



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FITOPATOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**LEVEDURAS COMO AGENTES PROTETORES E INDUTORES DE  
RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA-DE-ALTERNARIA EM  
COUVE-MANTEIGA**

**Emanuel Feitosa de Assunção**

**RECIFE – PE  
JULHO – 2015**

**EMANUEL FEITOSA DE ASSUNÇÃO**

**LEVEDURAS COMO AGENTES PROTETORES E INDUTORES DE  
RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA-DE-ALTERNARIA EM  
COUVE-MANTEIGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Delson Laranjeira

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves

**RECIFE – PE**

**JULHO – 2015**

**LEVEDURAS COMO AGENTES PROTETORES E INDUTORES DE  
RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA-DE-ALTERNARIA EM  
COUVE-MANTEIGA**

**EMANUEL FEITOSA DE ASSUNÇÃO**

Dissertação \_\_\_\_\_ e \_\_\_\_\_ pela Banca examinadora em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**ORIENTADOR:**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Delson Laranjeira

**EXAMINADORES:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves

---

Dr<sup>a</sup>. Viviane Maria da Silva

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Marcos Paz Saraiva Câmara

**RECIFE – PE**

**JULHO – 2015**

## AGRADECIMENTOS

À Deus "Porque Deus tanto amou o mundo que deu o seu Filho Unigênito, para que todos que nele crer não pereça, mas tenha a vida eterna."

Ao meu Orientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Delson Laranjeira pela acolhida, ensinamentos, paciência, concelhos e compreensão durante o desenvolvimento da pesquisa, a minha sincera admiração;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves Co-Orientadora, pelo apoio e suporte na condução do trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lília Willadino e, a todos os membros do Laboratório LCVT, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, que compartilharam conhecimentos, em especial: Delson Laranjeira, Gilvan Pio Ribeiro, Elineide Barbosa de Sousa, Rosa de Lima Ramos Mariano, Marcos Câmara, Sônia Maria Alves de Oliveira e Sami Jorge Michereff, pela dedicação com que transmitem seus conhecimentos;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela possibilidade da condução dos experimentos com Controle Biológico;

Aos meus amigos do Laboratório de Fungos do Solo, que foram de grande ajuda na condução dos experimentos e ensinamentos, na pessoa de Viviane, Iwanne, Gisely, Nívia e Adelmo;

Agradeço em especial à Viviane pelos ensinamentos, momentos de descontração, conselho e, por ter colaborado na realização deste trabalho. Vivi você foi essencial para o meu crescimento! "Quando a sua ajuda aos semelhantes é fruto de motivação e preocupação sincera, isso lhe traz sorte, amigos, alegrias e sucessos."

Aos meus amigos pela ajuda e suporte na condução dos experimentos, em especial: Tamiris Joana, Luana, Rezano, Carmem, Katia, Willams e Melyna;

À todos que sempre ajudaram e facilitaram essa jornada, em especial: Matheus, Luiz, Alain, Kledson, Moara, Claudeana, Alesandra e Michelle;

Aos funcionários Romildo e Darcy pela atenção, ao Sr. Luiz Coelho pela disponibilidade e colaboração nos trabalhos de casa de vegetação.

"A felicidade repartida com o próximo dura para sempre."

**Agradeço**

*À Deus por cada dia, por sua presença constante em minha vida e por tornar possível a realização deste trabalho.*

**Dedico**

*Aos meus pais José Luis (In memoria) e Maria Lucia, pelos ensinamentos e conselhos; à minha madrinha Zenaide e Humberto pela bondade e humildade; aos meus irmãos Lucélia, Luciano (In memoria), Emaelson e José Welson pelos cuidados e amizade; aos meus sobrinhos Lucas, Geovana, Marcos, Elielson e Richard, pelo carinho; aos meus avós Antônia e Francisco (In memoria), Maria e Manoel e, a toda a minha família.*

**Ofereço**

*À minha esposa Raimunda Miranda que sempre esteve ao meu lado.*

*À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o alcance desta conquista.*

**SUMÁRIO**

	Páginas
RESUMO GERAL.....	viii
GENERAL ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
CAPÍTULO II – Leveduras como agentes protetores e indutores de resistência no manejo da mancha-de-alternaria em couve-manteiga .....	33
Resumo .....	35
Abstract .....	36
Introdução .....	37
Material e Métodos .....	38
Resultados e Discussão .....	45
Conclusão .....	52
Referências .....	53
Tabelas .....	59
CONCLUSÕES GERAIS.....	65

## RESUMO GERAL

A mancha-de-alternaria causada pelo fungo *Alternaria brassicicola* é considerada uma das doenças fúngicas mais comuns e destrutivas das brássicas. O controle da alternariose baseia-se em pulverizações preventivas ou após o aparecimento dos primeiros sintomas com fungicidas. Uma alternativa para o controle da doença é o uso do controle biológico. Neste contexto, as leveduras surgem como uma nova classe de agentes de biocontrole. O presente estudo teve como objetivos: isolar, selecionar e avaliar o potencial de leveduras no biocontrole da mancha-de-alternaria, em couve-manteiga; verificar a produção de toxina *Killer*, formação de biofilme e produção de metabólitos voláteis *in vitro*, bem como, avaliar as leveduras como agentes indutores de resistência em couve-manteiga, através da análise enzimática da catalase e ascorbato peroxidase. Inicialmente, 18 isolados de *A. brassicicola* foram avaliados em casa de vegetação quanto à capacidade de causar doença em couve-manteiga, sendo o isolado 91 do patógeno selecionado para os ensaios de biocontrole. 39 isolados de leveduras obtidos de folhas de plantas saudáveis de brássicas foram avaliados em casa de vegetação, sendo cinco isolados selecionados para a realização dos ensaios *in vivo* e *in vitro*. No ensaio de biocontrole, plantas de couve-manteiga foram pulverizadas com 15 mL da suspensão ( $1 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) das leveduras (L32, L40, L44, L47 e L57), nos períodos (72, 48, 24 horas antes da inoculação do patógeno) e, imediato (seguido a inoculação do patógeno). Os isolados de leveduras (L46, L32, L44 e L40) foram os mais eficientes na redução severidade da mancha-de-alternaria, sendo responsáveis por índices de severidade de 7,66%, 7,78, 8,13 e 9,07%, respectivamente. Os períodos 24 horas e imediato foram os mais significativos na redução da doença. Dentre as leveduras avaliadas, os isolados L46 e L44 produziram biofilme (fraca 1+) e, os demais, não produziram biofilme. Quanto à atividade *Killer*, as cinco leveduras avaliadas produziram a toxina *Killer*. Também foi verificado que os isolados (L46 e L44) inibiram em 60, 334% e 59, 774%, respectivamente, o crescimento *in vitro* de *A. brassicicola* e, os isolados (L32, L40, L44, L47 e L57) inibiram completamente a esporulação *in vitro* do patógeno. Além disso, os cinco isolados de leveduras avaliados proporcionam nas plantas de couve-manteiga maiores níveis enzimáticos da catalase, em relação ao tratamento controle. O uso de leveduras demonstra ser uma ferramenta promissora para o controle biológico de *A. brassicicola* em couve-manteiga.

Palavras-chave: *Alternaria brassicicola*, atividade enzimática, biocontrole, *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, fitopatógeno.

## GENERAL ABSTRACT

The stain-de-alternaria caused by the fungus *Alternaria brassicicola* is considered one of the most common and destructive fungal diseases the brassica. The control of *Alternaria* is based on preventive sprays or after the appearance of first symptoms with fungicides. An alternative to controlling the disease is the use of biological control. In this context, yeasts emerge as a new class of biocontrol agents. This study aimed to: isolate, select and evaluate the potential of yeasts in biocontrol stain-of-alternaria, in kale; verify production *Killer* toxin, biofilm formation and production of volatile metabolites *in vitro*, as well as evaluate the yeast as resistance inducing agents in kale, through enzymatic analysis catalase and ascorbate peroxidase. Initially, 18 isolates of *A. brassicicola* were evaluated in greenhouse for their ability to cause disease in kale, being isolated 91 from the pathogen selected for biocontrol assays. 39 yeast isolates obtained from leaves of healthy plants brassica were evaluated in greenhouse, being five isolates selected for the assays *in vivo* and *in vitro*. In the assay biocontrol, kale plants were sprayed with 15 mL of the suspension ( $1 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>) of yeasts (L32, L40, L44, L47 and L57) in the periods (72, 48, 24 hours before inoculation the pathogen), and immediate (followed of the pathogen inoculation). The yeast isolates (L46, L32, L44 and L40) were the most effective in reducing the severity of the stain-of-alternaria, accounting for severity index of 7,66%, 7,78, 8,13 e 9,07%, respectively. The periods 24 hours and immediate were the most significant in reduction disease. Among the evaluated yeasts, isolates L46 and L44 produced biofilm (weak 1+) and the others did not produce biofilm. As the *Killer* activity, the five evaluated yeasts produced the *Killer* toxin. It was also verified that the isolates (L46 and L40) inhibited in 60, 334% and 59,774%, respectively, growth *in vitro* of *A. brassicicola* and isolates (L32, L40, L44, L47 and L57) completely inhibited sporulation *in vitro* of the pathogen. The five isolates of yeasts evaluated provide kale plants higher levels of catalase enzyme in relation to the control treatment. The use of yeast proves to be a promising tool for the biological control of *A. brassicicola* in kale.

Keywords: *Alternaria brassicicola*, enzymatic activity, biocontrol, *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, pathogen.

## **CAPÍTULO I**

---

### **Introdução Geral**

# LEVEDURAS COMO AGENTES PROTETORES E INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA-DE-ALTERNARIA EM COUVE-MANTEIGA

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Couve-manteiga

As brassicáceas anteriormente chamadas de crucíferas (Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida) pertencem à família botânica que abrange o maior número de culturas oleráceas que se distribuem entre hortaliças herbáceas e tuberosas, sendo composta por várias espécies vegetais distintas. No Brasil, são classificadas como diferentes variedades botânicas, sendo as de maior importância: couve-flor (*Brassica Oleracea* var. *botrytis*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-brócolo (*B. oleracea* var. *italica*), couve-tronchuda (*B. oleracea* var. *tronchuda*), couve-de-bruchelas, (*B. oleracea* var. *gemmifera*), couve-rábano, (*B. oleracea* var. *gongylodes*) e couve-manteiga, (*B. oleracea* var. *acephala*) (DIXON, 2007; FILGUEIRA, 2013).

A couve-manteiga, também denominada de couve-de-folha, é originária da região do Mediterrâneo, da Ásia Menor e da Costa Ocidental Europeia, tendo como ancestral a couve silvestre. Sua introdução no Brasil ocorreu na época da colonização pelos portugueses. A couve-manteiga apresenta caule ereto, que suporta bem a planta e emite novas folhas continuamente em seu ápice, não forma cabeça, distribuindo-se as folhas em forma de roseta, ao redor do caule. As folhas constituem-se na parte comestível, apresentando limbo bem desenvolvido, arredondados, com pecíolo longo e nervuras bem destacadas. A couve é uma cultura típica de outono-inverno, sendo bem adaptada ao frio intenso e resistente à geadas. No Brasil, raramente produz pendão floral, embora seja considerada uma planta bienal. É uma planta rústica, em relação às outras brássicas, inclusive quanto às exigências nutricionais. Solos argilosos, com pH 5,5 à 6,5, são mais favoráveis para a cultura. A cultura é altamente exigente em água, e irrigações frequentes melhoram a produtividade da planta e a qualidade das folhas. Apresenta certa tolerância ao calor, permanecendo produtiva durante vários meses do ano (MADEIRA; REIFSCHNEIDER; GIORDANO, 2008; FILGUEIRA, 2013).

A couve-manteiga é uma hortaliça arbustiva, cujo consumo no Brasil, tem aumentado gradativamente devido a sua utilização na culinária e às recentes descobertas da ciência quanto às suas propriedades nutracêuticas (NOVO et al., 2010). É um alimento de fácil cultivo e pode ser encontrado para venda no mercado o ano inteiro (OLIVEIRA-

CALHEIROS; CANNIATTI-BRAZACA; SOUZA, 2008). Comparada com outras hortaliças folhosas, esta se destaca por apresentar elevado conteúdo de proteínas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro, vitamina A, niacina (vitamina B3) e vitamina C (MAYNARD; HOCHMUTH, 2007). Além disso, é uma excelente fonte de carotenoides, devido a presença de grandes concentrações de luteína e beta caroteno, componentes presentes em frutos e vegetais com propriedades importantes para a saúde humana (LEFSRUD et al., 2007).

Na maioria das áreas de produção, a couve-manteiga é obtida através da propagação vegetativa de clones tradicionais, não havendo aceitação pelos olericultores de cultivares propagadas por sementes. Apesar desta cultura obter menores valores de mercado em relação a outras brássicas, a couve-manteiga tem expressão econômica devido ao volume de produção (MOREIRA, 2008). As empresas produtoras de sementes têm introduzido algumas cultivares propagadas por sementes, inclusive, alguns híbridos. Entretanto, muitas vezes, essas cultivares não apresentam as características exigidas pelo consumidor. Contudo, alguns híbridos produzem folhas grandes, onduladas e macias, destacando-se também pela produtividade. (FILGUEIRA, 2013).

Dentre os patógenos que atacam as brássicas e acarretam perdas significativas na produtividade, seja pela redução da área fotossintética ou pelo apodrecimento de seus tecidos, destacam-se as doenças causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Hauben et al., *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire 1947, *A. japonica* Yoshi 1941, *Plasmodiophora brassicae* Woronin 1877, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1984, *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. 1849 e *Albugo candida* (Pers.) Roussel 1806, agentes causais da podridão negra, podridão mole, mancha foliar translúcida, mancha-de-alternaria, hérnia das crucíferas, podridão de esclerotinia, míldio e ferrugem branca, respectivamente (MARINGONI, 2005; FILGUEIRA, 2013).

A podridão negra, causada pela bactéria *X. campestris* pv. *Campestres*, é considerada a principal doença em brássicas com distribuição mundial e ocorre em todos os continentes (Williams, 1980). Em Pernambuco, a podridão negra ocorre em todos os municípios produtores de brássicas (MARIANO; MICHEREFF, 1994; AZEVEDO et al., 2000). No entanto, Peruch et al. (2006) verificaram a predominância de *A. brassicicola*, em 69% das amostras de couve-chinesa, couve-flor, couve-de-folha e repolho obtidas de cultivos em Pernambuco, enquanto *A. brassicae* foi constatada em 31% das amostras analisadas. Estes resultados corroboram com os encontrados por Reis e Boiteux, (2010), em levantamento

realizado em regiões brasileiras com predominância de *A. brassicicola*, no complexo brássica oleracea.

## 2. Mancha-de-alternaria

Mundialmente, a mancha-de-alternaria é considerada a doença fúngica mais comum e destrutiva das brássicas, por causar danos consideráveis, desde a fase de viveiro até a fase reprodutiva (MARINGONI, 2005; MEHTA et al., 2005). Esta doença pode ser causada pelas espécies *A. brassicae* (Berk.) Sacc, *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltshire. e *A. japonica* Yoshii (REIS; BOITEUX, 2010). Entretanto, *A. japonica* possui distribuição geográfica limitada e infecta principalmente a cultura do rabanete (*Raphanus sativus*) (TEWARI; BUCHWALDT, 2007). A nível mundial, as principais espécies de fungos que infectam plantas cultivadas e algumas ervas daninhas da família Brassicaceae são *A. brassicicola* e *A. brassicae* (Berk.) Sacc. (MARINGONI, 2005; REIS; BOITEUX, 2010). No entanto no Brasil, *A. brassicicola* tem sido a espécie predominante em plantios convencionais e orgânicos de brássicas (AZEVEDO et al., 2000; PERUCH; MICHEREFF; ARAÚJO, 2006; REIS; BOITEUX, 2010).

O gênero *Alternaria* é composto por um grande número de espécies, com mais de 40 delas conhecidas por serem patogênicas a plantas (ROTEM, 1994; SIMMONS, 2007). Mundialmente, as principais espécies de fungos que infectam plantas cultivadas e algumas ervas daninhas da família Brassicaceae são *A. brassicicola* e *A. brassicae* (MARINGONI, 2005; REIS; BOITEUX, 2010).

O gênero *Alternaria* pertence ao filo Ascomycota, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae. Descrito pela primeira vez por Nees (1816) como *A. tenuis* Nees, como espécie tipo, mais tarde foi reclassificado como *A. alternata* (Fr.) Kiessler. Todos os teleomorfos conhecidos de *Alternaria* tem estágio sexual pertencente ao gênero *Lewia* (SIMMONS, 2007), sendo a maioria das espécies considerada fungos mitospóricos incluindo, *A. brassicicola*, *A. brassicae* e *A. japonica* (AVENOT et al., 2005).

A espécie *A. brassicicola* caracteriza-se por apresentar colônias profusas, de coloração marrom oliváceas a marrom-escuras e aspectos aveludados. O micélio é imerso, possui hifa ramificada, septada de coloração marrom ou marrom-olivácea com 1,5 à 7,5  $\mu$  de largura. Os conidióforos são solitários ou agrupados. São eretos ou ascendentes, ocasionalmente geniculados, mais ou menos cilíndricos e, frequentemente, são arredondados na base. Os conidióforos são septados, possuem coloração pálida a marrom olivácea, liso, com tamanho

de até 70  $\mu$  de comprimento e 5 à 8  $\mu$  de espessura. Os conídios apresentam-se comumente em cadeias de 20 ou mais e, algumas vezes, ramificados. Estes são acropleurógenos, crescendo a partir de pequenos poros na parede do conidióforo, retos, quase cilíndricos, usualmente afinando suavemente até a ponta ou obtoclavado. A sua célula basal é arredondada com bico quase não existente. A célula apical é mais ou menos retangular ou com formato de um cone truncado, sempre pequena e fina. O conídio apresenta de 1 à 11 septos, usualmente menos de seis, posicionados transversalmente, frequentemente constrictos, de coloração pálida ou marrom oliváceo. A sua parede é lisa, tornando-se enrugada com a idade, com tamanho de 18 à 130  $\mu$  de comprimento, 8 à 30  $\mu$  de espessura na parte mais larga, bico com 1/6 do comprimento do conídio e 6 à 8  $\mu$  de espessura (ELLIS, 1971).

Os sintomas da doença caracterizam-se por lesões necróticas circulares, de coloração marrom-escura ou preta, com anéis concêntricos, onde se encontram os conídios e conidióforos do fungo. As lesões causadas por *A. brassicicola* são menores e mais escuras do que as causadas por *A. brassicae*. Os sintomas da alternariose podem ser observados tanto na fase de sementeira, bem como, nas plantas adultas. Em condições de sementeira, as plântulas apresentam necrose do cotilédone e hipocótilo, podendo ocorrer o tombamento. Dependendo da intensidade do ataque, as plantas tornam-se enfezadas e debilitadas. Nas plantas adultas, os sintomas ocorrem inicialmente nas folhas mais velhas, caracterizados por lesões pequenas e necróticas e, posteriormente, o fungo infecta as folhas mais jovens, apresentando lesões circulares, concêntricas, com halo clorótico. As principais fontes de inóculo de *A. brassicaceae* são sementes contaminadas, restos de culturas infectados, plantas daninhas e hospedeiras espontâneas, além da vasta gama de plantas hospedeiras cultivadas. A disseminação ocorre principalmente, pelas sementes, mudas infectadas e pelo vento (MARINGONI, 2005).

Segundo Mehta et al. (2005), a elevada umidade relativa superior a 87% sob condições de altas temperaturas são as condições ideais para o favorecimento de epidemias por *A. brassicicola*. No entanto, para que ocorra infecção, é necessário pelo menos, 9 horas de água livre na superfície foliar. Os sintomas aparecem entre dois e 14 dias após a infecção, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro e das condições ambientais. Conforme Humpherson-Jones e Phelps (1989), a faixa de temperatura ideal para produção de conídios de *A. brassicicola* varia entre 20 à 30° C, sendo 25° C ideal para causar infecções. Contudo, infecções podem ocorrer em temperaturas mais baixas como 10° C (ROTEM, 1994). Em temperaturas ótimas, esse fungo produz conídios dentro de 12 à 14 horas (HUMPHERSON-JONES; PHELPS, 1989)

A dispersão dos conídios ocorre durante o período mais quente e seco do dia, sendo rara a dispersão de conídio durante à noite. Na Inglaterra, as maiores capturas de esporos de *A. brassicicola* ocorrem após um período de chuva ou de molhamento foliar prolongado, com duração superior a 3 horas e temperatura acima de 13° C (ROTEM, 1994).

O controle da alternariose baseia-se, principalmente, na eliminação dos restos culturais infectados após a colheita das plantas, rotação de culturas durante dois a três anos com plantas não hospedeiras, sementes saudas e controle químico (MARINGONI, 2005). Em Pernambuco, o controle da alternariose baseia-se em pulverizações preventivas ou após o aparecimento dos primeiros sintomas, com fungicidas a base de clorotalonil, mancozeb ou oxiclureto de cobre (AZEVEDO et al., 2000). Entretanto, nenhuma medida isolada de controle é viável, estável, efetiva e econômica contra a alternariose das brássicas (VERMA; SAHARAN, 1994). Além disso, o uso intensivo de agroquímicos para o controle de doenças em culturas de importância econômica tem promovido diversos problemas ambientais, tais como: contaminação da água, alimentos, solo e, intoxicação dos homens e animais (BETTIOL; MORANDI, 2009), sendo necessária a adoção de práticas integradas de manejo para o controle efetivo da doença.

Dentre as alternativas existentes para reduzir o uso de agroquímicos no manejo de doenças, o controle biológico é um dos mais estudados (BETTIOL; MORANDI, 2009).

### **3. Controle biológico**

Para Cook e Baker (1983) o controle biológico pode ser definido como sendo a redução da quantidade de inóculo ou da atividade determinante da doença, provocada por um agente patogênico, realizado por um ou mais microrganismos antagônicos diferentes, que não seja o homem. O controle biológico utiliza microrganismos antagonistas para controlar outros microrganismos. (MANSO; NUNES, 2011; LIU et al., 2013).

O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismo e fitopatógeno, podendo ser caracterizado por diferentes modos de ação (MORAES et al., 1991). Dentre os mecanismos de ação utilizados pelos agentes de controle biológico a antibiose, competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo, produção de enzimas líticas, e indução de resistência no hospedeiro são os mais conhecidos (CHAUR TSUEN, 1998).

Nas ações que envolvem antibiose, os microrganismos produzem metabólitos secundários tóxicos que inibem o desenvolvimento de outros microrganismos (CLAUDE; CHANTAL; CHRISTIAN, 2006). A capacidade de competir pela ocupação de locais de infecção do patógeno é um requisito para qualquer agente de controle biológico. Em geral,

espera-se que o agente controlador seja capaz de crescer de maneira mais eficiente que o patógeno no local da infecção (BENDENDO; MASSOLA; AMORIM, 2011). O micoparasitismo é um processo complexo onde um fungo micoparasita sobrevive à custa do outro. Isto envolve uma sequência de alterações no metabolismo de ambos (OWLEY; WINDHAM, 2010). Esses microrganismos agem diretamente nos patógenos de plantas pela secreção de enzimas que degradam a parede celular, tais como: quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,6-glucanases, proteases e antibióticos, como a gliotoxina e viridina (LORITO et al., 2010; DRUZHININA et al., 2011; MUKHERJEE et al., 2012).

Diferentes espécies de microrganismos, tais como: *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp. (Pers.) são efetivamente utilizados no controle de fitopatógenos (HEYDARIA; PESSARAKLI, 2010, RAZA et al, 2013). Dentre esses, as leveduras vêm sendo bastante estudadas no controle de fitopatógenos (SPADARO et al., 2008; JANISIEWICZ et al., 2010; JAMALIZADEH et al., 2011.).

A preferência dos consumidores por produtos livres de resíduos químicos e o surgimento de novas raças de fungos mais resistentes, vem proporcionando um maior interesse por parte dos produtores em buscar soluções alternativas para o controle desses patógenos. Uma das tecnologias mais promissoras no controle de fitopatógenos é o uso de organismos antagonistas como as leveduras. (FRAVEL, 2005; JIJAKLI, 2011).

As leveduras são organismos unicelulares, integrantes do reino Fungi. Reproduzem-se assexuadamente por brotamento ou fissão binária. Estão inseridas no sub-reino Dikarya, que inclui os filos Basidiomycota e Ascomycota (FEYDER et al., 2015). Estão presentes no filoplano colonizando as folhas desde o início de seu desenvolvimento, formando uma barreira na superfície foliar e são responsáveis pelo controle biológico natural de diversas doenças (FOKKEMA et al., 1979; BUCK; ANDREWS, 1999). Juntamente com os fungos filamentosos, as leveduras constituem o principal grupo de microrganismos que habitam a superfície foliar (ANDREWS; HARRIS, 2000).

Vários mecanismos de ação podem estar envolvidos na supressão das doenças de plantas por leveduras, tais como: inibição do patógeno por compostos antimicrobianos, degradação de toxinas e enzimas, competição por espaço e nutrientes, além da indução do mecanismo de resistência em plantas (EL-MEHALAWY et al., 2004).

A habilidade de competir por espaço, tornam as leveduras excelentes colonizadores de ferimentos, pois são capazes de consumir nutrientes mais rapidamente do que os fungos fitopatogênicos, prevenindo assim, o estabelecimento da doença (DROBY et al., 2009).

Castoria et al. (1997) verificaram que, além da capacidade de competição por nutrientes, as leveduras interagem diretamente com as hifas fúngicas e produzem enzimas líticas que lisa a parede celular. No entanto, estes organismos agem no controle das doenças de plantas como agentes protetores das infecções e não como curativos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

Segundo Bettioli et al. (2012), *Candida oleophila* (Montrocher) compete por nutrientes com *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. nos fermentos provocados em citros (*Citrus* sp.), prevenindo assim, a infecção pelo patógeno. Chanchaichaovivat et al. (2008), relatam que *Pichia guilliermondii* Wick., pode inibir *Colletotrichum capsici* (Syd. & P. Syd.) E.J. Butler & Bisby, por ser excelente consumidora de nutrientes, pela produção de enzimas hidrolíticas e pela ação direta em suas hifas. Getha e Vikineswary (2002) relatam que a estirpe G10 de *Streptomyces violaceus niger* produz metabólitos antifúngicos que inibem o crescimento de *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle e de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* W.C. Snyder & H.N. Hansen. Nantawanit, (2010) afirma que a estirpe R13 de *P. guilliermondii* quando inoculada em frutos de pimenta (*Capsicum* spp.) estimulou a produção de enzimas relacionadas à defesa da planta, como fenilalanina amônio-liase,  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase e fitoalexinas. Acredita-se que estas enzimas estão intimamente relacionadas com a inibição de *C. capsici* na cultura.

O fator *killer* de leveduras antagonistas também constitui um dos mecanismos de ação que pode ser encontrado em muitos gêneros de leveduras tais como: *Saccharomyces* Meyen, *Candida* Cif. & Redaelli, *Cryptococcus* Kütz, *Debaryomyces* Klöcker, *Hanseniaspora* Zikes, *Hansenula* Syd. & P. Syd, *Kluyveromyces* Van der Walt, *Pichia* E.C. Hansen, *Sporidiobolus* Nyland, *Tilletiopsis* Ders, *Zygosaccharomyces* B.T.P. Barker, dentre outros (SANTOS et al., 2009).

A produção de exotoxinas por leveduras com atividade antimicrobiana, mediado por receptores específicos da parede celular em microrganismos sensíveis, é um fenômeno relativamente comum (EL-BANNA et al., 2011). A atividade *killer* das células das leveduras foi relatada pela primeira vez por (BEVAN; MAKOWER 1963). Leveduras *killer* são fungos produtores de toxinas que são imunes à atividade das próprias toxinas. Estes organismos produzem proteínas ou glicoproteínas, em meio de cultura que podem inibir outras leveduras, bem como fungos e bactérias sensíveis a estas toxinas (MAGLIANI et al., 1997; COELHO et al., 2003). Esses peptídeos tóxicos liberados no meio de cultivo podem inibir o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos como, *F. oxysporum* e *Botrytis cinerea* Pers (ROSA et al., 2010).

Rosa-Magri et al., (2011) verificaram que as leveduras *Torulaspota globosa* (Klöcker) Van der Walt & Johannsen e *C. intermedia* (Cif. & Ashford) Langeron & Guerra inibiram o desenvolvimento de *C. sublineola* Henn. e *C. graminicola* (Ces.) G.W. Wilson. Um dos mecanismos de ação envolvidos foi a produção de toxinas *killer*. Segundo Sharma et al. (2008), a levedura *Sporidiobolus pararoseus* Fell & Tallman produziu toxinas que inibiram o crescimento de fungos.

As principais leveduras biocontroladoras são *Aureobasidium* spp. Viala & G. Boyer, *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. F. C. Harrison, *Saccharomyces* spp. e *Sporobolomyces* spp. Kluyver & C. B. Niel. (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

Produtos comerciais à base de *C. oleophila*, *A. pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud, *M. fructicola*, são comercializados em muitos países no controle de fitopatógenos. Nos EUA e em Israel, produtos à base de *C. oleophila* são recomendados para o controle de *P. digitatum* e *Botrytis* em pós-colheita. Na Alemanha, produtos à base de *A. pullulans* são recomendados para o controle de *Botrytis*, *Penicillium* e *Monilia* Hill ex F.H. Wigg em frutos de pós-colheita, o mesmo produto é recomendado para o controle de *Erwinia amylovora* (Fireblight) em pomáceas e plantas ornamentais. Em Israel, produtos comerciais a base de *Metschnikowia* são utilizados no controle de *P. digitatum* e *P. italicum* Wehmer em citros, *P. expansum* em frutos de caroço, *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill na cultura do morangueiro (*Fragaria* L.) e uva (*Vitis vinifera*), *Aspergillus niger* Tieg em frutos de uva (DROBY et al., 2009; BETTIOL et al., 2012).

#### **4. Indução de resistência**

Além do controle biológico a indução de resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico, é também, uma ferramenta muito estudada no controle de doenças de plantas, podendo ser definida, sob o aspecto fisiológico, como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e atividade do agente patogênico nos tecidos do hospedeiro (GOODMAN et al., 1986). Esse processo de resistência é complexo e ocorre por meio de mudanças bioquímicas significativas em resposta a estímulos causados por estressores bióticos, como os provocados pelos fitopatógenos (HILDEBRAND et al., 1986). Essa complexidade funcional, espacial e temporal inicia-se com o reconhecimento, pelo hospedeiro, de sinais exógenos do patógeno, seguindo com os mecanismos de transdução desses sinais, resultando na reprogramação do metabolismo vegetal, na qual envolve mudanças na atividade gênica (WALTERS et al., 2007).

A resistência induzida em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes, que podem ser ativados quando a planta estiver sujeita a um agente estressor (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997). Os agentes indutores de origem bióticas ou abióticas capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas são chamados de elicitores (SMITH, 1996).

A ativação dos mecanismos de defesa em plantas pode ocorrer a partir de elicitores químicos, físicos e por microrganismos. Como elicitores químicos, podem ser citados o silício (Si) (CHÉRIF et al., 1994), ácido salicílico (AS) (CIPOLLINI, 2002), ácido D-L-aminobutírico (BABA) (ZIMMERLI et al., 2000), acibenzolar-s-metil (ASM) (DIETRICH et al., 2005, ácido jasmônico (AJ) (CIPOLLINI, 2002), além de compostos presentes em extratos de plantas (KUHN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006). Os elicitores de origem abiótica, como a luz ultra violeta ou metal pesado. Os elicitores de origem biótica (exógeno) (PASCHOLATI, 2011), como as *Rizobacterias* promotoras de crescimento (SILVA, 2002) e as leveduras (STANGARLIN et al., 2010).

Quando um agente fitopatogênico ataca uma planta, várias moléculas eliciadoras associadas aos patógenos são reconhecidas em nível de membrana plasmática vegetal, resultando na ativação de mecanismos de defesa. Esta sinalização faz com que a planta responda de forma rápida, com uma explosão oxidativa, que constituem na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila OH (GARCION et al., 2007; HU et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas no caminho metabólico de transformação do oxigênio molecular ( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ). As EROs podem se acumular rapidamente no início do processo infeccioso, em interações patógeno-planta compatíveis ou incompatíveis, fenômeno conhecido como explosão oxidativa. A explosão tem sido verificada comumente em reações de hipersensibilidade em resposta a infecção fúngica ou bacteriana (PASCHOLATI, 2011).

O acúmulo de EROs nas células vegetais pode ser tóxico tanto para planta quanto para o patógeno. Desta forma, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar a citotoxicidade das EROs. Entretanto, o efeito antimicrobiano direto das EROs em uma interação planta-patógeno depende das concentrações das EROs e da sensibilidade do patógeno a essas concentrações. Para atuar como antibiótico efetivo na resposta de defesa vegetal, a concentração de  $H_2O_2$  no local da infecção deve ser alta o bastante para servir como agente microbicida (MEDHY et al., 1996).

O  $H_2O_2$  é a principal ERO, responsável por acionar moléculas indutoras de genes de defesa e polimerização de proteínas que compõe a parede celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza (LUKASIK et al., 2012). Para se proteger, a planta ativa diversas enzimas antioxidativas, que irão decompor as EROs. Dentre elas, podemos citar superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT),  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases (POD), entre outras (MITTLER, 2002; DE WIT, 2007). Contudo, o equilíbrio entre a produção e a neutralização pode ser alterado, aumentando significativamente os níveis intracelulares de EROs, ocasionando o estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004). Além disso, a regulação da expressão dos genes codificantes de enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas EROs, faz parte da resposta a esse estresse (CYRNE et al., 2003).

A indução de resistência em plantas hospedeiras tem sido relatada a partir da inoculação de leveduras em frutos (DROBY et al., 2002). Esta resistência induzida tem sido relacionada com a produção de POD, CAT e SOD em frutos de pêssegos (*Prunus persica*) tratados com *P. caribbica* Vaughan-Mart. Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill (LIU et al., 2005; ABEGG et al., 2010; XU et al., 2013). De acordo com CAI et al. (2015), os níveis de SOD, CAT, POD, polifenol oxidase (PPO), fenilalanina amônio-liase (PAL), APX e  $\beta$ -1,3-glucanase mostraram-se superiores em frutos de morango tratados com *Hanseniaspora uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff ex M.T Sm., em relação ao tratamento controle em pós-colheita. Conforme os autores, o aumento nas atividades destas enzimas está associado com a redução da severidade das doenças e, pelo fato destas enzimas estarem relacionadas à indução de resistência no fruto.

Castoria et al., (2003), afirmam que a capacidade para tolerar níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas em tecido de frutos, em resposta a ferimento, é uma das características essenciais das leveduras antagônicas. Macarisin et al. (2010), demonstraram que *C. oleophila* e *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby induziram respostas de defesa oxidativas em frutos de maçã (*Malus domestica*) e, em frutas cítricas, gerando maiores níveis de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esses mesmos autores relataram a atividade da glucanase em dois isolados de leveduras na presença de *P. expansum* Link e *B. cinerea*.

No contexto da resistência das plantas a patógenos, as EROs podem contribuir atuando diretamente sobre os patógenos e, conseqüentemente, inibindo o seu desenvolvimento nos tecidos. Além disso, dentre as EROs, o peróxido de hidrogênio, por ser a espécie mais estável e prontamente transportada através da membrana, pode estar envolvido na expressão de genes

requeridos na resistência ou na formação de mensageiro secundário como o ácido jasmônico (PASCHOLATI, 2011).

Apesar da produção de couve-manteiga em Pernambuco ser pouco representativa no âmbito nacional, o estado apresenta-se como uma região com potencial produtivo significativo, em função de suas condições climáticas. No entanto, a produção desta cultura tem sido reduzida devido à ocorrência da mancha-de-alternaria. Por ser considerada uma doença destrutiva e, seu controle ser baseado em pulverizações preventivas com fungicidas, é necessário o uso de um controle alternativo da doença e, que não cause danos ao meio ambiente como uso excessivo de produtos químicos. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: isolar, selecionar e avaliar o potencial de leveduras no biocontrole da mancha-de-alternaria em couve-manteiga; verificar a produção de toxina *Killer*, formação de biofilme e produção de metabólitos voláteis *in vitro*, além de avaliar as leveduras como agentes indutores de resistência em couve-manteiga, através da análise enzimática da catalase e ascorbato peroxidase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEGG, M. A.; ALABARSE, P. V. G.; CASANOVA, A.; HOSCHEID, J.; SALOMON, T. B.; HACKENHAAR, F. S.; MEDEIROS, T. M.; BENFATO, M. S. Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 170, n. 1, p.11-20, 2010.
- ANDREWS, J. H.; HARRI, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopatology**. Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- AVENOT, H.; DONGO, A.; BATAILLÉ-SIMONEAU, N.; IACOMI-VASILESCU, B.; HAMON, B.; PELTIER, D.; SIMONEAUS, P. Isolation of 12 polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. **Molecular Ecology Notes**, London, v. 5, n. 10, p. 948-950, 2005.
- AZEVÊDO, S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para quantificação dessas doenças. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 299-306, 2000.
- AZEVÊDO, S. S.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Epidemiologia comparativa da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 17-26, 2002.
- BENDENDO, I. P.; JR. MASSOLA, N. S.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico In: AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, cap. 17, p. 367-388.
- BETTIOL, W.; MORANDIR, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa meio Ambiente, 2012. 156 p. (Documento 88).

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed<sup>a</sup>. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. v. 1, 341p.

BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiology basis of the killer character in yeast. **Proceedings of the 11 th International Conference on Genetics**, v. 1, p. 202-203, 1963.

BUCK, J. W.; ANDREWS, J. H. Role of adhesion in the colonization of barley leaves by the yeast *Rhodosporidium toruloides*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, n. 2, p. 433-440, 1999.

CAI, Z.; YANG, R.; XIAO, H.; QIN, X.; SI, L. Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 52-58, 2015.

CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; DE CURTIS, F.; DE CICCIO, V. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 9, n. 5, p. 564-572, 2003.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCIO, V.  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, p. 293-300, 1997.

CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chili anthracnose after harvest. **Biological Control**, Orlando, v. 47, n. 2, p. 207-215, 2008.

CHAUR - TSUEN, L. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. **Plant Pathology Bulletin**, Oxford, v. 7 p. 155-166, 1998.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* sp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 236-242, 1994.

- CIPOLLINI, D. F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. **Oecologia**, Berlin, v. 131, n. 4, p. 514-520. 2002.
- CLAUDE A.; CHANTAL O.; CHRISTIAN S. Biological control of plant diseases: the European situation, **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 114, n. 3, p. 329-341, 2006.
- COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar: **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 37-358, 2003.
- CONTRERAS, L. Y. S.; RIAÑO, A. L. R. Aislamiento de microorganismos para el control biológico de *Moniliophthora roreri*. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 62, n. 4, p. 370-378, 2013.
- COOK, R.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. 2 ed. **American Phytopathological Society**, Sant Paul, Minnesota, 1983, 539p.
- CYRNE, L.; MARTINS, L.; FERNANDES, L.; MARINHO, H. S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 34, n. 1, p. 385-393, 2003.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures**. 2. ed<sup>a</sup>. Atlas of clinical fungi, 2000, 1126p.
- DE WIT, P. J. G. M. Visions & Reflections (Minireview) How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Suica, v. 64. n. 21, p. 2726-2732, 2007.
- DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 211-222, 2005.

DIXON, G. R. Vegetable *brassic*as and related *crucif*ers. **Wallingford**: CABI, 2007. 327p.

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**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 137-145, 2009.

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

DRUZHININA, I. S. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Review Microbiology**. London, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 512p.

EL-BANNA, A. A.; MALAK, A. EL-SAHN & SHEHATA, M. G. Yeasts Producing *Killer* Toxins: An Overview, **Food Science and Technology**. London, v. 8, n. 6, p. 41-53, 2011.

EL-MEHALAWY, A. A. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Agriculture e Biology**, v. 6, n. 2, p. 310-316, 2004.

FEYDER, S. Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p.1509-1525, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Brassicáceas couves e plantas relacionadas**. FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura. 3 ed<sup>a</sup>. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. cap. 16, p. 280-299.

FOKKEMA, N. J.; DEN HOUTER, J. G.; KOSTERMAN, Y. J. C.; NELIS, A. L. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. **Transactions of the British Mycological Society**, Iowa, v.72, n. 1, p. 19-29, 1979.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathol**, Palo Alto, v. 43, p. 337-359, 2005.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence - a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 109-132.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. Hampshire, v. 28, n. 6, p. 303-310, 2002.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986. 433p.

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J. E. **Environmentally safe approaches to crop disease control**. 1. ed<sup>a</sup>. Boca Raton: CRC- Lewis Publishers, 1997, p. 177-199.

HEYDARIA, A.; PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of Biological Sciences**. v. 10, n. 4, p. 273-290, 2010.

HILDEBRAND, D. F.; RODRIGUEZ, J. G.; BROWN, G. C.; LUU, K. T.; VOLDEN, C. S. Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 79, n. 6, p.1459-465, 1986.

HU, Z.; SHEN, Y.; SHEN, F.; SU, X. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* 'Opera 8277' leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 5, p. 995-1002, 2009.

HUMPHERSON-JONES, F. M.; PHELPS, K. Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. **Annals of Applied Biology**, London, v.114, n. 3, p. 449-459, 1989.

JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H. R.; AMINIAN, H.; ALIZADEH, A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 41, n. 1, p. 65-71, 2011.

JANISIEWICZ, W. J.; KURTZMAN, C. P.; BUYER, J. S. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. **Yeast**, Davis, v. 27, n. 7, p. 389-398, 2010.

JIJAKLI, M. H. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. **Biological Control**, Orlando, v. 99, n. 1, p. 93-105, 2011.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; MONTALVÁN, R.; SCHWAN ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, 2006.

LEFSRUD M; KOPSELL D; WENZEL A; SHEEHAN J. 2007. Chances in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 136-141, 2007.

LIU, P., LUO, L., LONG, C. A. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. **Biological Control**, Orlando, v. 67, n. 2, p. 157-162, 2013.

LIU, J.; ZHANG, Y.; HUANG, D.; SONG, G. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 280, n. 2, p. 139-145, 2005.

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

LUKASIK, I.; GOŁAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, p. 1937-1941, 2012.

MACARISIN, D.; DROBY, S.; BAUCHAN, G.; WISNIEWSKI, M. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p.194-202, 2010.

MADEIRA, N. R.; REIFSCHNEIDER, F.J. B.; GIORDANO, L. B. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 428-432, 2008.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 3, p. 369-400, 1997.

MANSO, T., NUNES, C. *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, 64-71, 2011.

MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Lista comentada de bactérias fitopatogênicas registradas e/ou estudadas no estado de Pernambuco - Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.4, p.499-507, 1994b.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, couve-flor, rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed<sup>a</sup>. Agronômica Ceres, 2005. Cap. 31, p. 285-291.

MAYNARD, D. N.; HOCHMUTH, G. J. **Knott's Handbook for Vegetable Growers**. 5 ed<sup>a</sup>. New Jersey, 2007. 47p.

MEDHY, M.C., SHARMA, Y.K., SATHASIVAN, K. & BAYS, N.W. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 98, n. 2, p. 365-374, 1996.

MEHTA, N.; SANGWAN, M. S.; SAHARAM, G. S. Fungal diseases of rapeseed mustard. In: SANGWAN MS; SAHARAM GS, MEHTA N. **Diseases of oilseed crops**. New Delhi: Indus Publishing Company, New Delhi, 2005. p. 15-86.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Mutiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**, Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 7-23.

MOREIRA, P. A. A. **Diversidade de isolados de *Alternaria brassicicola* (schwn.) wilt. de cultivos convencionais e orgânicos de brássicas de Pernambuco**. 2008, 48 f. Dissertação em fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. **Microbiology**, Reading v. 158, n. 1, p. 35-45, 2012.

NANTAWANIT, N.; CHANCHAICHAOVIVAT, A.; PANIJPAN, B.; RUENWONGSA, P. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. **Biological Control**, Orlando, v. 52, n. 2, p. 145-152, 2010.

NOVO, M. C. S. S; PRELA-PANTANO, A.; TRANI, P. E.; BLAT, S. F. Desenvolvimento e produção de genótipos de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 321-325, 2010.

- OLIVEIRA-CALHEIROS, K.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SOUZA, M. C. Avaliação da disponibilidade do ferro em dieta complementada com couve manteiga. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.1, p. 37-42, 2008.
- OWLEY, B. H.; WINDHAM, M. T. Controle biológico de fitopatógenos. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia conceitos e exercícios de laboratórios**. 2. ed<sup>a</sup>. Porto alegre: Artmed, v. 1, 2010. p. 447-459.
- PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, cap. 35, p. 593-636.
- PERUCH, L. A. M.; MICHEREFF, S. J.; ARAÚJO, I. B. Levantamento da intensidade da alternariose e da podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 464-469, 2006.
- RAZA, W.; FAHEEM, M.; YOUSAF, S.; FAHEEM, U. R.; YAMIN, M. Volatile and nonvolatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Journal of materials Science Letters**. London, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2013.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S. *Alternaria* species infecting brassicaceae in the Brazilian neotropics: geographical distribution, host range and specificity. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92, p. 661-668, 2010.
- RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FIORI, A. C. G.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa phytopathologica**. Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2006.
- ROSA-MAGRI, M.; M.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 54, n. 1 p. 1-5, 2011.

ROSA, M. M.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorgum. **World Journal Microbiol Biotechnol**, Berlin, v. 26, n. 8, p. 1491-1502, 2010.

ROTEM, J. The genus *Alternaria*: Biology, epidemiology, and pathogenicity. **American Phytopathological Society**, Sant Paul, 1994. 326 p.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; BRAVO, E.; MARQUINA, D. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Microbiology**, Reading, v. 155, n. 2, p. 624-634, 2009.

SHARMA, R. N.; MAHARSHI, R. P.; GAUR, R. B. *Sporidiobolus pararoseus* Fell & Tallman - an antagonistic yeast with biocontrol potential. **Current Science**, Bangalore, v. 95, n. 8, p.1003-1004, 2008.

SILVA, H. S. A. **Rizobactérias como promotoras do crescimento de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares da cultura**. 2002,75 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) -Universidade Federal de Viçosa Minas Gerais 2002.

SIMMONS, E. G. *Alternaria*: an identification manual. Utrecht: **CBS Fungal Biodiversity Centre**, 2007. 775p.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, London, v.132, n. 1, p.1-45, 1996.

SPADARO, D.; SABETTA, W.; ACQUADRO, A.; PORTIS, E.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. **Microbiological Research**. Jena, v. 163, n. 5, p. 523-530, 2008.

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

TEWARI, J. P.; BUCHWALDT, L. Diseases caused by fungi and oomycetes. In: RIMMER, S. R.; SHATTUCK, V. I.; BUCHWALDT, L. Compendium of Brassica diseases. **Phytopatology**, Saint Paul: APS Press, 2007. p. 15-18.

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

VERMA, P. R.; SAHARAN, G. S. **Monograph on Alternaria Diseases of Crucifers**. Saskatoon. Minister of Supply and Services. Canada, 1994. 162p.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence-a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007, 258p.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant disease**, St. Paul, v.64, n.8, p.736-742, 1980.

XU, B.; ZHANG, H.; CHEN, K.; XU, Q.; YAO, Y.; GAO, H. Biocontrol of Postharvest *Rhizopus Decay* of Peaches with *Pichia Caribbica*. **Current Microbiology**, New York, v. 67, n. 2, p. 255-261, 2013.

ZIMMERLI, L.; JAKAB, G.; MÉTRAUX, J.-P.; MAUCH-MANI, B. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by  $\beta$ -aminobutyric acid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 97, p. 12912-12925. 2000.

## **CAPÍTULO II**

---

### **LEVEDURAS COMO AGENTES PROTETORES E INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA MANCHA-DE-ALTERNARIA EM COUVE-MANTEIGA**



23 Resumo- O estudo objetivou-se: isolar, selecionar e avaliar o potencial de leveduras no  
24 biocontrole da mancha-de-alternaria; verificar a produção de toxina *Killer*, formação de  
25 biofilme, produção de metabólitos voláteis *in vitro* e, avaliar as leveduras como agentes  
26 indutores de resistência em couve-manteiga, através da análise enzimática. Foram avaliados  
27 39 isolados de leveduras obtidos de folhas sadias de brássicas, sendo cinco selecionados para  
28 realização dos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Plantas de couve-manteiga foram pulverizadas com  
29 15 mL da suspensão ( $1 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup>) das leveduras (L32, L40, L44, L47 e L57), nos  
30 períodos (72, 48, 24 horas antes da inoculação do patógeno e, imediato a inoculação do  
31 patógeno). Os cinco isolados de leveduras promoveram redução do índice de severidade da  
32 mancha-de-alternaria. Os períodos 24 horas e imediato foram os mais significativos na  
33 redução da doença. A produção de biofilme pelas leveduras L44, L46 e L57 foi relativamente  
34 fraca. No entanto, todas as leveduras produziram toxina *Killer* e, metabólitos voláteis  
35 responsáveis pela inibição *in vitro* de *A. brassicicola*. Quanto à atividade enzimática, as  
36 plantas produziram maiores quantidades da enzima catalase na presença das leveduras  
37 avaliadas. O uso de leveduras demonstra ser uma ferramenta promissora no biocontrole de *A.*  
38 *brassicicola* em couve-manteiga.

39

40 Termo para indexação: *Alternaria brassicicola*, atividade enzimática, biocontrole, *Brassica*  
41 *oleracea*, fitopatógeno.

42 **Yeasts as protective agents and resistance inducers in the management of**  
43 **stain-of-alternaria in kale**

44

45 Abstract- The study aims to: isolate, select and evaluate the potential of the yeasts in  
46 biocontrol stain-of-alternaria; verify production *Killer* toxin, biofilm formation, production of  
47 volatile metabolites *in vitro* and evaluate the yeasts as resistance inducing agents in kale,  
48 through enzymatic analysis. Were evaluated 39 yeast isolates obtained from healthy leaves  
49 brassica, five being selected to realization assays *in vivo* and *in vitro*. Kale plants were  
50 sprayed with 15 mL of the suspension ( $1 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>) of yeasts (L32, L40, L44, L47 and  
51 L57) in the periods (72, 48, 24 hours before inoculation pathogen, and immediate inoculation  
52 of the pathogen). The five isolates of yeasts promoted reducing the severity index of the stain-  
53 de-alternaria. The periods 24 hours and immediate were the most significant reduction of the  
54 disease. The biofilm production by the yeasts L44, L46 e L57 was relatively weak. However,  
55 all yeasts produced *Killer* toxin and volatile metabolites responsible for the *in vitro* inhibition  
56 of *A. brassicicola*. As for enzymatic activity, the plants produced greater amounts of the  
57 enzyme catalase in the presence of the evaluated yeasts. The use of yeasts proves to be a  
58 promising tool in biocontrol of *A. brassicicola* in kale.

59

60 Index terms: *Alternaria brassicicola*, enzymatic activity, biocontrol, *Brassica oleracea*,  
61 pathogen.

## Introdução

62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87

A couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.), é uma hortaliça arbustiva, com certa tolerância ao calor, permanece produtiva durante vários meses do ano, em muitos Estados brasileiros. No Brasil, o consumo desta hortaliça vem aumentando constantemente devido provavelmente, ao seu valor nutritivo, e pelo fato desta hortícola ser rica em luteína e beta caroteno, componentes naturais presentes em vegetais e frutas que estão associados à redução dos riscos de doenças (Novo et al., 2010; Filgueira, 2013).

Apesar da couve-manteiga obter menores valores de mercado em relação a outras brássicas, esta cultura tem expressão econômica devido ao volume de produção (Moreira, 2008). No entanto, perdas significativas na produtividade das brássicas podem ocorrer devido ao ataque de fitopatógenos (Maringoni, 2005).

Mundialmente, a mancha-de-alternaria causada por *Alternaria brassicicola* (Schwein) Wiltshire, é considerada a doença fúngica mais comum e destrutiva que infectam as plantas cultivadas e algumas ervas daninhas da família Brassicaceae, por causar danos consideráveis, desde a fase de viveiro até a fase reprodutiva da planta (Maringoni, 2005; Mehta et al., 2005, Reis & Boiteux, 2010).

Em Pernambuco, o controle da alternariose baseia-se em pulverizações preventivas ou após o aparecimento dos primeiros sintomas, com fungicidas a base de clorotalonil, mancozeb ou oxiclreto de cobre (Azevedo et al, 2000). Segundo Verma & Saharan (1994), nenhuma medida isolada de controle é viável, estável, efetiva e econômica contra a alternariose das brássicas. Além disso, o uso intensivo de agroquímicos no controle de doenças em culturas de importância econômica tem promovido diversos problemas ambientais, tais como: contaminação da água, alimentos, solo, intoxicação dos homens e animais (Bettiol; Morandi, 2009), sendo necessária a adoção de práticas integradas de manejo para o controle efetivo da doença.

88 Neste sentido, o controle biológico surge como uma estratégia promissora para reduzir  
89 o uso de fungicidas no controle de doenças (Nunes, 2012). A busca por microrganismos  
90 antagonicos para o controle biológico de patógenos em culturas de importância econômica  
91 tem despertado um interesse particular, devido à gravidade e potencial de impacto ambiental  
92 causado pelo uso constante de agrotóxicos nos agroecossistemas (Contreras & Riaño, 2013).  
93 Uma das tecnologias mais promissoras no controle de fitopatógenos é o uso de organismos  
94 antagonistas como as leveduras (Jijakli, 2011).

95 Segundo El-mehalawy et al. (2004), diferentes mecanismos de ação podem estar  
96 envolvidos na supressão das doenças de plantas por leveduras, tais como: inibição do  
97 patógeno por compostos antimicrobianos, indução de mecanismo de resistência em plantas,  
98 degradação de toxinas e enzimas e, competição por espaço e nutrientes.

99 As principais leveduras biocontroladoras são *Aureobasidium* spp. Viala & G. Boyer,  
100 *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. F. C. Harrison, *Saccharomyces* spp. e *Sporobolomyces*  
101 spp. Kluyver & C. B. Niel. (Valdebenito-Sanhueza, 2000).

102 O presente estudo teve como objetivos: isolar, selecionar e avaliar o potencial de  
103 leveduras no biocontrole da mancha-de-alternaria; verificar a produção de toxina *Killer*,  
104 formação de biofilme e produção de metabólitos voláteis *in vitro* e, avaliar as leveduras como  
105 agentes indutores de resistência em couve-manteiga, através da análise enzimática da catalase  
106 e ascorbato peroxidase.

107

108

### **Material e Métodos**

109 Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fungos do Solo e em casa de  
110 vegetação nas dependências do Departamento de Agronomia, área de Fitossanidade, da  
111 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Recife, PE 08°00'59" S, 034°56'40" W  
112 e, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da (UFRPE), 8° 01'05" S, 34° 56' 42" W, no  
113 período de agosto de 2014 a junho de 2015.

## 114 **Isolamento das leveduras**

115 Na primeira etapa deste estudo, as leveduras foram isoladas a partir de fragmentos de  
116 folhas sadias de couve-manteiga (*B. oleracea* var. *acephala*), brócolis (*Brassica oleracea* var.  
117 *itálica*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*)  
118 utilizando a metodologia descrita por (França et al., 2015). Cinco fragmentos do material  
119 vegetal foram colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água de torneira esterilizada  
120 (ATE), postos em banho de ultrassom durante 15 minutos e, posteriormente, agitados em  
121 “vórtex”. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas em placas de Petri contendo  
122 meio Sabouraud-dextrose-ágar (SDA), suplementado com extrato de levedura (1,5 g. L<sup>-1</sup>) e  
123 adicionado de cloranfenicol (50 mg. L<sup>-1</sup>). Com o auxílio de uma alça de Drigalski, as  
124 alíquotas foram espalhadas na superfície do meio de cultura e as placas mantidas à  
125 temperatura de ± 27 °C, durante 72 horas. As colônias que surgiram isoladas foram repicadas  
126 para placas de Petri, totalizando 39 isolados de leveduras, que posteriormente, foram  
127 preservadas em tubos de ensaio contendo óleo mineral à ± 27 °C.

128

## 129 **Teste de patogenicidade**

130 Para a condução do teste de patogenicidade, 18 isolados de *A. brassicicola* foram  
131 obtidos da Coleção de Cultura de Fungos Fitopatogênicos Prof<sup>a</sup>. Maria Menezes-CMM, da  
132 UFRPE. Os fungos foram cultivados em placas de Petri durante 10 dias contendo o meio de  
133 cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e, mantidos à temperatura de ± 27 °C, sob alternância  
134 luminosa (12 horas claro/12 horas escuro). A suspensão de conídios de cada isolado foi  
135 preparada com adição de 20 mL de água destilada e esterilizada (ADE) em cada placa,  
136 contendo a colônia do patógeno, seguida da raspagem das colônias com escovas de cerdas  
137 macias. A concentração da suspensão de conídios 1x10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup> foi ajustada com o auxílio da  
138 câmara de Neubauer (Moreira, 2008). O plantio das sementes de couve-manteiga foi realizado  
139 em bandejas de isopor com substrato comercial BASAPLANT. As plantas de couve-

140 manteiga foram transplantadas aos 27 dias de idade para vasos de plástico com capacidade de  
141 1,5 L, contendo solo de textura franco arenoso apresentando as principais características  
142 químicas: pH=7,40;  $\text{Ca}^{+2}=4,60 \text{ cmolc/dm}^3$ ;  $\text{Na}=0,90 \text{ cmolc/dm}^3$ ,  $\text{Mg}^{+2}=1,15 \text{ cmolc/dm}^3$ ,  
143  $\text{K}^+=2,50 \text{ cmolc/dm}^3$ ,  $\text{H}=1,07 \text{ cmolc/dm}^3$ ,  $\text{P}=191, \text{ mg/dm}^3$ ,  $\text{S}=9,2 \text{ cmolc/dm}^3$  e  $\text{CTC}=10,2$   
144  $\text{cmocl/dm}^3$ .

145 Após 40 dias do transplântio, talos de três folhas por planta foram marcados com  
146 caneta de retroprojektor e, em seguida, a parte aérea foi inoculada por atomização com 10 mL  
147 da suspensão de  $1 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de cada isolado de *A. brassicicola*, com adição de  
148 Tween 20 (0,1%). A testemunha consistiu de plantas atomizadas apenas com 10 mL de ADE  
149 e adição de Tween 20 (0,1%). Após a inoculação com o patógeno, as plantas foram mantidas  
150 em câmara úmida por 36 horas. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até a  
151 avaliação da doença (Moreira, 2008). A severidade da doença foi determinada pela  
152 porcentagem de área foliar lesionada. Três folhas basais de cada planta foram avaliadas com o  
153 auxílio de escalas diagramáticas apresentando níveis de lesão de 0 à 50%, 10 dias após a  
154 inoculação do patógeno (Conn et al., 1990). O delineamento experimental utilizado foi o  
155 inteiramente casualizado (DIC), totalizando 19 tratamentos (18 isolados de *A. brassicicola* e  
156 uma testemunha absoluta), com quatro repetições, sendo cada repetição representada por um  
157 vaso com uma planta, constituída por três unidades amostrais. Os dados obtidos foram  
158 submetidos à análise de variância (ANOVA), e os tratamentos comparados pelo teste de Scott-  
159 Knott ( $P < 0,05$ ), utilizando o programa computacional SISVAR (versão 5.3 Build 77; UFLA,  
160 Brasil).

161

### 162 **Seleção de isolados de leveduras**

163 Em casa de vegetação, 39 isolados de leveduras foram testados quanto à capacidade  
164 protetora da couve-manteiga e controle de *A. brassicicola*. Para tanto, vasos foram  
165 preenchidos com solo de mesma característica física e química, utilizado no ensaio anterior. O

166 plantio das sementes e transplântio das mudas ocorreram como descrito anteriormente. As  
167 suspensões das leveduras foram obtidas a partir da adição de 20 mL de ADE e raspagem da  
168 colônia com 72 horas de idade cultivados em meio SDA. A concentração de cada suspensão  
169 foi ajustada para  $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  com o auxílio da câmara de Neubauer. Em, seguida, as  
170 plantas foram tratadas através da atomização da parte aérea com 15 mL da suspensão de  
171 leveduras. Após 24 horas da inoculação com as leveduras, realizou-se a inoculação do isolado  
172 91 de *A. brassicicola* selecionado em teste de patogenicidade, através da pulverização das  
173 plantas com suspensão de  $1 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . A testemunha padrão foi inoculada apenas  
174 com o patógeno. Em seguida, as plantas foram colocadas em câmara úmida por 36 horas. Os  
175 vasos foram mantidos em casa de vegetação até a avaliação da doença. A doença foi avaliada  
176 10 dias após a inoculação do patógeno, conforme a escala de notas descrita no teste de  
177 patogenicidade. O delineamento experimental utilizado foi o DIC, totalizando 40 tratamentos  
178 (39 isolados de leveduras e uma testemunha padrão), com quatro repetições, sendo cada  
179 repetição representada por um vaso com uma planta, constituída por três unidades amostrais.  
180 Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, os tratamentos comparados pelo  
181 teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) utilizando o SISVAR.

182

### 183 **Ensaio de biocontrole da mancha-de-alternaria**

184 No experimento de biocontrole, foi utilizada a mesma metodologia descrita  
185 anteriormente, sendo utilizados cinco isolados de leveduras (L32, L40, L44, L46 e L57)  
186 selecionados em ensaio anterior. As plantas foram tratadas através da atomização da parte  
187 aérea com 15 mL de suspensão de leveduras em diferentes períodos (72, 48, 24 horas antes da  
188 inoculação do patógeno) e, imediato (seguido à inoculação do patógeno). A inoculação do  
189 isolado 91 de *A. brassicicola* ocorreu através da pulverização das plantas com suspensão de  
190  $1 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  logo após a inoculação do tratamento imediato com as leveduras. A  
191 testemunha padrão foi inoculada apenas com o patógeno. Em seguida, as plantas foram

192 colocadas em câmara úmida por 36 horas. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até  
193 a avaliação da doença. A doença foi avaliada conforme descrito anteriormente. O  
194 delineamento experimental utilizado foi o DIC, em arranjo fatorial 7x4, composto de sete  
195 tratamentos (5 isolados de leveduras, uma testemunha padrão e uma testemunha absoluta) e  
196 quatro períodos de aplicação, com quatro repetições, sendo cada repetição representada por  
197 um vaso com uma planta, constituída por três unidades amostrais. Sendo assim, os dados  
198 obtidos foram submetidos à análise de variância e, os tratamentos comparados pelo teste de  
199 Tukey ( $P < 0,05$ ) utilizando o SISVAR. O teste de homogeneidade foi realizado e permitiu que  
200 os dados de severidade de dois ensaios repetidos, fossem analisados conjuntamente.

201

#### 202 **Avaliação da indução de resistência em plantas de couve-manteiga**

203 Para verificar o processo de indução de resistência elicitadas pelas leveduras, as  
204 amostras das plantas do período de 24 horas do ensaio de biocontrole foram coletadas logo  
205 após a avaliação da doença e, em seguida, colocadas para congelar em nitrogênio líquido,  
206 sendo posteriormente armazenadas em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram avaliados os cinco isolados de  
207 leveduras, através dos níveis de atividade enzimática da catalase (CAT) e ascorbato  
208 peroxidase (APX).

209 A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir et al. (1987). Em  
210 solução contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e 25  $\mu\text{L}$  de peróxido  
211 de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 1,0 mM, a reação foi iniciada pela adição de 25  $\mu\text{L}$  do extrato protéico  
212 e, a atividade determinada seguindo-se a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 60 segundos, através de  
213 alterações à 240 nm, sob temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , em espectrofotômetro.

214 A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano & Asada (1981).  
215 O meio de reação foi composto por 650  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100  
216  $\mu\text{L}$  de ascorbato 5,0 mM, 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 1,0 M, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0 mM e 50  $\mu\text{L}$  do

217 extrato protéico. A atividade foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do  
218 ascorbato à 290 nm, temperatura de 30 °C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro.

219

### 220 **Avaliação da atividade *Killer* das leveduras**

221 Para avaliação da produção da toxina *killer*, as Leveduras (L32, L40, L44, L46 e L57)  
222 foram cultivadas em meio SDA por 72 horas, com posterior avaliação em meio tamponado  
223 contendo (pH 4,5, 10 g de peptona, 20 g de dextrose, 20 g glucose, 20 g de ágar, 19,2 g de  
224 ácido cítrico e 34,8 g de fosfato de potássio bibásico para 1L de ADE) e meio YEPD  
225 acrescido de azul de metileno 0,005%. Para a realização do teste, foram utilizados dois  
226 isolados de leveduras, sendo um sensível a toxina *killer* (isolado 14 206 *Candida glabrata*) e  
227 um isolado produtor da toxina (isolado 343 produtor da toxina). Com o auxílio de uma alça de  
228 Drigalsk, foi retirado um pouco do crescimento do isolado 14 206 e, em seguida, emergido  
229 em solução salina a 0,85% por alguns segundos, com posterior semeio em placa de Petri  
230 contendo meio YEPD acrescido de azul de metileno a 0,005%. Logo após, foi colocado um  
231 pouco do crescimento do isolado 343 no centro da placa. As cinco leveduras testadas foram  
232 colocadas em posições equidistantes da placa de Petri. As avaliações foram feitas visualmente  
233 24 e 48 horas após o semeio dos isolados, onde as colônias que apresentaram halo de inibição  
234 foram consideradas positivas quanto à produção da toxina *killer*.

235

### 236 **Avaliação da capacidade de formação de biofilme**

237 Para avaliação da capacidade de formação de biofilme seguiu-se a metodologia visual  
238 descrito por (Pfaller et al.,1995). Os isolados de leveduras (L32, L40, L44, L46 e L57) foram  
239 semeados em placas de Petri contendo meio SDA por 24 horas e mantidos a  $\pm 27^{\circ}\text{C}$ .  
240 Posteriormente, foi preparada uma suspensão em solução salina dos isolados de leveduras  
241 com concentração final de  $10^6$  UFC/mL. 20  $\mu\text{L}$  da suspensão e 180  $\mu\text{L}$  de Sabouraud (AS)  
242 líquido foram postos em poços de microplacas de ELISA e, mantidas à  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas

243 sem agitação. Em seguida, o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada,  
244 sendo adicionado sobre estes, 200 µL do corante safranina por 5 minutos. A avaliação foi  
245 feita de acordo com a intensidade da coloração dos poços. Para interpretação do resultado,  
246 seguiu-se o seguinte critério de avaliação: os de fraca coloração foram lidos como (1+); os de  
247 coloração mediana (2+ a 3+) e fortemente corados (4+), representando aderência fraca,  
248 moderada e forte, respectivamente.

249

### 250 **Produção de metabólitos voláteis pelas leveduras**

251 Foi avaliado o efeito de metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras  
252 (L32, L40, L44, L46 e L57) sobre a inibição do crescimento micelial *in vitro* e esporulação de  
253 *A. brassicicola*. Para a realização do ensaio, placas de Petri contendo meio BDA foram  
254 inoculadas, no centro, com um disco de 5 mm de diâmetro, contendo as estruturas do  
255 patógeno. Com o auxílio de uma alça de Drigalsk, as leveduras foram inoculadas em placas  
256 contendo meio SDA, sendo realizadas riscas na superfície do meio de cultura. As placas  
257 contendo o patógeno e as placas que continham os tratamentos com as leveduras foram  
258 justapostas uma sobre a outra e vedadas com parafilme. O tratamento testemunha consistiu de  
259 placas contendo um disco do patógeno cultivado em meio BDA. Posteriormente, as placas  
260 foram mantidas à temperatura de  $\pm 27^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12/12horas, em condições de  
261 laboratório. O delineamento experimental utilizado foi o DIC, com seis tratamentos (cinco  
262 isolados de leveduras e uma testemunha), com cinco repetições. A avaliação da inibição do  
263 crescimento micelial de *A. brassicicola* foi realizada diariamente, através de medições do  
264 diâmetro da colônia do patógeno em dois eixos ortogonais, iniciando-se 24 horas após o  
265 preparo das placas, até que um dos tratamentos atingisse o diâmetro total da placa. As  
266 avaliações foram realizadas durante um período de 12 dias, calculando-se a porcentagem de  
267 inibição do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha.

268 Para verificar se os metabólitos voláteis produzidos pelas leveduras foram capazes de  
269 inibir a esporulação de *A. brassicicola*, foram preparadas suspensões das colônias que  
270 cresceram do patógeno, com adição de 20 mL de ADE em cada placa, seguida da raspagem  
271 das colônias com alça de Drigalsk. Para cada suspensão de esporos, uma alíquota de 100 µL  
272 foi retirada e transferida para uma câmara de Neubauer, onde procedeu-se a contagem de  
273 esporos de cada tratamento em microscópio óptico. O delineamento experimental utilizado foi  
274 o DIC, com seis tratamentos (cinco isolados de leveduras e uma testemunha), com cinco  
275 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, os tratamentos  
276 comparados pelo teste de tukey ( $P < 0,05$ ) utilizando o SISVAR.

277

278

## Resultados e Discussão

279

### 280 Teste de patogenicidade

281 Dentre os 18 isolados de *A. brassicicola* avaliados em teste de patogenicidade todos  
282 foram patogênicos ocasionando sintomas típicos da mancha-de-alternaria nas folhas de couve-  
283 manteiga, os isolados 91, 17, 104, 15, 168, 14, 101 e 40, apresentaram os maiores índices de  
284 severidade da doença em plantas de couve-manteiga, não havendo diferença significativa  
285 entre eles, porém, eles diferiram estatisticamente dos demais isolados avaliados. No entanto, o  
286 isolado 91 foi selecionado para o ensaio de controle biológico, por apresentar o maior índice  
287 de severidade da doença, em relação aos isolados 17, 104, 15, 168, 14, 101 e 40 (Tabela 1).  
288 Estes resultados corroboram com os encontrados por Micherff et al. (2003), onde todos os  
289 isolados de *A. brassicicola* avaliados em teste de patogenicidade foram patogênicos ao  
290 repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) exibindo os sintomas típicos da mancha-de-  
291 alternaria na folha.

## 292 **Seleção de isolados de leveduras**

293            Dos 39 isolados de leveduras avaliados em casa de vegetação, os isolados (L32, L46,  
294 L40, L57, L44, L49, L52, L61, L51, L33, L50, L53, L39, L35, L60, L37, L36, L43, L41, L1 e  
295 L12) proporcionaram os menores índices de severidade da mancha-de-alternaria em couve-  
296 manteiga, não havendo diferença significativa entre eles. Porém, eles diferiram  
297 estatisticamente do tratamento testemunha e demais isolados avaliados, sendo os isolados  
298 L32, L40, L46, L44 e L57 selecionados para os ensaios de controle biológico, por  
299 apresentarem potencial de biocontrole de *A. brassicicola* (Tabela 2).

300            No presente estudo o fato das leveduras terem sido eficientes na redução da severidade  
301 da doença pode estar relacionado com a competição por espaço e nutrientes no hospedeiro. De  
302 acordo com Droby et al. (2009), a habilidade de competir por espaço, tornam as leveduras  
303 excelentes colonizadores de ferimentos pois, são capazes de consumir nutrientes mais  
304 rapidamente do que os fungos fitopatogênicos, prevenindo assim, o estabelecimento da  
305 doença. Segundo Castoria et al. (1997), além da competição por nutrientes, as leveduras  
306 interagem diretamente com as hifas fúngicas, degradando a parede celular do fungo através de  
307 enzimas líticas.

308

## 309 **Ensaio de biocontrole da mancha-de-alternaria**

310            No ensaio de biocontrole, não foi verificada interação significativa entre leveduras e  
311 períodos de aplicação. Todas as leveduras promoveram índices de severidade inferiores ao  
312 tratamento testemunha. No entanto, as leveduras L46, L32, L44 e L40 foram as mais  
313 eficientes na redução severidade da mancha-de-alternaria, sendo responsáveis por índices de  
314 severidade de 7,66%, 7,78 %, 8,13% e 9,07%, respectivamente, comparado ao tratamento  
315 testemunha que apresentou um índice de severidade de 13,082% (Tabela 3).

316            Com relação aos períodos de aplicação das leveduras, foi verificado que houve  
317 diferença significativa entre os períodos avaliados. O período de 24 horas, antes da inoculação

318 do patógeno e imediato a inoculação diferiu dos demais, sendo considerados os melhores,  
319 pois as plantas de couve-manteiga tratadas com as leveduras nesses períodos apresentaram  
320 menores índices de lesões causadas por *A. brassicicola* (Tabela 3). Este resultado pode estar  
321 relacionado com a época de aplicação das leveduras e seus possíveis mecanismos de ação, já  
322 que esses períodos proporcionaram menores índices de severidade da doença nas plantas de  
323 couve-manteiga.

324 Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Machado & Bettioli  
325 (2010), no patossistema *Botrytis cineria* e lírio (*Lilium* sp.), onde se observou redução da  
326 severidade da doença em plantas tratadas com a levedura *Sporidiobolus pararoseus* Fell &  
327 Tallman 24 horas antes da inoculação do patógeno. Lima et al. (2013) inocularam  
328 *Wickerhamomyces anomalus* Kurtzman, Robnett & Bas-Powers (strain422) e *Meyerozyma*  
329 *guilliermondii* Kurtzman & Suzuki (estirpe 443) em frutos de mamão (*Carica papaya* L.), 12 e  
330 24 horas antes da inoculação do patógeno e, verificaram reduções de 31,35% e 41,17% no  
331 tamanho das lesões incitadas por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz & Sacc. Por outro  
332 lado, os frutos tratados 12 e 24 horas após a inoculação do patógeno, reduziram em apenas,  
333 4% e 10%, respectivamente, o tamanho das lesões.

334 Zhao et al. (2008), obtiveram resultados semelhantes na avaliação da eficácia *in vivo*  
335 de *Pichia guilliermondii* contra *Rhizopus nigricans*. Conforme os autores, o maior nível de  
336 eficiência no controle da infecção de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) ocorreu  
337 quando a levedura foi inoculadas 24 horas antes do patógeno. Os autores ainda relatam uma  
338 redução da doença de 75,5% no tamanho das lesões, quando a inoculação de ambos os  
339 organismos foi imediata. Por outro lado, quando a inoculação foi realizada 24 horas após, a  
340 redução foi de 14,7%. De acordo com El-Ghaouth et al. (2003), a atividade antagônica é mais  
341 promissora, quando a levedura é aplicada antes da inoculação do patógeno.

### 342 **Avaliação da indução de resistência em plantas de couve-manteiga**

343 No ensaio onde avaliou-se as leveduras na indução de resistência em plantas de couve-  
344 de-folha, foi observado que as amostras de folhas analisadas quanto a produção da enzima  
345 catalase (CAT) apresentaram resultados significativos, quando comparado com as  
346 testemunhas. Na presença de todas as leveduras L32, L40, L44, L46 e L57, as plantas de  
347 couve produziram maiores quantidade da enzima CAT (Tabela 4). Este fato pode esta  
348 relacionado a indução de resistência na planta pelas leveduras. Embora, os níveis enzimáticos  
349 do ascorbato peroxidase (APX) nas amostras analisadas terem sido mais expressivos do que  
350 os níveis da CAT, não foi evidenciado a indução de resistência das plantas pela produção de  
351 APX, pois não houve diferença dos tratamentos em relação ao tratamento testemunha (Tabela  
352 4). Possivelmente, as condições ambientais na qual o experimento foi conduzido podem ter  
353 influenciado na proteção das plantas de couve-manteiga, bem como, o processo de resistência  
354 induzido pelas leveduras. Fato este pode estar relacionado com a sensibilidade destes  
355 organismos a altas temperaturas. De acordo com Mello et al. (2011), a colonização pelas  
356 leveduras não depende apenas da disponibilidade de nutrientes e espaço, mas também, dos  
357 fatores ambientais existentes no local.

358 A planta sob estresse é induzida a produzir espécies reativas de oxigênio (EROs),  
359 tornando-se mais resistente à doença (Thoma et al, 2003). Apesar do acúmulo de EROs nos  
360 tecidos da planta induzir resistência contra patógenos, bem como, a ativação de outras reações  
361 de defesa, esse acúmulo é danoso tanto para planta, quanto para o patógeno, uma vez que  
362 pode levar a peroxidação lipídica e causar danos oxidativos (Thoma et al., 2003).

363 Em estudos realizados por Zhao et al., 2008 frutos de tomateiro inoculados com *R.*  
364 *nigricans* e tratados com *P. guillermondii* estirpe CNM 2.1801 expressaram mudanças  
365 bioquímicas através do aumento da atividade da CAT. De acordo com Cai et al., 2015 frutos  
366 de morango (*Fragaria ananassa* Duch) de pré-colheita tratados com *H. uvarum* induziu  
367 resistência nos frutos, o qual pode estar associado com o aumento nos níveis enzimático da

368 CAT e APX (Cai et al., 2015). Da mesma forma, Xu et al. (2013) observaram elevados níveis  
369 da CAT em frutos de pêssgo (*Prunus pérsica*) tratados com *P. caribica*, quando comparada  
370 com a testemunha inoculada com *R. stolonifer*.

371

### 372 **Avaliação da atividade *Killer* das leveduras**

373 No ensaio *in vitro* onde foi avaliado a atividade *Killer* das leveduras, foi observado  
374 que todas as leveduras testadas produziram halos de inibição nos pontos de plaqueamento  
375 com o isolado de *C. glabata* (14 206) sensível a toxina, cultivado em meio SDA por 48 horas,  
376 pH 4,5 e, 26° C de incubação, sendo todas consideradas positivas para a produção de toxina  
377 *Killer* (Tabela 5).

378 A atividade *Killer* verificada nas leveduras (L32, L40, L44, L46 e L57) no presente  
379 estudo, ocorreu provavelmente, devido à capacidade das leveduras produzirem toxinas no  
380 meio de cultivo. Como consequência, é verificada a morte das células da levedura sensível à  
381 toxina, seguida da formação de um halo de inibição ao redor do ponto de inoculação das  
382 leveduras avaliadas. Os resultados do presente estudo concordam com os obtidos por Coelho  
383 et al. (2011) que ao verificarem os possíveis mecanismos de ação das leveduras  
384 *Sporobolomyces roseus* Kluyver & Niel, *P. membranifaciens* Hansen e *P. anomala*,  
385 observaram que as cepas estudadas apresentavam fator *killer* positivo e, que o efeito  
386 antagônico destas leveduras sobre *P. expansum* foi causado pela competição por nutrientes e  
387 antibiose.

388 Lima et al. (2013), demonstraram que as levedura *killer* *W. anomalus* (estirpe 422) e  
389 *M. guilliermondii* (estirpe 443) isoladas de frutos de mamão e inoculadas em frutos de mamão  
390 doentes foram capazes de reduzir os ferimentos causados por *C. gloeosporioides*. Os autores  
391 observaram ainda, que estas leveduras agem pela competição por espaço e nutrientes,  
392 micoparasitismo e secreção de enzimas líticas.

393

### 394 **Avaliação da capacidade de formação de biofilme**

395 No ensaio *in vitro* onde foi avaliada a formação de biofilme dos isolados de leveduras  
396 L32, L40, L44, L46 e L57, foi observado que as leveduras L32 e L40, não produziram  
397 biofilmes. Por outro lado, as leveduras LV44, LV46 e LV57 produziram biofilmes em níveis  
398 relativamente baixos (Tabela 5), onde pode-se observar à aderência das células  
399 leveduriformes no fundo dos poços da placa de ELIZA. Este resultado pode estar relacionado  
400 às características de biocontrole da própria levedura, isso por que nem sempre o biofilme pode  
401 estar presente no controle de uma doença, mas todos os mecanismos de ação de uma levedura  
402 podem agir no controle do agente fitopatogênico.

403 Apesar das leveduras L44 e L46 terem produzidos biofilmes fracamente, as mesmas  
404 foram eficientes no controle da mancha-de-alternaria em couve-manteiga, sendo responsáveis  
405 pela redução da severidade da doença, provavelmente, por competição de espaço e nutrientes.  
406 Parafati, et al. (2015), ao analisarem os possíveis mecanismos de ação das leveduras  
407 *Metschnikowia pulcherrima* Pitt & Mill, *W. anomalus*, *Aureobasidium pullulans* Arnaud  
408 estirpe P11 e *Saccharomyces cerevisiae* Gasperini no controle de *B. cinerea* em frutos de  
409 videira (*Vitis vinifera* L.), verificaram que apesar de *A. pullulans* estirpe P11 não ter produzido  
410 biofilme nos ensaios *in vitro*, esta levedura mostrou-se eficiente, como colonizadora de  
411 ferimentos nos experimentos *in vivo*, enquanto *S. cerevisiae* proporcionou menor capacidade  
412 de colonização dos ferimentos, sem a formação de biofilme. Por outro lado, os mesmos  
413 autores verificaram que *M. pulcherrima* e *W. anomalus*, além de competirem por nutrientes  
414 em tecidos feridos, produziram uma grande quantidade de biofilme.

415 A capacidade de formação de biofilmes por agentes de biocontrole em lesões causadas  
416 por fitopatógenos foi indicado como um possível mecanismo de ação de microrganismos  
417 antagonistas (Ortu et al., 2005). No entanto, Segundo Droby et al. (2009), pouco se sabe sobre  
418 o papel do biofilme na atividade de biocontrole por leveduras antagonistas e, a compreensão  
419 desses mecanismos, assim como os estímulos ambientais que regulam as transformações

420 morfogenéticas em agentes de biocontrole podem levar a seleção dos antagonistas mais  
421 promissores.

422

### 423 **Produção de metabólitos voláteis pelas leveduras**

424 Todas as leveduras (L32, L40, L44, L46 e L57) testadas quanto à produção de  
425 metabólitos voláteis promoveram reduções do crescimento micelial *in vitro* de *A. brassicicola*  
426 que variaram de 54,55% à 60,33%, quando comparados com a testemunha, além de inibirem  
427 em 100 % a esporulação do patógeno (Tabela 5).

428 A redução do crescimento *in vitro* e a inibição da esporulação de *A. brassicicola* pode  
429 ter ocorrido devido à produção de metabólitos voláteis tóxicos ao patógeno liberados pelas  
430 leveduras no meio de cultivo, visto que, as mesmas não tiveram contato direto com as hifas do  
431 patógeno. Resultados semelhantes ao presente estudo foram relatados por outros  
432 pesquisadores. Conforme Saravanakumar et al. (2009), a levedura *M. pulcherrima* estirpe  
433 MACH1 inibiu o crescimento micelial de *B. cinerea* e reduziu a germinação de conídios *in*  
434 *vitro* do patógeno. Para os autores, este fato pode estar relacionado com a produção de  
435 proteínas e metabólitos extracelulares produzidos pela levedura. Segundo Kamel (2013), *P.*  
436 *caribaea*, *Geotrichum candidum* e *C. tropicalis*, mostraram atividade antagonista contra  
437 *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *Fusarium solani* (Mart.)  
438 Sacc. com inibição do crescimento micelial de 77,8%, 74,0% e 55, 6%, respectivamente.

439 Muitos microrganismos com ação biocontroladora produzem metabólitos que podem  
440 interferir no crescimento de patógenos. A atividade das enzimas líticas capazes de degradar a  
441 parede celular de fitopatógenos e, a produção de compostos voláteis tóxicos estão entre esses  
442 metabólitos (Bruce et al., 2004).

## Conclusões

443

444

- 445 1. As leveduras L32, L40, L44, L46 e L57 são eficientes como agentes protetores na  
446 redução da severidade da mancha-de-alternaria, causada por *Alternaria brassicicola*;
- 447 2. Os períodos de inoculação das leveduras 24 horas, antes da inoculação do patógeno e  
448 imediato a inoculação do patógeno são os mais eficazes na redução da doença;
- 449 3. As leveduras L32, L40, L44, L46 e L57 proporcionaram elevados níveis enzimáticos  
450 de catalase na presença de *A. brassicicola* em couve-manteiga, indicando uma possível  
451 indução de resistência das plantas pelas leveduras;
- 452 4. Todas as cinco leveduras avaliadas apresentam potencial de produção de toxina *killer*;
- 453 5. Os cinco isolados de leveduras, além de reduzirem o crescimento micelial de *A.*  
454 *brassicicola*, são eficientes na inibição *in vitro* de 100% dos conídios do patógeno.

455

## Agradecimentos

456

457 Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela  
458 concessão da bolsa de estudo.

459

## REFERÊNCIAS

460

461

462 AZEVÊDO, S.S.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. Levantamento da intensidade da  
463 podridão negra e da alternariose do repolho no agreste de Pernambuco e determinação do  
464 tamanho das amostras para quantificação dessas doenças. **Summa Phytopathologica**, v.26,  
465 p.299-306, 2000.

- 466 BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas.  
467 1. ed<sup>a</sup>. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. v.1, 341p.  
468
- 469 BRUCE, A.; VERRALL, S.; HACKETT, C.A.; WHEATLEY, R.E. Identification of volatile  
470 organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain  
471 fungi. **Holzforschung**, v.58, p.193-198, 2004.  
472
- 473 CAI, Z.; YANG, R.; XIAO, H.; QIN, X.; SI, L. Effect of preharvest application of  
474 *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. **Postharvest Biology and**  
475 **Technology**, v.100, p.52-58, 2015.  
476
- 477 CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCIO, V.  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two  
478 saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest  
479 diseases. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p.293-300, 1997.  
480
- 481 COELHO, A.R.; NÓBREGA, G.M.A.; PAGNOCCA, F.C.; HOFFMANN, F.L.; HARADA,  
482 K.; HIROOKA, E.Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de  
483 deteriorações por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p.1879-1892,  
484 2011.  
485
- 486 CONN, K.L.; TEWARI, J.P.; AWASTHI, R.P. A disease assessment key for *Alternaria*  
487 blackspot in rapeseed and mustard. **Canadian Plant Disease Survey**, v.70, p.19-22, 1990.  
488
- 489 DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of  
490 postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and**  
491 **Technology**, v.52, p.137-145, 2009.

- 492 EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of  
493 apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, v.93,  
494 p.344-348, 2003.
- 495
- 496 EL-MEHALAWY, A.A. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of  
497 kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. **International journal of agriculture e biology**,  
498 v.6, p.310-316, 2004.
- 499
- 500 FILGUEIRA, F.A.R. **Brassicáceas couves e plantas relacionadas**. In: FILGUEIRA, F.A.R.  
501 (ED.). Novo manual de olericultura. 3 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. v.1,  
502 p. 280-299.
- 503
- 504 FRANÇA, G.S.; CARVALHO, R.R C.; NEVES, R.P.; ARAUJO, E.R.; LARANJEIRA, D.  
505 Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*.  
506 **Bioscience Journal**. v.31, p.451-459, 2015.
- 507
- 508 HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiple  
509 forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.
- 510
- 511 JIJAKLI, M.H. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research  
512 and practical applications. **Biological Control**, v.99, p.93-105, 2011.
- 513
- 514 KAMEL, Z.; EL-MONIEM, N.H.A. Potential of antagonistic yeast strains as biocontrol  
515 agents against root rot disease in tomato. **International Journal of Advanced Research**, v.1,  
516 p.372-390, 2013.

- 517 LIMA, J.R.; GONDIME, D.M.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; OLIVEIRA, F.S.A.; GONCALVES,  
518 L.R.B.; VIANA, F.M.A. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya  
519 anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v.83 p.58-64, 2013.
- 520
- 521 MACHADO, M.A.C.F.; BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por  
522 leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45,  
523 p.539-545, 2010.
- 524
- 525 MARINGONI, A.C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, couve-flor,  
526 rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A.;  
527 CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas**  
528 **cultivadas**. 3. ed. Agronômica Ceres, 2005. p.285-291.
- 529
- 530 MELLO, M.R.F.; SILVEIRA, E.B.; VIANA, I.O.; GUERRA, M.L.; MARIANO, R.L.R. Uso  
531 de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura**  
532 **Brasileira**, v.29, p,78-83, 2011.
- 533
- 534 MICHEREFF S.J; NORONHA M.A; ROCHA JÚNIOR O.M; SILVA J.A; MIZUBUTI  
535 E.S.G. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco.  
536 **Fitopatologia Brasileira** v.28, p.656-663, 2003.
- 537
- 538 MOREIRA, P.A.A. **Diversidade de isolados de *Alternaria brassicicola* (schwn.) wilt. de**  
539 **cultivos convencionais e orgânicos de brássicas de Pernambuco**. 2008,48 f. Dissertação  
540 em fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

- 541 NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific  
542 peroxidase in apinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v.22, p.867-880, 1981.  
543
- 544 NOVO, M. DO C. DE S.S.; PRELA-PANTANO, A.; DEUBER, R.; TORRES, R.B.; TRANI,  
545 P.E.; BRON, I.U. **Morfologia de folhas de couve do Banco de Germoplasma do Instituto**  
546 **Agrônômico**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2010. 27p.  
547
- 548 NUNES, C.A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant**  
549 **Pathology**. v.133, p.181-196, 2012.  
550
- 551 ORTU, G.; DEMONTIS, M.A.; BUDRONI, M.; GOYARD, S.; D'ENFERT, C.; MIGHELI,  
552 Q. Study of biofilm formation in *Candida albicans* may help understanding the biocontrol  
553 capability of a *flor* strain of *Saccharomyces cerevisiae* against the phytopathogenic fungus  
554 *Penicillium expansum*. **Journal of Plant Pathology**, v.87, p.267-309, 2005.  
555
- 556 PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Variations in DNA subtype, antifungal  
557 susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*.  
558 **Diagnostic Microbiology Infectious and Diseases**, v.21, p.9-14, 1995.  
559
- 560 PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and  
561 action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest  
562 bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, v.47, p.85-92, 2015.  
563
- 564 REIS, A.; BOITEUX, L.S. *Alternaria* species infecting brassicaceae in the Brazilian  
565 neotropics: geographical distribution, host range and specificity. **Journal of Plant Pathology**,  
566 v.92, p.661-668, 2010.

- 567 SARAVANAKUMAR, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Detection  
568 of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima*  
569 strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agente. **European Journal of Plant**  
570 **Pathology**, v.123, p.183-193, 2009.
- 571
- 572 CONTRERAS, L.Y.S.; RIAÑO, A.L.R. Aislamiento de microorganismos para el control  
573 biológico de *Moniliophthora roreri*. **Acta Agronómica**, v.62, p.370-378, 2013.
- 574
- 575 THOMA, I.; LOEFFLER, C.; SINHA, A K.; GUPTA, M.; KRISCHKE, M.; STEFFAN, B.;  
576 ROITSCH, T.; MUELLER, M.J. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive  
577 oxygenspecies trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. **Plant**  
578 **Journal**, v.34, p.363-375, 2003.
- 579
- 580 VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In:  
581 MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente,  
582 2000. p.41-55.
- 583
- 584 VERMA, P.R.; SAHARAN, G.S. Monograph on Alternaria Diseases of Crucifers. Saskatoon.  
585 **Minister of Supply and Services**. Canada, 1994, 162p.
- 586
- 587 XU, B.; ZHANG, H.; CHEN, K.; XU, Q.; YAO, Y.; GAO, H. Biocontrol of postharvest  
588 Rhizopus decay of peaches with *Pichia caribbica*. **Current Microbiology**, v.67, p.255-261,  
589 2013.

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

593

594 ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Efficacy of the antagonist  
595 *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its  
596 modes of action. **Biological Control**, v.54, p.172-180, 2010.

597 **Tabela 1.** Avaliação de isolados de *Alternaria brassicicola*, quanto à agressividade em  
 598 plantas de couve-manteiga.

<b>Isolados de <i>Alternaria brassicicola</i></b>	<b>ISD% <sup>(1)</sup></b>
91	7,00 a*
17	6,25 a
104	6,16 a
15	5,58 a
168	5,08 a
14	5,08 a
101	5,00 a
40	4,50 a
90	2,42 b
54	2,16 b
55	1,83 b
128	1,75 b
71	1,33 b
64	1,25 b
52	1,00 b
116	0,67 b
100	0,24 b
3	0,00 b
Testemunha absoluta	0,00 b
CV%	45,69

599

600 <sup>(1)</sup> ISD= Índice de severidade da doença. Avaliação da severidade da doença através de escalas de  
 601 notas segundo (Conn et al, 1990).

602 \* Médias originadas de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem  
 603 significativamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

604 **Tabela 2.** Avaliação de 39 leveduras obtidas do isolamento de folhas sadias de couve-  
 605 manteiga, brócolis, couve-flor e repolho no biocontrole de *Alternaria brassicicola* em couve-  
 606 manteiga.

Tratamento	ISD% <sup>(1)</sup>	Tratamento	ISD% <sup>(1)</sup>
L32	1,247 a *	L12	7,582 a *
L46	1,330 a	L4	9,252 b
L40	1,582 a	L29	10,915 b
L57	1,585 a	L6	10,917 b
L44	1,585 a	Testemunha <sup>(2)</sup>	11,355 b
L49	1,650 a	L25	11,917 b
L52	1,650 a	L3	12,582 b
L61	1,650 a	L20	12,920 b
L51	1,917 a	L22	14,000 b
L33	2,250 a	L9	14,000 b
L50	2,332 a	L27	14,165 b
L53	2,332 a	L16	14,252 b
L39	2,417 a	L10	15,167 c
L35	2,417 a	L13	15,582 c
L60	2,500 a	L18	15,832 c
L37	2,582 a	L24	16,650 c
L36	2,670 a	L7	16,915 c
L43	2,750 a	L17	18,167 c
L41	3,417 a	L11	19,417 c
L1	3,835 a	L5	19,665 c
CV%			39,8

607

608 <sup>(1)</sup> ISD= Índice de severidade da doença. Avaliação da severidade da doença através de escalas de notas  
 609 segundo (Conn et al, 1990).

610 <sup>(2)</sup> Testemunha= plantas inoculadas apenas com *A. brassicicola*.

611 \* Médias originadas de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem  
 612 significativamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

613 **Tabela 3.** Avaliação de cinco isolados de leveduras e períodos de aplicação, na redução da  
 614 severidade da mancha-de-alternaria, causada por *Alternaria brassicicola* em couve-manteiga.

<b>Tratamento</b>	<b>ISD % <sup>(1)</sup></b>
LV46	7,656 a *
LV32	7,784 a
LV44	8,135 a
LV40	9,073 ab
LV57	10,176 b
Testemunha padrão <sup>(2)</sup>	13,082 c
<b>Período (horas) <sup>(3)</sup></b>	<b>ISD % <sup>(1)</sup></b>
24	8,423 a *
IME	8,780 ab
48	9,877 bc
72	10,243 c
CV%	27,84

615

616 <sup>(1)</sup> ISD= Índice de severidade da doença. Avaliação da severidade da doença através de escalas  
 617 de notas segundo (Conn et al, 1990).

618 <sup>(2)</sup> Testemunha padrão= plantas inoculadas apenas com *A. brassicicola*.

619 <sup>(#)</sup> Período de inoculação das leveduras em plantas de couve-manteiga.

620 \* Médias originadas de dois experimentos repetidos no tempo. Médias seguidas pela mesma  
 621 letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de  
 622 probabilidade.

623 **Tabela 4.** Efeito de leveduras como agentes indutores de resistência da mancha-de-  
 624 alternaria em couve-manteiga, verificados através dos níveis enzimáticos da catalase  
 625 (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

<b>Tratamento</b>	<b>Catalase (mg/gMF) <sup>(1)</sup></b>	<b>Ascorbato peroxidase (mg/gMF) <sup>(1)</sup></b>
LV46	0,388 a *	14,200 a *
LV44	0,388 a	11,600 a
LV40	0,333 ab	7,200 a
LV32	0,244 ab	15,100 a
LV57	0,244 ab	24,100 a
Testemunha absoluta <sup>(2)</sup>	0,105 b	10,033 a
Testemunha padrão <sup>(3)</sup>	0,139 b	24,500 a
<b>CV%</b>	<b>33,35</b>	<b>49,59</b>

626

627 <sup>(1)</sup> Quantidade de enzimas produzidas na planta (mg/g de massa fresca);

628 <sup>(2)</sup> Testemunha absoluta= plantas sadias não inoculadas;

629 <sup>(3)</sup> Testemunha padrão= plantas inoculadas apenas com *A. brassicicola*;

630 \* Médias originadas de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem

631 significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

632 **Tabela 5.** Avaliação de isolados de leveduras na inibição do crescimento micéial *in vitro* de  
 633 *Alternaria brassicicola* e inibição da formação de conídios, quanto à produção de toxina  
 634 *Killer* e formação de biofilme.

<b>Tratamento</b>	<b>PIC <sup>(1)</sup></b>	<b>(NC) <sup>(2)</sup> conídios mL<sup>-1</sup></b>	<b>Produção de toxina</b>	<b>Formação de biofilme</b>
LEV46	60,334 a *	0 a *	+ <sup>(3)</sup>	Fraca (1+) <sup>(4)</sup>
LEV44	59,774 a	0 a	+	Fraca (1+)
LEV40	56,224 ab	0 a	+	Ausente
LEV32	54,880 ab	0 a	+	Ausente
LEV57	54,558 b	0 a	+	Fraca (1+)
Testemunha (patógeno)	0,000 c	9,24 x10 <sup>5</sup> b	- <sup>(5)</sup>	- <sup>(5)</sup>
CV%	13,37	29,64		

635

636 <sup>(1)</sup> PIC= Porcentagem de inibição do crescimento do fungo.

637 <sup>(2)</sup> número de conídios produzidos pelo patógeno.

638 <sup>(3)</sup> Reação positiva para a produção de toxina *Killer*.

639 <sup>(4)</sup> Avaliação feita de acordo com a intensidade da coloração dos poços da placa de ELISA pelas leveduras.

640 Os de Fraca coloração foram lidos como (1+); os de coloração mediana (2+ a 3+) e fortemente corados (4+),  
 641 representando aderência fraca, moderada e forte, respectivamente (Pfaller et al., 1995).

642 <sup>(5)</sup> O tratamento testemunha não possui dados de produção de toxinas e formação de biofilmes.

643 \* Médias originadas de cinco repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem  
 644 significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



## **CONCLUSÕES GERAIS**

## CONCLUSÕES GERAIS

- As leveduras L32, L40, L44, L46 e L57 apresentaram potencial de controle da mancha-de-alternaria em couve-manteiga; eficientes como agentes protetores na redução da severidade da mancha-de-alternaria, causada por *Alternaria brassicicola*;
- Os períodos de inoculação das leveduras 24 horas, antes da inoculação do patógeno e imediato a inoculação do patógeno foram consideradas os mais eficazes na redução da doença;
- Plantas de couve-manteiga tratadas com as leveduras L32, L40, L44, L46 e L57 produziram maiores quantidades de catalase, indicando uma possível indução de resistência das plantas pelas leveduras à mancha-de-alternaria;
- Todas as cinco leveduras avaliadas apresentam potencial de produção de toxina *killer*;
- Os cinco isolados de leveduras, além de reduzirem o crescimento micelial de *A. brassicicola*, são eficientes na inibição *in vitro* de 100% dos conídios do patógeno.
- O uso de leveduras como agentes protetores de plantas de couve-manteiga demonstra ser uma ferramenta promissora no controle biológico de *Alternaria brassicicola*.