveduras. Preparou-se uma suspensão 3.10^5 esporos mL⁻¹ retirado de inóculo com sete dias de crescimento em BDA e pulverizou-se sobre as plantas. Após a inoculação, para se obter efeito de câmara úmida, as plantas foram cobertas com plástico, no período noturno, durante três dias.

A severidade da doença foi avaliada a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, em nove folhas por planta, devidamente identificadas. Foram realizadas quatro avaliações com cinco dias de intervalo. Utilizou-se escala diagramática para avaliação da severidade da

mancha alvo da soja, proposta por Soares et al., (2009), e os valores de doença foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), utilizando a fórmula a seguir:

$$AACPD = \sum_i^{n-1} [(x_i + x_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)]$$

na qual n é o número de avaliações, x_i é a proporção da doença e $(t_{i+1} - t_i)$ é o intervalo de avaliações consecutivas.

2.3 Efeito das leveduras no crescimento das plantas

Foi avaliada, semanalmente, a altura das plantas tratadas com o fermentado e inoculadas com o patógeno e plantas somente tratadas com fermentado produzido pelas leveduras, medindo-se a distância vertical entre a superfície do solo e o último nó da haste principal das plantas, com os valores apresentados em centímetros.

Trinta dias após o tratamento, as plantas tratadas com o fermentado e inoculadas com o patógeno e plantas somente tratadas foram retiradas dos vasos e suas raízes lavadas em água destilada, para remoção dos fragmentos de solo aderidos às mesmas. Após separação, a parte aérea e raízes foram pesadas em balança analítica para obter a massa fresca da parte aérea (MFPA) e raiz (MFR). Posteriormente, o material foi acondicionado em sacos de papel e conduzido à estufa para secagem a 60 °C por cinco dias. Após esse período, as amostras foram pesadas novamente para obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR). Os valores de massa foram expressos em gramas.

2.4 Determinação de variáveis de trocas gasosas e teor de clorofila

As variáveis de trocas gasosas foram medidas em plantas tratadas com o fermentado e inoculadas com o patógeno com um analisador de gás infravermelho (IRGA, ADC, modelo LCI Pro, Hoddesdon, UK). Foram determinadas as variáveis: assimilação líquida de CO₂ (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração (E, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e

concentração intercelular de CO₂ (C_i, μmol mol⁻¹). Através dos dados de A, g_s, E e C_i, foi obtida a assimilação instantânea de CO₂ através da razão A/C_i, e relação transpiração/condutância estomática (E/g_s). As análises de trocas gasosas foram realizadas sempre na porção mediana de duas folhas mais jovens, completamente expandidas, em cada planta, entre 7 e 10h da manhã (MORIANA et al., 2002)

Para a quantificação da clorofila, 14 dias após inoculação do patógeno, tomou-se amostras de tecido vegetal de plantas tratadas com o fermentado e inoculadas com o patógeno e plantas somente tratadas. As amostras foram pesadas e acondicionadas em frascos de vidro contendo 10 mL de acetona 80%, durante 7 dias no escuro a 25 °C . Após esse período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 663 nm e a 645 nm para clorofila *a* e *b*, respectivamente. A concentração de clorofila *a* foi determinada pela fórmula (0,0127.A₆₆₃)-(0,00269.A₆₄₅) e clorofila *b* pela fórmula (0,0229.A₆₄₅)-(0,00468.A₆₆₃). O teor de clorofila total deve ser obtido pela soma dos resultados dos conteúdos de clorofila *a* e *b*. Os valores foram expressos em mg g⁻¹ tecido fresco (VIECELLI et al., 2009).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (fermentado a 25% das leveduras *S. cerevisiae*, *H. opuntiae* e *L. thermotolerans*, caldo de cana 25%, Bion e fungicida) e cinco repetições, sendo cada planta uma repetição. As interações entre tratamentos e plantas inoculadas e não inoculadas foram submetidas à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05), utilizando o pacote estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

2.5 Ensaio a campo

Em condições de campo, o ensaio foi realizado na época safrinha (semeadura em maio/ 2015) com a cultivar de soja INT 6100. Realizou-se três aplicações, com intervalos de sete dias a partir do estágio V3 (segundo trifólio aberto), com caldo fermentado dos fungos leveduriformes *S. cerevisiae*, *H. opuntiae* e *L. thermotolerans* na concentração de 25% com pulverizador costal tipo CO₂ com vazão de 200 L. ha⁻¹. Como controle, utilizou-se caldo de cana não fermentado e autoclavado, diluído a 25% em água, fungicida Mancozeb (200g. 100 L de água⁻¹) e indutor Acibenzolar-S- Metílico (ASM), produto comercial Bion® (5g. 100 L de água⁻¹).

Avaliou-se a produtividade, expressa em Kg ha^{-1} , e a ocorrência natural das doenças nas plantas de soja que receberam os tratamentos preventivamente. Foi realizada uma única avaliação de incidência e severidade em oito folíolos (terço médio e superior) de oito plantas, nas linhas centrais das parcelas, quando as plantas estavam em R3 (final da floração: flores e vagens com até 1,5cm). Utilizou-se escala diagramática para avaliação da Ferrugem (causada por *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P.Syd), Crestamento foliar de cercospora (causado por *Cercospora kikuchii* Matsu. & Tomoyasu) e Oídio (causado por *Microsphaera diffusa* (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takam) proposta por Godoy et al., (2006), Martins et al., (2004) e Mattiazzi et al., (2003), respectivamente. O delineamento estatístico foi em blocos casualizado (DBC) com 4 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o pacote estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

3.RESULTADOS

Aplicações semanais, em casa de vegetação, do fermentado autoclavado produzido pelas leveduras reduziram o progresso da doença em magnitude semelhante ao tratamento com Bion (Figura 1). Não houve incidência da doença em plantas tratadas com fungicida, por outro lado, em plantas tratadas com caldo de cana, a velocidade de aparecimento dos sintomas foi significativamente maior em todas as avaliações.

Na avaliação da AACPD da mancha alvo (Figura 2) constatou-se que aplicação do fermentado de *S. cerevisiae* se destacou, apresentando resultado análogo ao tratamento com Bion, reduzindo a AACPD 78 % em relação ao caldo de cana. As leveduras *H. opuntiae* e *L. thermotolerans*, embora não tenham apresentado êxito semelhante à *S. cerevisiae*, mostraram-se melhor que o tratamento com caldo de cana, reduzindo a AACPD 50% e 47%, respectivamente.

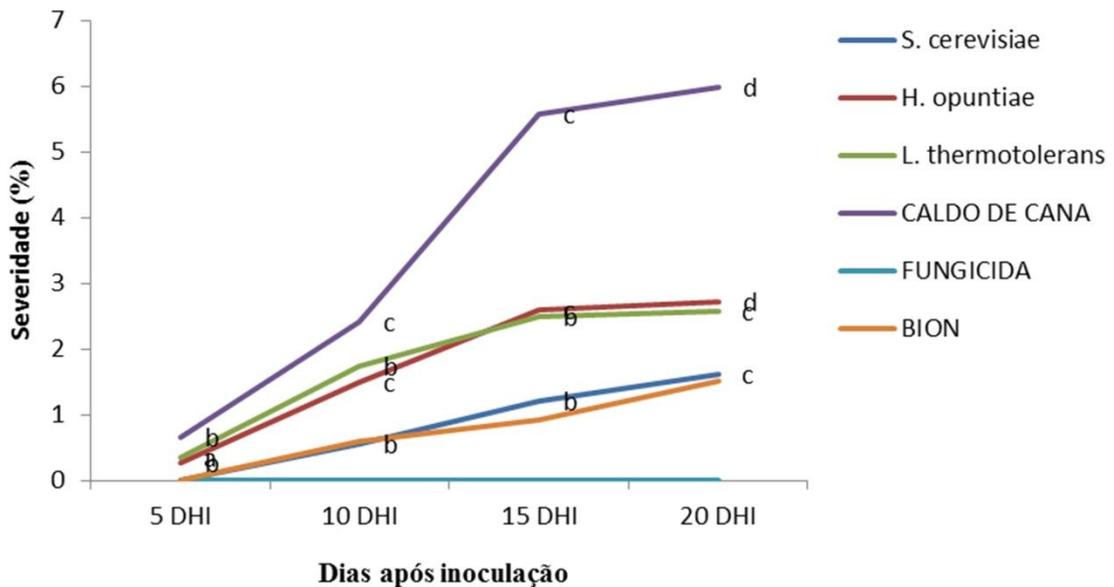


Figura 1. Progresso da doença ao longo do tempo, 5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação do patógeno. Tratamentos seguidos de mesma letra minúscula, dentro de cada tempo de avaliação, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

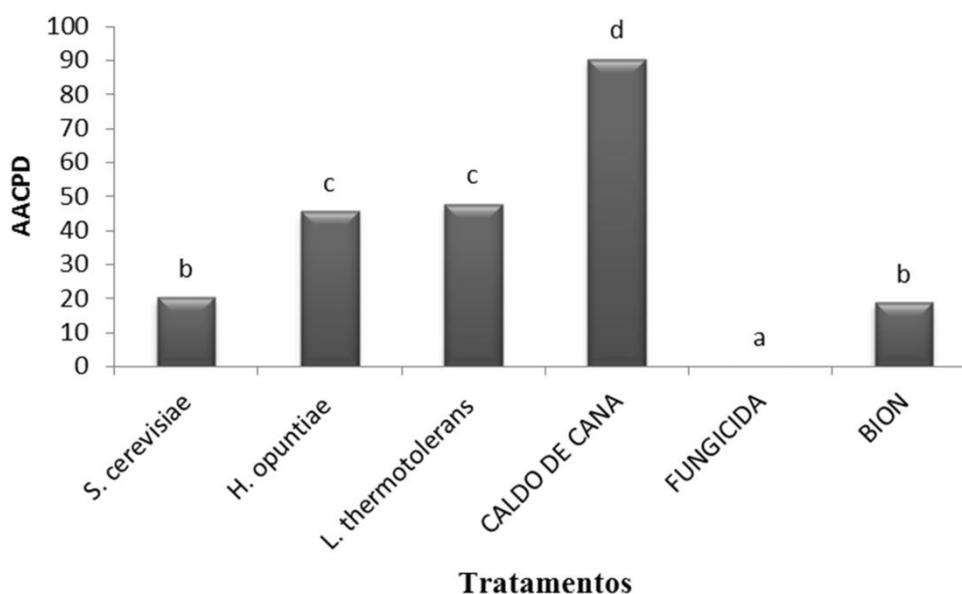


Figura 2. Área abaixo da curva de progresso da doença. Tratamentos seguidos de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Plantas de soja tratadas com fermentado produzido pelas leveduras e Bion apresentaram crescimento significativamente maior que plantas tratadas com caldo de cana e fungicida (Tabela 1). A levedura *S. cerevisiae* destacou-se tanto em plantas inoculadas com patógeno como em plantas não inoculadas, embora não tenha sido observada diferença significativa entre as mesmas para nenhum dos tratamentos.

Tabela 1. Altura, em cm, de plantas de soja, em função do desdobramento da interação entre tratamentos e plantas inoculadas ou não com *Corynespora cassiicola*.

TRATAMENTO	COM INOCULAÇÃO	SEM INOCULAÇÃO
<i>L. thermotolerans</i>	45,0 Ca	45,1 Ba
<i>S. cerevisiae</i>	47,7 Ca	49,6 Ca
<i>H. opuntiae</i>	42,7 Ba	45,0 Ba
CALDO DE CANA	38,3 Aa	39,1 Aa
FUNGICIDA	40,3 Aa	41,3 Aa
BION	43,8 Ca	44,9 Ba
CV (%)		5,12

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Plantas de soja, inoculadas e não inoculadas com patógeno, tratadas com caldo de cana, apresentaram maior MFPA, MFR, MSPA e MSR (Figura 3). Plantas inoculadas com patógeno e tratadas com fermentado das leveduras *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae*

apresentaram MFPA e MSPA (Figura 3 A, C) estatisticamente semelhante às plantas tratadas com caldo de cana. As plantas não inoculadas que obtiveram resultado semelhante às tratadas com caldo de cana foram as que receberam tratamento com fermentado de *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* para MFPA e Bion para MSPA. Para MFR e MSR (Figura 3 B, D), nenhum dos tratamentos assemelhou-se estatisticamente às plantas tratadas com caldo de cana, tanto em plantas inoculadas como as não inoculadas com patógeno.

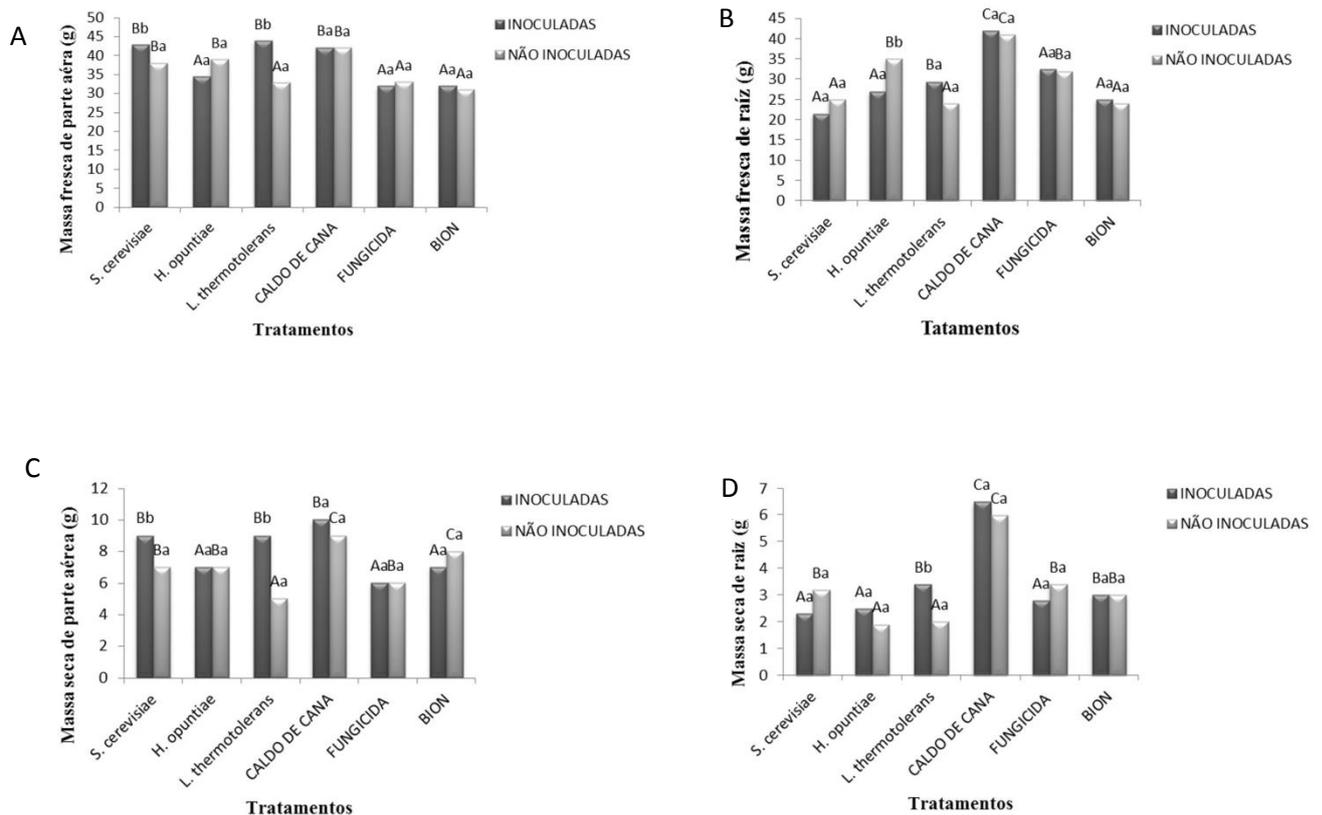


Figura 3. Massa fresca (g) de parte aérea (A) e raiz (B) e massa seca (g) parte aérea (C) e raiz (D) em plantas de soja inoculadas e não inoculadas com patógeno. Tratamentos seguidos de mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) para desdobramento da interação dos tratamentos dentro de plantas inoculadas e não inoculadas. Tratamentos seguidos de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) para desdobramento da interação de plantas inoculadas e não inoculadas dentro dos tratamentos.

A aplicação dos fermentados produzidos pelas leveduras não afetou significativamente as variáveis fotossintéticas de assimilação líquida de CO_2 (A), carboxilação instantânea de CO_2 (A/Ci), condutância estomática (gs) e transpiração (E) (Figura 4 A, B,C,E). Entretanto, a

concentração interna de CO₂ (C_i) foi reduzida e a relação transpiração/condutância estomática (E/gs) aumentou de forma significativa em plantas tratadas com fermentado de *S. cerevisiae* e *H. opuntiae* (Figura 4 D,F).

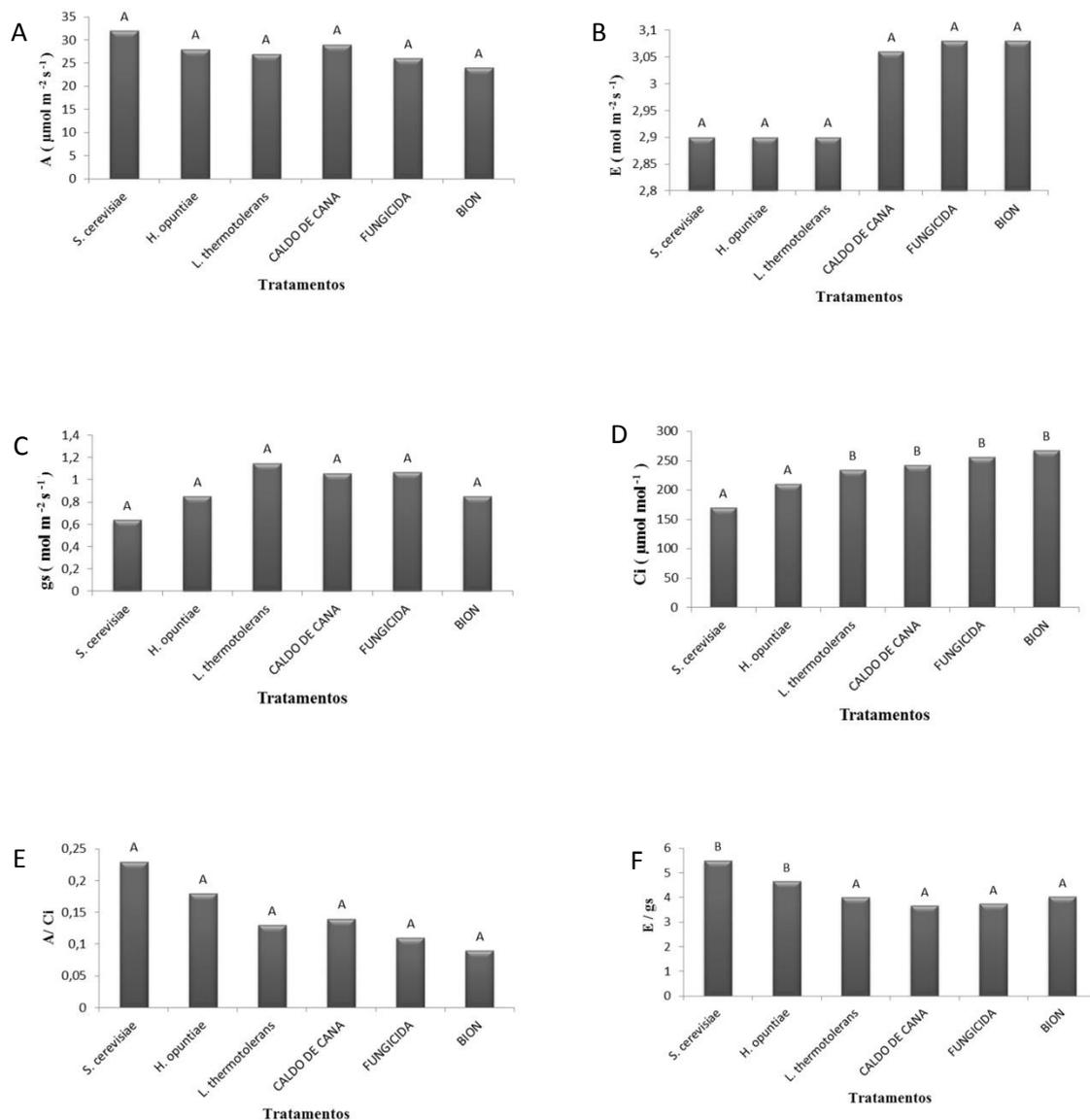


Figura 4. Efeito dos tratamentos sobre a (A) assimilação líquida de CO₂ (A), (B) transpiração (E), (C) condutância estomática (gs), (D) concentração interna de CO₂ (Ci), (E) carboxilação instantânea de CO₂ (A/Ci) e (F) relação transpiração/condutância estomática (E/gs) de plantas de soja. Tratamentos seguidos de mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos demonstraram que nos tecidos foliares das plantas de soja inoculadas com o patógeno, que receberam como tratamento o fermentado produzido pelas leveduras, ocorreu aumento da quantidade de clorofila em relação às plantas tratadas com caldo de cana, fungicida e Bion (Tabela 2). No entanto, não foram observados os mesmos resultados entre os tratamentos em plantas não inoculadas, havendo, inclusive, uma diminuição no teor de clorofila de

plantas sem inoculação do patógeno em relação às plantas inoculadas e tratadas com *L. thermotolerans* e *H. opuntiae*.

Tabela 2. Teor de clorofila (valores expressos em mg g⁻¹ tecido fresco) em folhas de soja, em função do desdobramento da interação entre tratamentos e plantas inoculadas ou não com *Corynespora cassiicola*.

TRATAMENTO	COM INOCULAÇÃO	SEM INOCULAÇÃO
<i>L. thermotolerans</i>	0,371 Cb	0,242 Aa
<i>S. cerevisiae</i>	0,351 Ca	0,338 Ba
<i>H. opuntiae</i>	0,335 Cb	0,282 Ba
CALDO DE CANA	0,265 Aa	0,255 Aa
FUNGICIDA	0,307 Ba	0,314 Ba
BION	0,309 Ba	0,307 Ba
CV (%)		8,55

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Em condições de campo, constatou-se 100% de incidência das doenças Oídio, Crestamento foliar de cercospora e Ferrugem. O nível de eficiência das leveduras foi considerado baixo em relação aos resultados de casa de vegetação. Não houve diferença significativa entre plantas tratadas com o fermentado produzido pelas leveduras e os controles para a produtividade e severidade de Oídio. A severidade de Crestamento foliar de cercospora e Ferrugem foi significativamente maior em plantas tratadas com fermentado das leveduras e caldo de cana quando comparada a de plantas que receberam como tratamento fungicida e Bion (Tabela 3).

Tabela 3. Produtividade (expressa Kg ha⁻¹) e severidade (%) da das doenças Oídio, Crestamento foliar de cercospora e Ferrugem em soja.

TRATAMENTO	Kg. ha ⁻¹	Oídio	Crestamento foliar de cercospora	Ferrugem
<i>L. thermotolerans</i>	395A	32A	23C	37B
<i>S. cerevisiae</i>	410A	27A	26C	42B
<i>H. opuntiae</i>	330A	28A	27C	40B
CALDO DE CANA	490A	37A	25C	43B
FUNGICIDA	755A	28A	12A	20A
BION	345A	25A	20B	17A
CV (%)	48	19	21	11

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O fermentado autoclavado produzido pelas leveduras reduziu o progresso da doença mancha alvo em soja, em casa de vegetação. Em contrapartida, em plantas tratadas com caldo de cana a velocidade de aparecimento dos sintomas foi significativamente maior em todas as avaliações. O caldo de cana, por ser rico em açúcares, pode ter favorecido germinação dos conídios de *C. cassiicola*, visto que algumas espécies de fungos precisam de fonte de energia externa ao esporo para germinarem.

Diferentes funções têm sido atribuídas às leveduras encontradas no ambiente, como a solubilização de fosfatos no solo, agentes no biocontrole de patógenos de pós colheita, além de produzirem compostos promotores de crescimento vegetal, como hormônios vegetais e sideróforos. Na literatura, encontra-se muitos relatos da utilização das leveduras no controle biológico, mas ainda há muito para ser estudado, principalmente sobre o seu modo de ação frente a diferentes patossistemas. (ROSA, 2009).

Frações do extrato de *S. cerevisiae* foram purificadas e determinou-se sua eficiência na proteção de plântulas de pepino a *Colletotrichum lagenarium* em casa de vegetação. Os cotilédones tratados com os extratos brutos autoclavados apresentaram redução significativa de 82 a 86% na severidade da doença quando comparados aos cotilédones tratados com água. A suspensão de células de *S. cerevisiae* não autoclavada, entretanto, não apresentou efeito protetor significativo nas plântulas (ZANARDO et al., 2009).

Resultados diferentes foram obtidos ao avaliar o desenvolvimento das doenças do morangueiro e a qualidade pós-colheita dos frutos. Testou-se o efeito de preparações de *S. cerevisiae*, como suspensão com fermento biológico fresco, suspensão de células de levedura, suspensão autoclavada de células e filtrado de cultura em meio líquido. Todos os tratamentos, com exceção do tratamento com suspensão autoclavada de células, reduziram a incidência de mofo-cinzento em pós-colheita de frutos (GOUVEA et al., 2009).

Rosa, (2009) avaliou o controle biológico de *Colletotrichum sublineolum* em sorgo pela levedura de *Torulaspota globosa* em casa-de-vegetação, por um período de seis semanas. A levedura mostrou-se eficiente para controlar o patógeno, uma vez que houve uma redução no progresso da doença em relação ao controle.

O mesmo patossistema, *C. sublineolum* em sorgo, também foi avaliado utilizando como levedura antagonista *S. cerevisiae*. Observou-se que a aplicação da levedura uma única vez nas plantas não foi capaz de controlar o fungo em campo, porém a aplicação semanal da levedura

apresentou bons resultados no controle da doença, semelhantes aos observados com aplicação do tratamento químico (PICCININ et al., 2005).

Em meloeiro, Cruz (2010) testou isolados de leveduras para o controle da podridão-de-fusário (*Fusarium pallidoroseum* (Cooke) Sacc.) em frutos e verificou que algumas leveduras reduziram pelo menos 10% da severidade da doença, com destaque para *Candida guilliermondii*, que proporcionou redução de 70,9%.

Cerca de 90% da produção biológica das plantas ocorre em resposta à atividade fotossintética. Desse modo, a verificação das trocas gasosas constitui-se em importante ferramenta na determinação do desenvolvimento de plantas em diferentes ecossistemas, pois diminuições no crescimento e na produtividade podem estar relacionadas a reduções na fotossíntese (FLOSS, 2004). A invasão da planta por um patógeno causa reduções na sua atividade fotossintética. A porcentagem do tecido foliar com sintomas da doença nem sempre reflete adequadamente o efeito do patógeno, pois decréscimos na fotossíntese podem ser maiores do que a área lesionada (BASSANEZI et al., 1997).

A concentração de pigmentos, como clorofilas nas folhas, e a integridade da membrana são determinantes para a manutenção da assimilação líquida de CO₂ em plantas (MATSUDA et al., 2004). Neste trabalho, embora o teor de clorofila em plantas tratadas com fermentado e inoculadas com patógeno *C. cassiicola* tenha aumentado de forma expressiva, a aplicação dos fermentados produzidos pelas leveduras não afetou significativamente as variáveis fotossintéticas.

A taxa de crescimento relativo das plantas pode estar associada com a taxa de assimilação líquida de CO₂, quando se relaciona a taxa fotossintética à quantidade de área foliar disponível para a interceptação de luz e à alocação da biomassa foliar, o que significa o ganho de carbono através da fotossíntese e a perda de carbono através da respiração (JAMES ; REBECCA, 2007).

De acordo com variáveis avaliadas para crescimento neste trabalho, plantas de soja tratadas com fermentado produzido pelas leveduras apresentaram maior altura, porém não superaram em MFPA e MFR as plantas tratadas somente com caldo de cana.

Existem muitas pesquisas mostrando o efeito de bactérias na promoção de crescimento de plantas, mas poucos trabalhos avaliam as leveduras com essa função. Shalaby e El-Nady (2008), testaram a levedura *S. cerevisiae* visando à promoção de crescimento de plantas de beterraba açucareira e observaram que, quando aplicada ao solo, aumentou a área foliar, o comprimento da raiz, o diâmetro da raiz e o peso fresco e seco da raiz.

As leveduras *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis* e *Pichia anomala* não promoveram de forma significativa o crescimento das plantas de meloeiro em relação ao controle, avaliado pelas variáveis MFPA, MFR, MSPA e MSR, comportando-se de forma semelhante às plantas tratadas com Bion (MELO, 2012).

A levedura *T. globosa*, embora apresente formas diretas de estímulo ao desenvolvimento vegetal, pela capacidade de produção de auxinas (AIA) e solubilização de fosforo e potássio, não promoveu o crescimento de plantas de sorgo, uma vez que altura e massa seca da parte aérea não diferiram do tratamento controle (ROSA, 2009).

Os fermentados produzidos pelas leveduras, embora tenham possíveis mecanismos de ação sobre patógenos e/ou indução de resistência, apresentam, neste trabalho, índices de controle abaixo daqueles esperados em um efetivo controle biológico a nível de campo.

O clima chuvoso, que foi predominante durante a condução do experimento, favoreceu a disseminação dos patógenos entre as plantas, demonstrada pela elevada severidade das doenças, principalmente da Ferrugem.

Dentre as causas da baixa eficiência do controle obtido, pode ser citada a alta agressividade dos patógenos, decorrente dos fatores ambientais existentes no local, uma vez que a época de semeadura não é recomendada e o cultivo anterior com mesma cultura tenha contribuído para aumentar a fonte e o potencial de inóculo.

5. CONCLUSÕES

Os fermentados produzidos pelas leveduras reduziram o progresso da doença mancha alvo em soja em casa de vegetação.

O teor de clorofila em plantas tratadas com fermentado e inoculadas com patógeno *C. cassiicola* aumentou de forma expressiva.

A aplicação dos fermentados produzidos pelas leveduras não afetou significativamente as variáveis fotossintéticas.

Plantas de soja tratadas com fermentado produzido pelas leveduras apresentaram maior altura, porém não superaram em MFPA e MFR as plantas controle.

O fermentado produzido pelas leveduras não apresentou um controle efetivo a nível de campo.

REFERÊNCIAS

- BASSANEZI, R. B.; MARTINS, M. C. ; GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A. Efeito da antracnose na eficiência fotossintética do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 520-524, 1997.
- BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.65, p.497-503, 2004.
- CRUZ, T. M. **Potencial de leveduras no controle biológico da podridão-de-Fusário em frutos de meloeiro**. 2010, 64f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagramatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, n. 1, p. 63-68, 2006.
- GOUVEA A; KUHN OJ; MAZARO SM; MIO LLM; DESCHAMPS C; BIASI LA; FONSECA VC. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. *Horticultura Brasileira*, v. 27, p.527-533, 2009.
- FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], pp. 109-112 . Disponível em: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas**. Passo Fundo: Ed. da UPF, 2004.
- JAMES, J.J. ;REBECCA, E.D. 2007. **A basis for relative growth rate differences between native and invasive forb seedlings**. *Rangeland Ecology ; Management* 60: 395-400.
- MARTINS, M.C., GUERZONI, R.A., CÂMARA, G.M.S., MATTIAZZI, P., LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira* v. 29, p. 179-184. 2004.
- MARTINS, F. G.; **Desenvolvimento de modelos de ponto crítico para quantificação de danos causados pelo complexo de doenças foliares em soja**. 2007. 190f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, Passo Fundo.
- MATTIAZZI, P. et al. **Escala diagramática para avaliação da severidade do oídio em soja**. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, XXV, 2003, Uberaba. Resumos...Londrina: Embrapa soja, 2003. p.168 .
- MATSUDA, R.; OHASHI-KANEKO, K.; FUJIWARA, K.; GOTO, E.; KURATA, K. Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant Cell Physiology*, v.45, p.1870-1874, 2004.

MELO, E.A. **Eficácia de leveduras no biocontrole da mancha aquosa em meloeiro**. 2012, 58f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MOHANRAJ, D.; PADMANABAN, P.; VISWANATHAN, R. Biological control of sugarcane diseases. In: GNANAMANICKAN, S.S. (Ed.). **Biological Control of Crop Diseases**. p.161-78, 2002.

MORIANA, A.; VILLALOBOS, F.; FERERES, E. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 3, p.395-405, 2002.

PAIVA, A. S. et al. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 1, p. 161-169, 2005.

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

ROSA, M.M. **Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos**. Rio claro, 2009,169f. Tese - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências , Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

SHALABY, M. E. S.; EL-NADY, M. F. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n. 2, p. 271-275, 2008.

SOARES, R. M.; GODOY, C.V.; OLIVEIRA, M. C. N. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n.5, p.333-338, 2009.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p, 87-96. 2009.

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

CAPÍTULO 4

Atividade de *Hanseniopsis opuntiae* no sistema planta-patógeno *Arabidopsis thaliana*-
Botrytis cinerea

Atividade de *Hanseniaspora opuntiae* no sistema planta-patógeno *Arabidopsis thaliana*- *Botrytis cinerea*

RESUMO

As plantas continuamente lutam contra patógenos para sobreviver. Os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para protegerem-se dos patógenos compreendem barreiras constitutivas e respostas de defesa induzidas. As leveduras são microrganismos que apresentam propriedades para o controle de doenças de plantas. Nesse estudo, caracterizou-se a atividade do filtrado produzido por *Hanseniaspora opuntiae* no sistema planta-patógeno *Arabidopsis thaliana*- *Botrytis cinerea*. Para isso, avaliou-se o efeito das concentrações de 20, 30, 40 e 50% do filtrado de *H. opuntiae* sobre o crescimento micelial do patógeno *in vitro* e a severidade da doença em plantas de *A. thaliana* inoculada com *B. cinérea*. Para todas as concentrações do filtrado testadas, houve diferença significativa comparada ao controle, com destaque para a concentração de 50 %, que apresentou pronunciado efeito de inibição sobre o patógeno, maior que 80 %, tanto *in vitro* como *in vivo*. Além do efeito direto sobre o patógeno, constatou-se, pela análise quantitativa em tempo real da PCR (qRT-PCR), que as vias induzidas são dependentes de ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), ou seja, o filtrado também pode atuar como indutor de respostas de defesa na planta contra o patógeno.

Palavras-chave: Elicitores. Levedura. Vias de sinalização. Defesa de plantas.

Activity of *Hanseniaspora opuntiae* in plant-pathogenic system
Arabidopsis thaliana- *Botrytis cinerea*

ABSTRACT

Plants continually fight against pathogens to survive. The mechanisms developed by plants to protect themselves from pathogens include constitutive barriers and induced defense responses. Yeasts are microorganisms that have properties for the control of plant diseases. In this study the filtrate activity produced by *Hanseniaspora opuntiae* was characterized in the plant pathogen *Arabidopsis thaliana*- *Botrytis cinerea*. The effect of the concentrations of 20, 30, 40 and 50% of the *H. opuntiae* filtrate on mycelial growth of the pathogen *in vitro* and the severity of the disease in *A. thaliana* plants inoculated with *B. cinerea* were evaluated. For all the concentrations of the filtrate tested there was a significant difference compared to the control, with emphasis on the concentration of 50% that showed a pronounced effect of inhibition on the pathogen, greater than 80%, both *in vitro* and *in vivo*. In addition to the direct effect on the pathogen, by the quantitative real-time PCR analysis (qRT-PCR), the induced pathways were dependent on salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET), or filtering can also act as an inducer of defense responses in the plant against the pathogen.

Keywords: Elicitors. Yeast. Signaling pathways. Defense of plants.

1. INTRODUÇÃO

Assume-se, em Fitopatologia, que imunidade é regra e suscetibilidade exceção (AGRIOS, 2005). As plantas continuamente lutam contra patógenos para sobreviver. Os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para protegerem-se dos patógenos compreendem barreiras constitutivas e respostas de defesa induzidas. Tais mecanismos de defesa podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados. A cutícula, a parede celular e as fitoanticipinas são barreiras físicas e químicas pré-formadas que limitam o acesso do microrganismo agressor às células vegetais (UNDERWOOD, 2012). As respostas induzidas incluem a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), reforço de paredes celulares (papilas, halos e lignificação), síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), acúmulo de fitoalexinas e indução da expressão de genes, proporcionando proteção contra patógenos (GARCION et al., 2007).

Além da resposta imune inata que permanece localizada no local celular da invasão de patógenos, o reconhecimento desses agressores pelas plantas também pode ativar a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (SIR). A SAR envolve o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com Patogênese), sua indução é salicilato-dependente e pode resultar em alterações visuais na planta que sofreu indução. No caso de SIR, não há acúmulo de PRPs, a planta não exhibe alterações visuais, normalmente induzida por um microrganismo não patogênico, e sua indução está associada a jasmonatos e etileno (MÉTRAUX, 2001).

Os mecanismos de defesa da planta podem ser induzidos por elicitores bióticos (fungos filamentosos, leveduras, bactérias ou partículas virais) e moléculas por eles produzidas (oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos); ou abióticos, como compostos orgânicos ou inorgânicos (metais pesados) e luz ultravioleta. O elicitor liga-se a um receptor na superfície da célula vegetal e através dele o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações compatíveis (doença) ou incompatíveis (resistência) (PASCHOLATTI, 2011).

As leveduras apresentam características competitivas e metabólicas que permitem controlar doenças de plantas. Alguns mecanismos identificados nas leveduras são: competição por espaço e nutrientes, indução de resistência no hospedeiro e produção de metabólitos antifúngicos. Leveduras conseguem reproduzir-se rapidamente e ocupam, de forma

competitiva, os locais de infecção fúngica nas plantas, por isso se destacam como alternativa sugerida para o controle biológico (ROSA- MAGRI et al., 2011).

A fim de explorar o potencial de leveduras no controle de fitopatógenos, caracterizou-se a atividade de *Hanseniaspora opuntiae* no sistema planta-patógeno *Arabidopsis thaliana*-*Botrytis cinerea* De Bary Whetzel, 1945. Assim, realizou-se experimentos *in vitro* e *in vivo* usando diferentes concentrações do filtrado produzido pela levedura, avaliando a inibição do crescimento micelial do patógeno e a severidade dos sintomas causados pelo fungo em plantas tratadas com o filtrado. Adicionalmente, para detectar se o filtrado produzido pela levedura induziria respostas de defesa em plantas de *A. thaliana* através de vias de defesa induzidas por ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), realizou-se análise quantitativa em tempo real da PCR (qRT-PCR) dos genes marcadores dessas vias de sinalização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Efeito *in vitro* do filtrado de *H. opuntiae* sobre *B. cinerea*

No ensaio *in vitro*, avaliou-se crescimento micelial de *B. cinerea* estirpe BMM, (fornecido por Brigitte Mauch- Mani Universidade de Neuchâtel, Suíça), cultivado em BDA (Batata Dextrose Agar) 39 g L⁻¹ sob efeito das concentrações de 20, 30, 40 e 50% do filtrado produzido pela levedura *H.opuntiae* CCMA 0760, pertencente à Coleção de microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética da Universidade Federal de Lavras. A levedura foi cultivada em meio YNB (Yeast Nitrogen Base) 6,7 g L⁻¹, durante dez dias, em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h a 24 °C. O controle (MOCK) consistiu meio BDA diluído em meio YNB a 50 %. Encerrando o período de cultivo, o fermentado produzido pela levedura foi centrifugado a 10000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa 0,22µm. O fitopatógeno *B. cinerea* foi inoculado com um microlitro da suspensão 4.10⁷ esporos mL⁻¹, colocado no centro da placa contendo as concentrações do filtrado produzido pela levedura diluído em BDA. O crescimento micelial do fungo foi avaliado após 72 hpi (horas após inoculação). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, sendo cada placa de Petri uma repetição. A análise estatística foi realizada avaliando diferenças entre médias pelo teste T de Student (P ≤ 0,05).

2.2 Material vegetal e inoculação com *B. cinerea*

As plantas de *A. thaliana* foram cultivadas em substrato estéril (mistura de húmus e perlita (3:1)) em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h a 21 °C (±2 °C), com intensidade de luz de 100 µE m⁻² seg⁻¹ e umidade relativa de 60-70%. As plantas de *Arabidopsis* Col-0 foram obtidas no Centro de Investigação Biológica *Arabidopsis* (Colombus, OH, EUA).

O fungo *B. cinerea* estirpe BMM foi cultivado em BDA. Os esporos foram colhidos em água e filtrados através de lã de vidro para remover hifas. Antes da inoculação, os esporos foram diluídos em ¼ BD (Caldo de Dextrose e Batata) a 6 g L⁻¹ à concentração final de 5 × 10⁴ esporos mL⁻¹, como descrito por L'Haridon et al. (2011). Seis microlitros de suspensão de esporos foram depositados nas folhas das plantas com quatro semanas de idade. Assim, plantas de *A. thaliana* tratadas por aspersão com 20, 30, 40 e 50% do filtrado de *H. opuntiae*, foram inoculadas com *B. cinérea*, 24 horas após tratamento (hpt), a fim de avaliar o tamanho

da lesão nas folhas 72 hpi. O efeito residual do filtrado, na concentração de 50%, de *H. opuntiae*, foi avaliado pelo diâmetro da lesão, 72 hpi, em folhas inoculadas com *B. cinerea* 24, 48, 72, 96 e 120 hpt. A sistemicidade foi determinada pelo diâmetro da lesão das folhas, 72 hpi do patógeno, em plantas que foram irrigadas com um mililitro do filtrado a 50%. O controle (MOCK) consistiu em plantas tratadas com meio YNB a 50 %

O experimento foi realizado em DIC, com cinco repetições para severidade e oito repetições para avaliação do efeito residual e sistemicidade. A análise estatística foi realizada avaliando diferenças entre médias pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$).

2.3 Extração de RNA e RT-PCR

As folhas de *A. thaliana* foram colhidas 24 horas após a aplicação do filtrado 50 % de *H. opuntiae*, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização. O RNA foi preparado utilizando o kit Spectrum Plant Total RNA da Sigma Aldrich. Logo procedeu-se a transcrição em cDNA com SCRIPT cDNA Synthesis kit da Jena Bioscience, de acordo com as indicações do fabricante. O qRT-PCR foi realizado utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X). Os valores de expressão genética foram normalizados utilizando o gene At4g26410 previamente descrito como gene de referência por Czechowski et al. (2005). Os iniciadores utilizados para analisar a expressão gênica para ácido salicílico foram PR1 e ICS1; ácido jasmônico PDF1.2; etileno ACS6 e PR4 e para as espécies reativas de oxigênio UPOX e ZAT12.

PR1: PR1-fw 5'-TTCTTCCCTCGAAAGCTCAA e PR1-rev 5'-AAGGCCACCAGAGTGTATG; ICS1: ICS1- fw 5'-TTC TCA ATT GGC AGG GAG AC e ICS1- rev 5'- CCC GAC TGC AAA TTC ACT CT; PDF1.2: PDF-fw 5'-CCAAGTGGGACATGGTCAG e PDF-rev5'-ACTTGTGTGCTGGGAAGAC; ACS6 : ACS6-fw 5'- TGG TTG GTT AAA GGC CAA AG e ACS6 -rev 5'- TGG TCC ATA TTC GCA AAA ACA; PR4: PR4-fw 5'-GTACCACCGCGGACTACTGT e PR4-rev 5'-TGGAGGAATAAGCACTCACG; UPOX: UPOX-fw 5'- AAC CGT GGT GGA TAC CAA GA e UPOX-rev 5'- AAC CGT GGT GGA TAC CAA GA; ZAT12 : ZAT 12- fw 5'- ATC AAG TCG ACG GTG GAT GT e ZAT12-rev 5'- ACA AAG CGT CGT TGT TAG GC.

A análise estatística foi realizada utilizando o software InfoStat (2013) e as diferenças entre as médias avaliadas pelo Teste T de Student ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

O crescimento micelial *in vitro* de *B. cinerea* foi acentuadamente inibido com aumento das concentrações do filtrado de *H. opuntiae* (Figura 1 A e B), havendo diferença estatística significativa para todas as doses testadas. A inibição do crescimento do patógeno foi de 36, 45, 76 e 86 % para as doses 20, 30, 40 e 50 %, respectivamente, quando comparadas ao controle (MOCK).

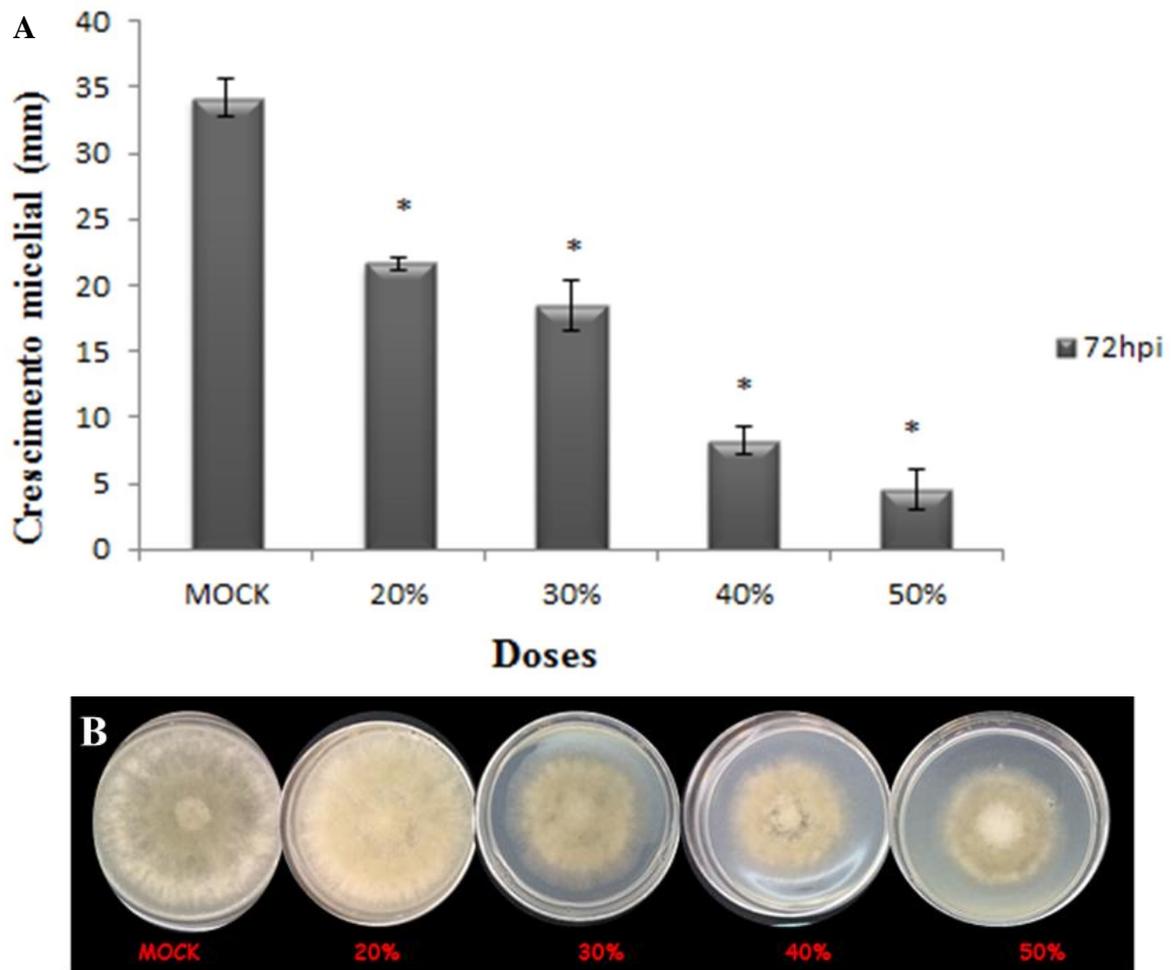


Figura 1. (A) Crescimento micelial de *B. cinerea* 72 hpi com diferentes doses do fermentado produzido por *H. opuntiae*. (B) Fotografias representativas do ensaio. As barras representam as médias de 5 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).

Avaliando o tamanho das lesões em folhas de *A. thaliana* tratadas com doses do filtrado de *H. opuntiae* e inoculadas com *B. cinerea*, observou-se comportamento semelhante aos do teste *in vitro*, com diferença estatística significativa para todas as doses testadas

(Figura 2). A redução da severidade foi de 42, 46, 60 e 82 % para as doses 20, 30, 40 e 50 %, respectivamente, quando comparadas ao controle.

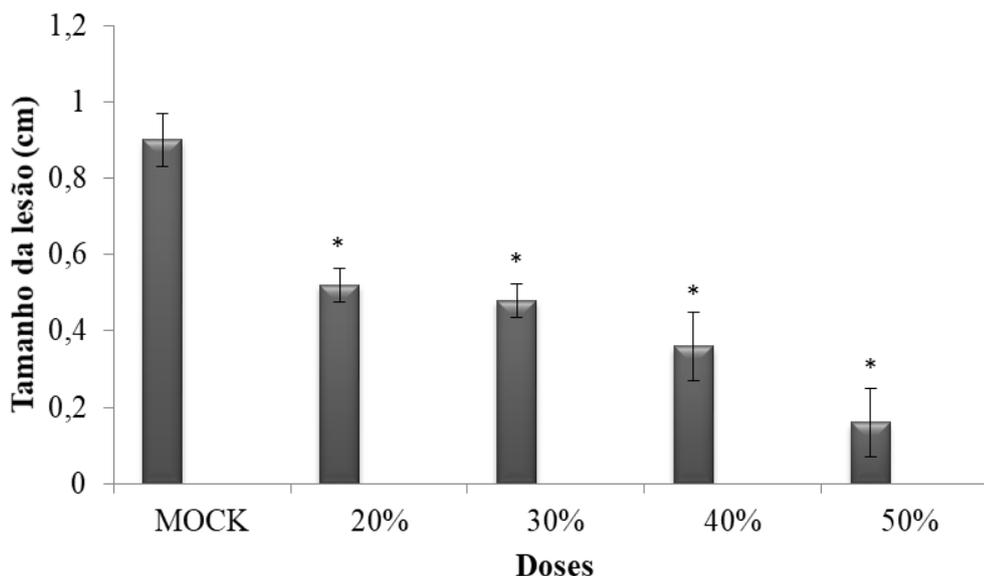


Figura 2. Tamanho das lesões em folhas de *A. thaliana* tratadas 24 h com diferentes doses do fermentado de *H. opuntiae* e medidas 72 hpi com *B. cinerea*. As barras representam as médias de 5 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).

A maior dose do filtrado testada (50%) apresentou um pronunciado efeito de inibição sobre o patógeno, maior que 80 %, tanto *in vitro* como *in vivo*. Seu efeito residual foi avaliado em folhas de *A. thaliana* tratadas com o filtrado e inoculadas com *B. cinerea*. A redução do tamanho da lesão, comparado com controle, foi de 48, 36, 50, 50 e 40 % para os tempos de inoculação do patógeno 24, 48, 72, 96, e 120 h após o tratamento com o filtrado, respectivamente (Figura 3).

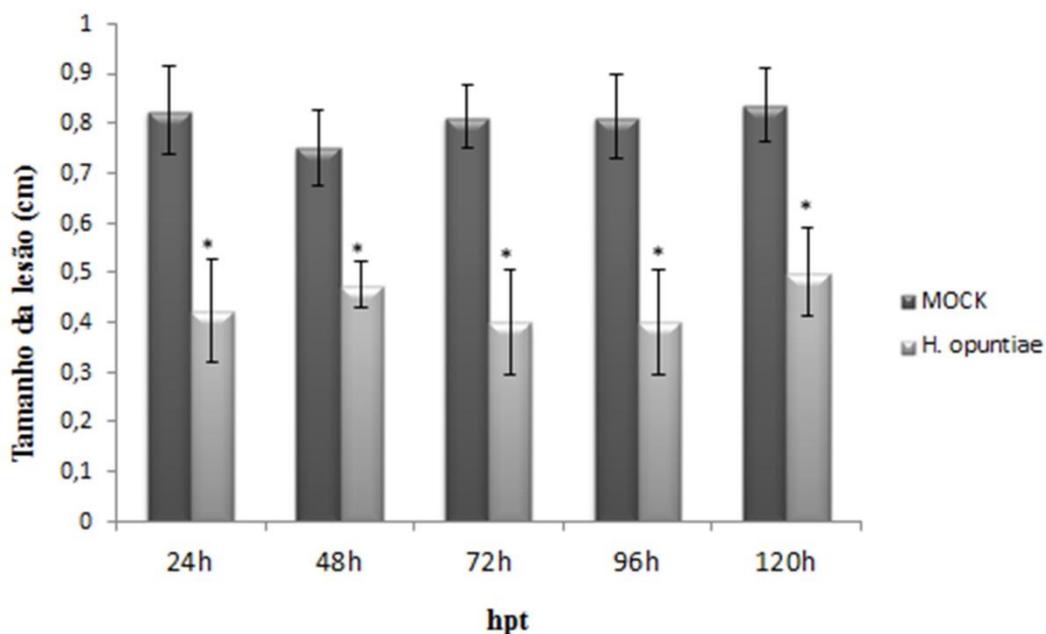


Figura 3. Tamanho das lesões em folhas de *A. thaliana* induzidas por 24, 48, 72, 96 e 120 hpt com 50 % do fermentado de *H. opuntiae* e seguidas da inoculação com *B. cinerea*. As barras representam as médias de 8 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).

Uma vez comprovado o efeito local de controle sobre *B. cinérea* em plantas que receberam o tratamento com o filtrado da levedura via aspersão foliar, o efeito sistêmico foi avaliado pelo diâmetro da lesão das folhas, inoculadas com patógeno, em plantas que foram irrigadas com um mililitro do filtrado 50 % (Figura 4). A redução do tamanho da lesão foliar, em relação ao controle, foi de 61 % em plantas que foram tratadas com filtrado via aspersão (efeito local) e 48 % em plantas que foram irrigadas (efeito sistêmico).

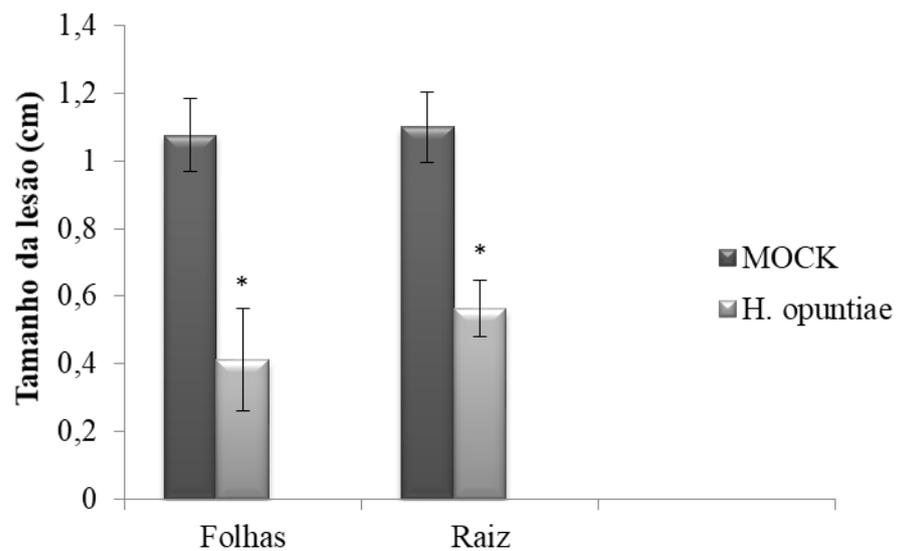


Figura 4. Tamanho da lesões em folhas de *A. thaliana* 72 hpi com *B. cinerea*. As folhas (local) e raízes (sistêmico) foram induzidas com 50 % do fermentado de *H. opuntiae*. As barras representam as médias de 8 repetições. Os asteriscos representam diferenças significativas de acordo com o Teste de T-student ($p < 0,05$).

O efeito do filtrado 50 % de *H. opuntiae* sobre *A. thaliana* foi avaliado pela análise quantitativa em tempo real da PCR (qRT-PCR) dos genes marcadores das vias de defesa induzidas por AS, JA e ET (Figura 5). A análise permite concluir que o filtrado induz respostas de defesa dependentes de AS, JA e ET pelo nível de expressão dos genes PR1, PR4 e PDF1.2, respectivamente, que foram utilizados como iniciadores.

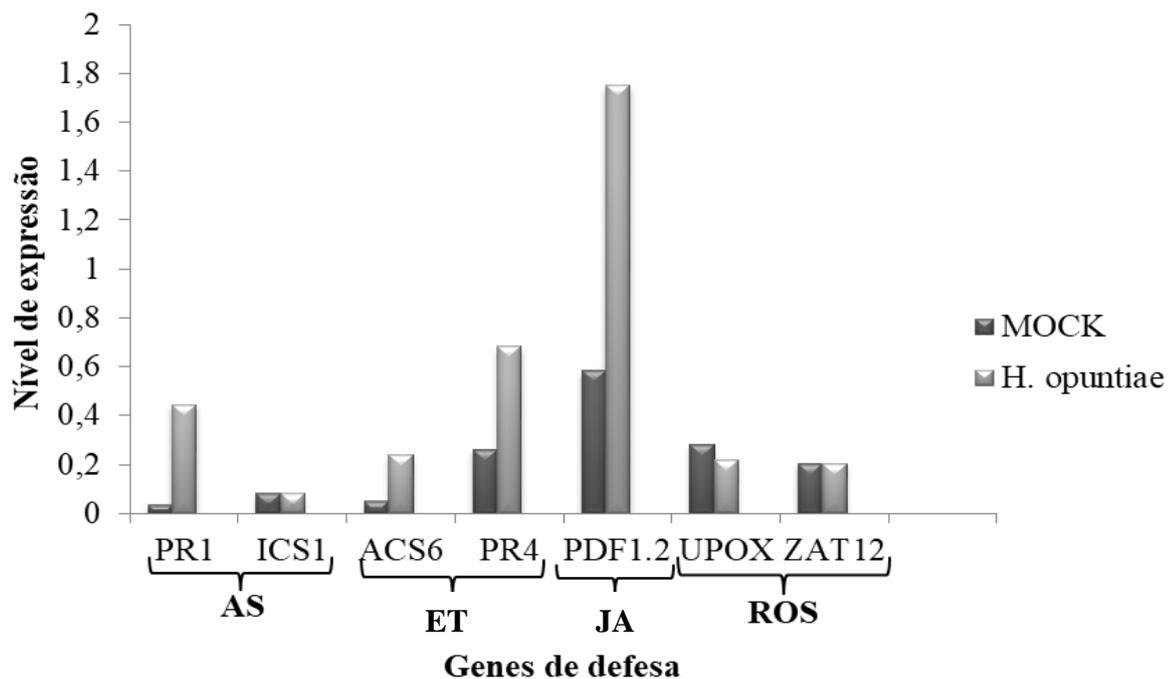


Figura 5. Análise da expressão de genes envolvidos nas rotas de defesa induzidas por AS (PR1 e ICS1), JA (PDF1.2), ET (ACS6 e PR4) e ROS (UPOX e ZAT12). Para normalizar a expressão, utilizou-se os genes constitutivos CF150 e At4g26410. Cada barra representa a média de duas réplicas.

4. DISCUSSÃO

Inúmeras leveduras têm sido identificadas e utilizadas em frutos e vegetais para controle de doenças. O uso desses microrganismos, como agentes de controle biológico para doenças, constitui-se numa alternativa viável, principalmente pelo fato de não deixarem resíduos nos frutos (SHARMA et al., 2009).

As leveduras podem atuar reduzindo o crescimento de fitopatógenos de plantas por meio de vários mecanismos, como a competição por espaços e nutrientes, indução de resistência na planta hospedeira, parasitismo, produção de enzimas hidrolíticas, produção de antibióticos e interferência nos fatores de patogenicidade, sendo que mecanismos diferentes de controle podem atuar em sinergismo durante a interação antagônica (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A levedura *Torulaspota globosa*, isolada da rizosfera da cana-de-açúcar, como antagonista do fitopatógeno *Colletotrichum sublineolum*, agente causador da antracnose no sorgo, reduziu o crescimento micelial do patógeno, causou deformidades das hifas, mas não provocou morte celular, sendo a competição pelo espaço e nutrientes os mecanismos utilizados pela levedura no biocontrole (ROSA et al., 2010).

Duas cepas de *Cryptococcus laurentii* e uma de *Candida sake* foram testadas como antagonistas à *Penicillium digitatum* em frutos de laranja e observou-se redução de 80 a 95 % da incidência da doença. As leveduras inibiram a germinação conidial do patógeno, mas não mataram os esporos. A eficácia das leveduras como antagonistas foi associado à sua capacidade de colonizar rapidamente locais de feridas, apesar da baixa disponibilidade de nutrientes. Os resultados indicam que a competição por nutrientes justifica o êxito dessas leveduras contra *P. digitatum* (MEKBIB et al., 2011).

Uma população de leveduras do filoplano de lírio de um sistema convencional de cultivo foi comparada com outra de sistema integrado, avaliando o antagonismo da levedura *Sporidiobolus pararoseus* a *B. cinerea*. A levedura *S. pararoseus*, isolada das plantas de lírio produzidas no sistema integrado de cultivo, apresentou potencial para a redução da incidência e severidade de *B. cinerea*, porém não inibiu o crescimento micelial do patógeno, ou seja, não houve antibiose, verificando que o modo de ação dessa levedura sobre o patógeno foi competição por nutrientes e espaço (MACHADO; BETTIOL, 2010).

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, supõe-se que o sucesso do filtrado de *H. opuntiae* contra *B. cinerea* seja devido à antibiose, tanto *in vitro* como *in vivo*, e indução de mecanismos de defesa em *A. thaliana*. As plantas de *A. thaliana* foram tratadas com

filtrado produzido pela levedura e após 24 horas inoculadas com *B. cinerea*. A atividade antagônica é mais eficaz quando a levedura é aplicada antes da infecção pelo patógeno (EL-GHAOUTH et al., 2003). Isso ratifica a possibilidade que o filtrado tenha compostos nocivos à *B. cinerea* e com efeito indutor sobre as plantas, uma vez que foi demonstrado seu efeito local e sistêmico na redução do tamanho da lesão causada pelo patógeno e com período de proteção comprovado até 120 horas após o tratamento.

A resistência induzida dá-se a partir da percepção, pela planta, da presença do elicitador que mimetiza a presença do patógeno. Essa resistência envolve a ativação de mecanismos latentes de defesa por meio de elicitores que podem induzir produção de sinais na planta, disparando reações de sinalização que resultarão em respostas de defesa contra o organismo agressor (RESENDE et al., 2002).

Estudos relatam que as defesas básicas de *A. thaliana* contra *B. cinerea* dependem, principalmente, de JA e ET (THOMMA et al., 2001; GLAZEBROOK, 2005). Neste trabalho, avaliou-se o potencial do filtrado produzido por *H. opuntiae* como elicitador das respostas de defesa induzidas em *A. thaliana* e constatou-se que as vias induzidas também são dependentes de AS, JA, e ET.

Embora novas investigações sejam necessárias para elucidar o mecanismo de ação do filtrado produzido por *H. opuntiae*, os resultados deste estudo demonstram o potencial de aplicação deste produto para a proteção da planta contra fitopatógenos e/ou indutor de resistência. As leveduras não são produtoras de metabólitos secundários tóxicos e, portanto, são consideradas seguras como agentes de biocontrole, especialmente no caso das podridões, como as causadas por *B. cinerea*. Estes fatores contribuem para aceitação de frutos e vegetais tratados com este tipo de produto biológico, uma vez que normalmente são consumidos *in natura*.

5. CONCLUSÕES

Filtrado de *H. opuntiae* tem potencial para inibir o crescimento micelial *B. cinerea* *in vitro*.

Filtrado de *H. opuntiae* promove o controle de *B. cinerea* em *A. thaliana*.

Observa-se o efeito sistêmico do filtrado de *H. opuntiae* sobre a infecção por *B. cinerea* em *A. thaliana*.

O filtrado de *H. opuntiae* induz as respostas defensivas dependentes de SA, ET e JA.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 922 p. , 2005.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis, **Plant Physiology**, v. 139, p. 5–17, 2005.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida sitotoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, v.93, p.344-348, 2003.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J.P. Mechanisms of defence to pathogens:biochemistry and physiology, in: NEWTON, W.D.A.; LYON, G.D. (Eds.), **Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection**, Blackwell Press, Oxford, p. 109–132, 2007.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens, **Annual Review Phytopathology**, v.43, p. 205-227, 2005.

INFOSTAT-Base de dados. DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G.,

GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

L'HARIDON, F.; BESSON-BARD, A.; BINDA, M.; SERRANO, M.; ABOU-MANSOUR, E.; BALET, F.; SCHOONBEEK, H.J.; HESS, S.; MIR, R.; LÉON, J.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J.P. Impermeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity, **PLoS Pathogens**, v. 7, 2011.

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

MEKBIB, S.B.; REGNIER, T.J.C.; KORSTEN, L. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. **Tropical Plant Pathology**, v.36, 2011.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plants Pathology**, v. 107, p. 13-18, 2001.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1 p. 593-633, 2011.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 2, p. 400-407, 2003.

ROSA, M.M.; TAU-K-TORNISIELO, S.M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1491–1502, 2010.

ROSA-MAGRI, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 54, p. 1-5, 2011.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahlia* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.5, p. 621-628, 2002.

SHARMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, San Diego, v. 50, p. 205- 221, 2009.

THOMMA, B.P.H.J.; PENNINGCKX, I.A.M.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A. The complexity of disease signaling in Arabidopsis, **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 63-68, 2001.

UNDERWOOD, W. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion, **Front. Plant Science**, v. 3, p. 63-68, 2012.