



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE
BIOLÓGICO DA PODRIDÃO-VERDE DO INHAME**

Gisely Santana De França

**Recife – PE
Setembro -2016**

GISELY SANTANA DE FRANÇA

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE
BIOLÓGICO DA PODRIDÃO-VERDE DO INHAME**

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:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE) – Orientador

Profa. Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE) – Coorientadora

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE) – Coorientadora

**RECIFE – PE
SETEMBRO – 2016**

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO CONTROLE
BIOLÓGICO DA PODRIDÃO-VERDE DO INHAME**

GISELY SANTANA DE FRANÇA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 14/09/2016.

ORIENTADOR:

Prof^o. Dr^o. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (UFPE)

**RECIFE – PE
SETEMBRO – 2016**

Á Deus pela oportunidade da vida e todas as bênçãos conferidas, por ter me dado coragem para seguir adiante em meio a tantas dúvidas e atribulações.

OFEREÇO

Aos meus pais Maria José e Maciel, meus melhores exemplos de determinação e coragem. Aos meus amigos e colegas de estudo por me apoiarem e incentivarem a seguir em frente, mesmo quando eu não me achei capaz.

DEDICO

Á Deus, a minha família, ao Profº Drº Delson Laranjeira que me apoiaram na realização deste sonho.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por colocar em minha vida pessoas maravilhosas que me concederam força, animação e determinação para não desistir da caminhada árdua;

À minha família, meus pais, meu irmão José Luiz, minha avó Maria José, minha amiga Angela Roberta, pela paciência, compreensão, pelo amor, incentivo e principalmente por acreditar que eu seria capaz de superar os obstáculos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (**UFRPE**) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (**PPGF**), por minha formação, conselhos e todos os conhecimentos transmitidos;

Ao **Profº Drº. Delson Laranjeira**, que foi mais do que um pai, por toda compreensão, incentivo, orientação e ensinamentos desde o início da minha formação acadêmica;

As **Profª Drªs. Rejane Pereira Neves e Sônia Maria Alves de Oliveira**, pela orientação e participação nesse trabalho;

Aos colegas que fazem o Laboratório de Fungos do Solo, por toda a ajuda durante a execução desse trabalho;

Aos colegas do PPGF, pela amizade, convivência e auxílio, durante o período de disciplinas e experimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT.....	8
Capítulo I.....	9
INTRODUÇÃO GERAL	10
1. Importância do Inhame.....	10
2. A cadeia produtiva do inhame no Nordeste Brasileiro e no Mundo	11
3. Doenças do inhame.....	13
4. Sintomas causados por <i>P. sclerotigenum</i> em inhame.....	14
5. Controle da podridão verde do inhame.....	15
6. Controle Biológico	16
6.1 Leveduras e a produção de enzimas no controle biológico	18
6.2 Leveduras e a produção de proteínas <i>killer</i> no controle biológico	19
6.3 Leveduras e a produção de biofilme no controle biológico.....	20
6.4 Antibiose como mecanismo de Biocontrole de leveduras.....	22
6.5 Indução de resistência.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
Capítulo II-Mecanismos de biocontrole de leveduras à <i>Penicillium sclerotigenum</i> agente etiológico da podridão verde do inhame.....	33
Resumo	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	43
Conclusões.....	47
Agradecimentos.....	47
Referências	48
CONCLUSÕES GERAIS.....	56

RESUMO GERAL

O inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.), também denominado de inhame-da-costa ou cará-da-costa pertence à família Dioscoreaceae. Esta cultura é acometida por várias doenças, sendo a podridão verde uma das mais importantes, pois ocasiona perdas por deterioração biológica das túberas durante o transporte e armazenamento. Tendo como agente etiológico *Penicillium sclerotigenum*. Para o controle da doença é recomendado o tratamento químico, com fungicidas à base de benomyl ou thiabendazol. No entanto, o controle químico induz resistência, e polui o meio ambiente, havendo a necessidade de alternativas para o controle. O controle biológico torna-se uma alternativa promissora com considerável sucesso no controle de doenças de pré e pós-colheita. Dentre os agentes antagonistas utilizados no controle biológico estão as leveduras. Sendo assim, o objetivo da pesquisa foi selecionar isolados de leveduras e avaliar quanto aos mecanismos de biocontrole. As leveduras foram obtidas, de fragmentos de folhas, e túberas sadias de inhame. Os isolados de *P. sclerotigenum* utilizados nos testes de patogenicidade e biocontrole foram isolados de túberas com sintomas típicos da doença. O teste de patogenicidade foi realizado com dez isolados, sendo o isolado PES- 02, o mais agressivo e selecionado para o teste de biocontrole. Na seleção de leveduras, quinze isolados se destacaram, reduzindo o diâmetro médio da lesão, sendo produtoras de toxina *killer*, compostos voláteis e produção de biofilme. Este resultado subsidiou o teste de biocontrole, no qual se destacaram as leveduras LEV 02 e LEV 09 como agentes de biocontrole da podridão verde do inhame. As duas leveduras foram avaliadas quanto à indução de resistência em túberas através da produção das enzimas ascorbato peroxidase e catalase. Foi verificada uma variação nos níveis de enzimas nas túberas tratadas com o patógeno e as leveduras; quando comparada com as testemunhas, tratadas apenas com o patógeno e água destilada esterilizada. As leveduras demonstraram potencial de biocontrole, sendo uma ferramenta para o controle biológico do *P. sclerotigenum* no inhame.

Palavras-chave: agentes antagonistas, biocontrole, *Dioscorea cayennensis*, fitopatógeno e *Penicillium sclerotigenum*.

GENERAL ABSTRACT

The yam (*Dioscorea cayennensis* Lam.), Also called yam-the-coast or yams-the-coast belongs to Dioscoreaceae family. This culture is affected by various diseases, the green rot one of the most important, as it causes loss of biological deterioration of tubers during transport and storage. It is caused by the fungus *Penicillium sclerotigenum*. To control the disease is recommended chemical treatment with fungicides based on benomyl or thiabendazole. However, chemical control induces resistance, and contaminates the environment with the need for alternatives to control. Biological control becomes a promising alternative with considerable success in the control of diseases pre and post-harvest. Among the antagonists used in biological control are the yeast. Thus, the aim of this research was to select yeast isolates and evaluate these as the biocontrol mechanisms. Yeasts were obtained from fragments of leaves, tubers and healthy yam. The *P. sclerotigenum* isolates used in the pathogenicity and biocontrol tests were isolated from tubers with typical symptoms of the disease. The pathogenicity test was conducted with ten isolated, and the isolated PES 02, the most aggressive and selected for the biocontrol assay. In selecting yeast fifteen isolates were highlighted by reducing the average lesion diameter, being positive for killer toxin, producing volatile compounds and biofilm production. This result supported the biocontrol test, which stood out as the green yams rot biocontrol agents the yeast LEV 02 and LEV 09. These two yeasts were evaluated for resistance induction in tubers through the production of enzymes ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT). A variation in enzyme levels in the treated tubers with the pathogen and yeast was verified; when compared to the checks, the pathogen treated only with sterile distilled water. Yeasts have shown potential biocontrol, being a tool for biological control of *P. Sclerotigenum* in yam.

Keywords: antagonists, biocontrol, *Dioscorea cayennensis*, plant pathogen and *Penicillium sclerotigenum*.

Capítulo I

Introdução Geral

Potencial de leveduras no controle biológico da podridão verde do inhame

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância do Inhame

O inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) é uma planta herbácea, com caules volúveis que produz rizomas isolados ou em feixes, com coloração escura na casca e polpa de cor branca, amarelada ou avermelhada. A maioria das espécies não serve para alimentação. É uma planta monocotiledônea, herbácea, trepadeira, pertencente ao gênero *Dioscorea*, com cerca de 600 espécies, sendo as mais importantes as que produzem túberas comestíveis: *D. cayennensis*, *D. rotundata*, *D. alata*, *D. trifida* e *D. esculenta* (SANTOS et al., 2006).

D. cayennensis var. *rotundata* possui um único cultivar, conhecido vulgarmente por cará-da-costa, inhame-da-costa ou simplesmente inhame. A palavra inhame parece ser tradução dos termos “yam” ou “igname”, usados originalmente nas colônias inglesas e francesas da África, respectivamente. Na língua portuguesa, especialmente no Nordeste do Brasil, há uma tendência para que o termo inhame seja aplicado aos tubérculos grandes de *D. cayennensis* e, o termo cará, aplicado aos tubérculos menores como *D. alata*, (MOURA, 2005).

A cultura do inhame é de origem africana, e ao longo dos séculos vem fazendo parte do cardápio de diversas civilizações. No Brasil, os primeiros relatos ocorreram no período da colonização portuguesa, através do trânsito de mercadorias entre a costa africana e a Índia. A denominação, inhame da costa, refere-se a uma alusão a costa africana, principal centro de dispersão da cultura (MESQUITA, 2002).

O inhame é um alimento básico para as populações em muitos países tropicais do oeste da África e no Nordeste brasileiro vem se destacando como uma alternativa promissora para os pequenos e médios produtores, devido ao seu grande potencial de exportação e consumo interno (GARRIDO; MENDES, 1999). O inhame-da-costa é um produto agrícola de alto valor comercial para os mercados interno e externo, sendo alimento rico em carboidratos e vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina e

niacina), carboidratos (amido principalmente), minerais e propriedades medicinais, além de apresentar baixo teor de gorduras (SANTOS et al., 2007).

A planta é tipicamente tropical, de clima quente e úmido. Para o bom desenvolvimento da cultura, a temperatura média deve ser de 23 a 25°C; não tolerando frio e, especialmente geadas. Existe uma grande variedade de inhames, entre as quais o inhame-branco, o inhame-bravo, o inhame-cigarra, o inhame-da-china (também chamado de inhame-cará) e o inhame-taioba. Entre os principais podem ser citados as variedades São Tomé, bastante difundida na região Centro-Sul e no Nordeste brasileiro, e o Cará-da-Costa, que é o mais cultivado (SANTOS et al., 2007).

Quanto as características do solo para o plantio, o inhame prefere solos areno-argilosos ou mesmo arenosos, leves e bem profundos, com pH na faixa de 5,5 a 6,0. A planta responde bem ao fósforo; por isso, se o teor no solo for baixo, conforme a análise do solo, recomenda-se adicionar fosfato natural ao adubo orgânico ou aplicá-lo diretamente no solo, antes do plantio (SANTOS, 1996, 2002; SANTOS et al., 2006).

É uma cultura de sequeiro no Nordeste brasileiro, o plantio irrigado é feito de setembro a outubro e, sem irrigação, de janeiro a março. No Centro-Sul, o plantio é feito de setembro a dezembro, quando começa o período das chuvas. Em regiões de baixa altitude, com temperaturas médias anuais mais elevadas, planta-se de junho a setembro. Na falta de chuvas, o uso de irrigação após o plantio apressa a brotação e favorece o desenvolvimento inicial das plantas, obtendo-se colheitas precoces e melhores preços na comercialização (SANTOS et al., 2007).

2. A cadeia produtiva do inhame no Nordeste Brasileiro e no Mundo

Em 2008 a produção mundial do tubérculo foi de 51,7 milhões de toneladas. A produção brasileira foi de 250.000 toneladas dentro de uma área cultivada de 27.000 hectares (FAO, 2016). O inhame é atualmente o quarto tubérculo mais importante para a agricultura mundial, ficando depois apenas da batata (*Solanum tuberosum* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e batata doce (*Ipomoea batatas* L.) (OLIVEIRA, 2005).

No Brasil, *D. cayennensis* possui uma única variedade de valor comercial, conhecida vulgarmente por cará-da-costa, inhame-da-costa ou simplesmente inhame. A maior parte da produção de inhame-da-costa do Nordeste é encaminhada para o comércio interno e a outra parte, a de melhor qualidade comercial, para exportação,

sendo os Estados Unidos, Reino Unido, Holanda, Canadá e França os principais importadores da cultura (MESQUITA, 2002).

O inhame-da-costa é um produto agrícola de alto valor comercial para os mercados interno e externo, sendo alimento rico em carboidratos e vitaminas do complexo B. No entanto, os problemas fitossanitários da cultura na região Nordeste resultam em importantes fatores limitantes para seu cultivo e comercialização, os quais diminuí a produtividade da cultura, ocasionam perdas por deterioração biológica das túberas durante o transporte e o armazenamento, além de reduzir o valor unitário no comércio interno e provocar exclusões nas exportações (OLIVEIRA, 2005).

No Nordeste do Brasil, o inhame é cultivado especialmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Maranhão, os quais são os principais produtores nacionais de inhame. A grande maioria dos plantios é cultivada por agricultores familiares. Além dos empregos diretos, a cadeia produtiva do inhame envolve outros setores como: armazenamento, transporte e comercialização (OLIVEIRA, et al., 2007).

Ao longo do tempo, o inhame foi se estabelecendo no estado de Pernambuco junto às regiões de maior concentração populacional, na Região Metropolitana e Zona da Mata como cultura alimentar complementar ao cultivo da cana-de-açúcar. Posteriormente, a cultura se estendeu para o Agreste pernambucano (MENDES; SILVA; FAVERO, 2016).

Atualmente o agronegócio internacional do inhame vem tendo um aumento expressivo, contribuindo para a expansão de áreas cultivadas na região Nordeste do Brasil. Em termos de produção e área plantada, os países africanos, principalmente a Nigéria, Gana e Costa do Marfim, dominam o panorama internacional. No cenário Sul Americano, o Brasil destaca-se como importante produtor, cultivando em média 25 mil hectares e colhendo uma produção de aproximadamente 225 mil toneladas. Os Estados produtores da Paraíba, Pernambuco e Bahia, respondem por 90% da produção nacional. Contudo, os reduzidos investimentos na ciência e tecnologia aplicada ao desenvolvimento da cultura, têm ameaçado esta posição do Brasil no cenário Sul Americano (MESQUITA, 2001).

Os plantios brasileiros apresentam baixa produtividade (9,7 t/ha) a qual é justificada pelo baixo nível tecnológico empregado no manejo da cultura. O baixo nível tecnológico também reflete no controle eficiente dos problemas fitossanitários que afetam o rendimento do inhame a ser comercializado, principalmente no mercado internacional (MENDES; SILVA; FAVERO, 2016).

Na Bahia, o município de Maragogipe, é a principal região produtora da cultura do inhame, sendo o cultivo da planta responsável por 37% da renda dos produtores (MENDES et al., 2003).

3. Doenças do inhame

O inhame é acometido por várias doenças causadas por diferentes microrganismos, como: vírus, fungos, nematoides. Entre as doenças causadas por fungos as principais são: a queima-das-folhas do inhame, também conhecida por queima, pinta-preta ou mesmo varíola, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis* (P. Henn) Meyer. Trata-se de uma doença que provoca altas perdas em plantios irrigados e no período chuvoso, por apresentar alta incidência e severidade em todas as áreas de produção de inhame no Nordeste do Brasil, principalmente em plantas jovens. Afeta o crescimento da hospedeira por atingir significativamente as folhas, que se apresentam necrosadas e retorcidas formando um quadro típico de crestamento com nanismo. O sintoma secundário ou reflexo é o pequeno tamanho das túberas comerciais e das sementes. Em casos extremos de incidência e severidade, formam-se grandes áreas de plantas queimadas e mortas, com índices que podem atingir 100% de perda (MENDES, 2010).

Entre os problemas fitossanitários mais importantes que podem restringir, sobretudo, o comércio exportador do inhame; encontra-se a doença de pós-colheita conhecida como podridão verde. Esta doença incide com alta severidade sobre túberas comerciais e sementes de inhames das cultivares Costa e São Tomé (OLIVEIRA, et al. 2007). A causa é o fungo *P. sclerotigenum* descrito inicialmente no Japão por Yamamoto et al., em 1955, parasitando inhame chinês (*Dioscorea batatas* Dec). No Brasil, essa doença foi relatada em 1976 em cultivos no Estado de Pernambuco, por Moura et al., ocasião em que foi criada a denominação podridão-verde (MOURA, 2005).

O agente etiológico da podridão verde do inhame, *P. sclerotigenum* foi classificado inicialmente como pertencente ao subgênero *Furcatum* devido à presença de conidióforo biverticilados assimétricos, no entanto, recentemente *P. sclerotigenum* teve vários conidióforos triverticilados observados, sendo a espécie posteriormente reclassificada como pertencente ao gênero *Penicillium* série Gladioli, por produzir

esclerócios. *P. sclerotigenum* é geneticamente próximo ao *P. digitatum*. Ambos são patogênicos a plantas, apresentam conidióforo biverticilado e produzem metabólitos secundários (FRISVAD et al., 2004).

As doenças causadas por fungos podem afetar todas as partes da planta ao longo de vários estádios de desenvolvimento, tanto em pós-colheita como em pré-plantio. A podridão verde representa altas perdas durante o transporte e armazenamento de túberas comerciais e sementes. As perdas são permanentes e a doença ocorre sempre com altos índices de incidência e severidade, especialmente em épocas chuvosas, que promovem altos teores de umidade nos armazéns e confere condição ótima para o patógeno (MOURA, 2005).

4. Sintomas causados por *P. sclerotigenum* em inhame

O fungo *P. sclerotigenum* causa apodrecimentos de túberas de inhame comerciais e sementes durante o armazenamento, sendo responsável por estiolamentos das plântulas ou falhas no plantio. O primeiro sintoma visível da doença denominada podridão verde, causada pelo fungo é uma pequena mancha úmida; sempre associada a um ferimento na túbera, originando posteriormente, uma lesão profunda, de coloração marrom, sobre a qual observa-se uma camada de micélio, de cor verde acinzentado, formada por conidióforos e conídios do fungo, quando as condições climáticas são favoráveis, tais como: temperatura e umidade elevadas (MOURA, 2005).

Ao iniciar a saprogênese, *P. sclerotigenum* produz grande quantidade de esclerócios dentro dos tecidos colonizados, uma das principais características da espécie. A podridão progride rapidamente e, no máximo em 20 dias, toda a túbera fica comprometida. Ferimentos em túberas provocados, principalmente, no ato da colheita, limpeza, armazenamento e transporte são frequentes, o que favorece a penetração do fungo. A doença torna a túbera comercial imprópria para consumo. Além disso, a brotação das túberas sementes é comprometida, ocasionando falhas no plantio (MOURA, 2005).

O agente causal, *P. sclerotigenum*, penetra na túbera pelos ferimentos e, logo após a infecção, forma-se externamente uma pequena mancha úmida em torno da lesão. Removendo-se a epiderme no local da infecção, nota-se a lesão interna, de coloração marrom, geralmente com diâmetro dez vezes maior do que o visto no lado externo e, que se estende profundamente. A consistência é úmida e na maioria das vezes a túbera é

totalmente destruída. A mesma síndrome é observada em túberas sementes. *P. sclerotigenum* não ataca plantas vivas, sendo um problema de armazenamento levado para o campo através das túberas sementes contaminadas (MOURA, 2005).

Partes das sementes infectadas pelo fungo, quando plantadas, são destruídas rapidamente antes que a planta estabeleça o sistema radicular. Ocasionalmente os estiolamentos, que podem ser de pré ou pós-emergência, notados entre 45 a 60 dias após o plantio, necessitando-se a realização do replantio, que representa gastos adicionais aos custos de produção e, também, proporcionando túberas comerciais em diferentes estádios de maturação para a colheita, o que é ruim para comercialização (MOURA, 2005).

5. Controle da podridão verde do inhame

Para o controle da podridão verde é recomendado o tratamento químico, através da imersão das túberas comerciais e das sementes em solução fungicida à base de benomyl ou thiabendazole. No entanto, para atender muitos mercados internacionais os produtores não podem utilizar fungicidas sintéticos no controle de doenças como a podridão verde, pois os fungicidas deixam resíduos de alta classificação toxicológica no meio ambiente, contaminam agricultores e consumidores. Além disso, os resíduos dos fungicidas presentes nas túberas tratadas no armazenamento e transporte inviabilizam as exportações, gerando muitos prejuízos para os agricultores, principalmente, os que têm uma parcela significativa de rendimentos provenientes das exportações, em que o inhame consegue preços muito melhores do que os praticados no mercado interno (MESQUITA, 2002).

De modo geral, as podridões pós-colheita são de difícil controle e têm sido responsáveis por grande parte das perdas em produtos colhidos (ZAMBOLIM, 2002). As estratégias de controle de doenças pós-colheita em frutos compreendem: a) redução do inóculo pela eliminação de restos de cultura, manejo e tratamento fitossanitários adequados em pré-colheita, sanitização de caixas, equipamentos, água de lavagem de frutos e câmaras de armazenamento, seleção rigorosa dos frutos evitando danos mecânicos; b) supressão do desenvolvimento de podridões; c) inativação de infecção por ferimentos; d) prevenção e e) erradicação (ECKERT; OGAWA, 1985). Embora existam dados de pesquisas indicando produtos químicos para controle de alguns males

de *D. cayennensis*, obtidos para as condições do Nordeste, admite-se que, as medidas isoladas devem ser substituídas por um sistema integrado, envolvendo produção e uso de túberas sementes saudáveis, rotação de culturas com plantas antagônicas e não hospedeiras, e melhoria das condições de armazenamento das túberas comerciais e sementes (MOURA, 2005).

O tratamento com produtos químicos sintéticos constitui um método comprovadamente eficiente para o controle de fitopatógenos. No entanto, o uso incorreto das práticas de controle químico, pode advir como consequências, problemas ao meio ambiente e à saúde dos operadores. Assim, uma das formas de diminuir a intensiva aplicação de fungicidas é a utilização de outros métodos de controle fitossanitário, como o controle biológico (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Neste cenário o controle biológico torna-se uma alternativa promissora, pois não causa danos ao meio ambiente e aumenta a opção de medidas de controle das doenças de pós-colheita. O biocontrole utilizando como agentes de biocontrole; as bactérias, actinobactérias, fungos filamentosos e leveduras tem se mostrado também uma estratégia promissora na redução de contaminação por aflatoxina, tanto em pré como em pós-colheita; (BETTIOL; MORANDI, 2009).

6. Controle Biológico

O controle biológico, segundo Baker & Cook (1974), é a redução da quantidade de inóculo ou da atividade de produção da doença pelo patógeno realizado por um ou mais organismos. O biocontrole raramente elimina o patógeno do local, baseia-se na relação antagônica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação, tais como: competição por espaço e nutrientes, antibiose, parasitismo, produção de enzimas líticas e indução de resistência em plantas (MORAES et al., 1991).

No mecanismo de antibiose os microrganismos produzem metabólitos secundários tóxicos que inibem o desenvolvimento de outros microrganismos. A capacidade de competir pela ocupação de sítios de infecção do patógeno é uma característica necessária para um agente de biocontrole, pois espera-se que o antagonista cresça de maneira mais efetiva que o patógeno no local de infecção (BENDENDO; MASSOLA; AMORIM, 2011). O micoparasitismo é um mecanismo onde um fungo

micoparásita sobrevive à custa de outro, envolvendo uma sequência de alterações no metabolismo de ambos (OWLEY; WINDHAM, 2010). Esses antagonistas atuam diretamente nos fitopatógenos pela secreção de enzimas que degradam a parede celular, tais como: quitinases, β -1,3-glucanases, β -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 utilizados como agentes de biocontrole (SPADARO et al., 2008; JANISIEWICZ et al., 2010; JAMALIZADEH et al., 2011).

Dentre os microrganismos utilizados no controle biológico, as leveduras surgem como uma nova classe de agentes de biocontrole, que vem sendo bastante estudada e têm apresentado resultados de sucesso, no controle de vários fitopatógenos em pós-colheita (EL-TARABILY, 2004).

As leveduras são microrganismos unicelulares, pertencentes ao reino Fungi, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou fissão binária. Estão inseridas no sub-reino Dikarya, e filos Basidiomycota e Ascomycota (FEYDER et al., 2015).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na inibição dos fitopatógenos por leveduras, tais como: compostos antimicrobianos, indução de mecanismo de resistência em plantas, degradação de toxinas e enzimas e, competição por espaço (EL-MEHALAWY et al., 2004). A habilidade de competir por espaço torna as leveduras excelentes colonizadores de tecidos feridos, pois consomem os nutrientes mais rapidamente do que os fitopatógenos, prevenindo o estabelecimento destes e consequentemente da doença (DROBY et al., 2009).

Vários gêneros de leveduras têm sido utilizados em estudos de controle biológico de doenças de pós-colheita e vegetais (EL-GHAOUTH, 2003). Entre os gêneros mais citados no biocontrole encontram-se *Candida* (Cif e Redaelli), *Saccharomyces* (Meyen) e *Rhodotorula* (F. C. Harrison).

O controle biológico utilizando microrganismos antagonistas tem sido uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos, com considerável sucesso no controle de doenças de pré e pós-colheita (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002).

As leveduras segundo Sanhueza (2000) fazem parte do ambiente de maneira geral, podendo ser encontradas em diversos locais como, grãos, folhas, frutos e suas sementes, exultados de árvores, insetos, e solos. Estão presentes no filoplano

colonizando as folhas e são responsáveis pelo controle biológico natural de várias doenças foliares. A superfície de flores e frutos é conhecida como substrato apropriado para as leveduras e a sua disseminação na parte aérea das plantas ocorre por meio de insetos.

A comunidade microbiana da filosfera consiste, basicamente de bactérias e leveduras. A sucessão ecológica na filosfera inicia com as bactérias, posteriormente com as leveduras e, finalmente, com os fungos. As leveduras biocontroladoras que geralmente são encontradas nas folhas são membros das Cryptococcaceae (*Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp. e *Torulopsis* spp.), Sporobolomycetaceae (*Sporobolomyces* spp. e *Tilletiopsis* spp.) *Saccharomyces* spp. e *Aureobasidium* spp. (VALDEBENITO-SAMHUEZA, 2000). Atualmente, o conhecimento indica que as leveduras controlam os patógenos da parte aérea, principalmente, por competição de nutrientes e, por indução de resistência (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Produtos comerciais à base de *C. oleophila*, *A. pullulans* (de Bary & Lowenthal) G. Arnaud, *M. fructicola*, são comercializados em muitos países no controle de fitopatógenos. Nos EUA e em Israel, produtos a base de *C. oleophila* são recomendados para o controle de *P. digitatum* e *Botrytis* em pós-colheita. Na Alemanha, produtos a 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).

6.1 Leveduras e a produção de enzimas no controle biológico

Castoria et al. (1997) e Sanhueza et al. (2000), verificaram que, além da capacidade de competição por nutrientes, as leveduras interagem diretamente com as hifas fúngicas e produzem enzimas líticas que causam a lise da parede celular. Esses microrganismos agem no controle das doenças de plantas como agentes protetores das infecções e não como curativos.

As leveduras são reconhecidas pela produção de enzimas como as pectinases, quitinases e glucanases e, por não produzirem metabólitos tóxicos, que teriam um efeito toxicológico negativo ao ambiente. A produção de diversas enzimas por organismos antagonistas é investigada por diversos autores como estando relacionada à eficiência exercida no controle de fitopatógenos (SARAVANAKUMAR, et al., 2009; BAUERMAISTER, et al., 2010). A aplicação de β -1,3-glucanases ou de microrganismos produtores dessas enzimas é importante para inibir ou retardar a deterioração de frutos em pós-colheita causada por fungos fitopatogênicos (BAUERMAISTER, et al., 2010). A eficiência das quitinases produzidas pelos agentes de biocontrole contra fungos e insetos foi relatada na pesquisa realizada por El-Katany et al. (2001). Nesse estudo verificou-se que as quitinases e glucanases são proteínas relacionadas com a patogênese (PRP's) que possuem capacidade de hidrolisar células fúngicas, agindo diretamente sobre o patógeno.

Segundo Bettiol 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 causada pelo patógeno. Chanchaichaovivat et al. (2008), relataram 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) relataram 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, β -1,3-glucanase, quitinase e fitoalexinas. Acredita-se que estas enzimas estão intimamente relacionadas com a inibição de *C. capsici* na cultura.

6.2 Leveduras e a produção de proteínas *killer* no controle biológico

Algumas leveduras inibem fitopatógenos por apresentarem a atividade “killer”, que consiste na produção de toxinas extracelulares de composição glicolípida ou

glicoprotéica com ação antifúngica ou fungistática sobre outras leveduras e/ou fungos filamentosos (GOLUBEV, 2006).

O fator *killer* de leveduras antagonistas pode ser expresso em muitos gêneros de leveduras tais como: *Saccharomyces* Meyen, *Candida* Cif. & Redaelli, *Cryptococcus* Kutz, *Debaryomyces* Klocker, *Hanseniaspora* Zikes, *Hansenula* 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 atividade “killer” está relacionada entre os principais mecanismos de competição e seletividade apresentados por leveduras dentro de habitats onde estes microrganismos atuam. Contudo, sabe-se que a capacidade de produção de toxinas “killer” em leveduras pode variar entre espécies e isolados (PHILLISKIRK, G.; YOUNG, 1975). As toxinas “killer” podem afetar diretamente a parede celular do microrganismo alvo, causando a morte do mesmo (GOLUBEV, 2006).

A produção de exotoxinas com atividade antimicrobiana pelas leveduras é mediado por receptores específicos da parede celular dos microrganismos sensíveis, é um fenômeno relativamente comum (EL-BANNA et al., 2011). As 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, fungos filamentosos e bactérias sensíveis a estas toxinas (MAGLIANI et al., 1997; COELHO et al., 2003). Os 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 *Torulaspora globosa* (Klocker) Van der Wath & 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.

6.3 Leveduras e a produção de biofilme no controle biológico

Muitos microrganismos em seus sítios naturais são encontrados no ecossistema, formando o que chamamos de biofilmes, aderidos às superfícies e não agindo como um organismo livre. Esses biofilmes são definidos como uma estrutura microbiana

comunitária que adere a superfícies e fica revestida em uma matriz de material exopolissacarídico (DURÁN et al., 2007).

Os biofilmes são complexos ecossistemas microbianos, formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou múltiplas espécies, sendo encontrados em uma variedade de superfícies bióticas ou abióticas (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). São caracterizados como uma comunidade microbiana sésil, constituída por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato, ou umas às outras por meio de uma interface, incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares e exibem diferentes fenótipos dependendo do ambiente, da taxa de crescimento e da transcrição de genes (DONLAN; COSTERTON, 2002).

As leveduras do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans* são potencialmente formadoras de biofilme (NIKAWA et al., 2003). Os biofilmes bacterianos e fúngicos compartilham muitas características, como a adesão inicial de microcolônias, que são responsáveis pela síntese de exopolímeros, formando uma matriz dinâmica de crescimento constante e lento (LAFLEUR, 2008).

Os biofilmes formados pela levedura *C. albicans* são constituídos por uma matriz extracelular (ECM) composta de proteínas, polissacarídeos, células do hospedeiro e células da levedura de morfologia variada, tais como leveduriformes, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. O mecanismo de aderência e formação de biofilme por *C. albicans* envolve, entre outros, a participação de adesinas e a secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases, proteases e hemolisinas (MUKHERJEE et al., 2005).

Durante a maturação dos biofilmes, em determinados momentos, microorganismos são liberados para que possam vir a colonizar novos ambientes. À medida que o processo se desenvolve, a complexidade e a diversidade da comunidade aumentam. A sucessão encerra quando não há nichos disponíveis para novas populações, este estágio recebe o nome de comunidade clímax e embora seja uma etapa relativamente estável, não é um processo estático e sim dinâmico, com interações constantes com o hospedeiro e entre os microrganismos na competição pela sobrevivência (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

As células produzem e liberam sinais químicos moleculares que desencadeiam alterações na expressão de proteínas que coordenam diferentes arranjos fisiológicos e estruturais no biofilme. Essa sinalização permite a comunicação intercelular na comunidade do biofilme como um todo. Esses processos incluem simbiose, virulência,

competência, conjugação, produção de antibióticos, motilidade, esporulação e a própria formação de biofilmes (MILLER; BASSLER, 2001).

No biofilme os microrganismos podem tolerar altas concentrações de agentes antimicrobianos e uma variedade de condições adversas, quando comparados com sua forma planctônica (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Além dos exopolissacarídeos (EPS), outros compostos são comumente encontrados na matriz como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e ácidos lipoteicóicos (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

6.4 Antibiose como mecanismo de Biocontrole de leveduras

Dos principais mecanismos de antagonismo de leveduras, a competição por nutrientes tem um importante destaque. O exemplo de algumas leveduras tem elucidado a capacidade de competição destas por ferro, interferindo desta forma, sobre outras comunidades da microbiota do solo, através da produção de sideróforos (BOTHÁ, 2011). Os sideróforos atuam como quelantes de baixo peso molecular e são produzidos por diferentes microrganismos na aquisição do ferro. São bem conhecidos em *Rhodotorula glutinis* (Fresen) Harrison, sendo esta espécie de levedura capaz de produzir o ácido rodotorulico, importante componente de siderofóros que sequestra o ferro do ambiente, o indisponibilizando desta forma para outros microrganismos e, conseqüentemente, suprimindo o desenvolvimento destes onde atuam (SANSONE et al., 2005).

Na competição por espaço e nutrientes, observações microscópicas demonstram que muitas leveduras podem se multiplicar em abundância, próximo a hifas de fungos fitopatogênicos, crescendo sobre exsudatos secretados por folhas e frutos de hospedeiros, sugerindo que a concorrência por espaço e nutrientes possa também ocorrer em outras regiões, tal como na rizosfera, inibindo desta forma, a colonização de diversificados fitopatógenos radiculares (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

6.5 Indução de resistência

Além do controle biológico, a indução de resistência do hospedeiro a um fitopatógeno é uma ferramenta muito estudada no controle de doenças de plantas, podendo ser definida como sendo a capacidade da planta atrasar ou evitar a entrada e atividade do agente patogênico nos seus tecidos sob o ponto de vista fisiológico (GOODMAN et al., 1986). O entendimento desse processo de resistência é complexo e ocorre por meio de mudanças bioquímicas significativas em resposta a estímulos causados por agentes bióticos como os fitopatógenos (HILDEBRAND et al., 1986). A indução ocorre na ordem funcional, espacial e temporal, iniciando com o reconhecimento pela planta de sinais exógenos do fitopatógeno, seguindo com os mecanismos de transdução desses sinais, resultando na reprogramação do metabolismo vegetal, envolvendo 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 nas plantas são chamados de elicitores (SMITH, 1996).

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser ativos por elicitores químicos, físicos ou biológicos. Os elicitores de origem biótica (exógeno) (PASCHOLATI, 2011), como as Rizobactérias promotoras de crescimento (SILVIA, 2002) e leveduras (STANGARLIN et al., 2010).

Quando um fitopatógeno acomete 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 consiste na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila OH (GARCION et al., 2007). 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. Esta é muito verificada em reações de hipersensibilidade em resposta a infecção fúngica ou bacteriana (PASCHOLATI, 2011).

O acúmulo de EROs nas células vegetais e do patógeno pode ser tóxico, 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 H₂O₂ no local da infecção deve ser alta o bastante para servir como agente microbicida (MEDHY et al., 1996).

Para se proteger, a planta ativa diversas enzimas antioxidativas, que irão decompor as EROs. Dentre elas, podemos citar a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), entre outras. 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

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 amônioliase (PAL), APX e β -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), afirmaram que a capacidade para tolerar níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas em tecidos de frutos, em resposta a fermento, é uma das características essenciais das leveduras antagônicas.

No contexto da resistência das plantas e 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 envolvida na expressão de genes requeridos na resistência ou na formação de mensageiro secundário como o ácido jasmônico (PASCHOLATI, 2011).

Em virtude da importância da cultura do inhame no Nordeste brasileiro e particularmente em Pernambuco, bem como os danos causados decorrentes da podridão verde causada por *P. sclerotigenum*, o presente trabalho teve como objetivos: isolar, selecionar e avaliar o potencial de leveduras no biocontrole da podridão verde em inhame; 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 túberas de inhame, através da análise enzimática da catalase e ascorbato peroxidase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. Biological control of plant pathogens. San Francisco: W.H. Freeman, 1974. 433p.

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.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 2009. 334p.

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

BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. The physiology basis of the killer character in yeast. **Proceedings of the 11 th International Conference de Genetics**, v. 1, p. 202-2013, 1963.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**. Oxford, v. 43, p.1-8, 2011.

CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; DE CURTIS, F.; DE CICCIO, V. Resistance of postharvest biocontrole 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. β -1,3- glucanase activity of two saprophytic yeas and possible mode of actions as biocontrole agentes against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.12,p. 293-300, 1997.

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

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, Cidade, v. 24, n.?, p. 337-358, 2003.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

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, 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.

DURÁN, E.L.; MUJICA, M.T.; JEWUCHOWICZ, V.M.; FINQUELIEVICH, J.L.; PINONI, M.V.; IOVANNITTI, C.A.: Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *Candida albicans* formadores de biopelículas. **Rev Iberoam Micol** 2007; v. 24, p. 268-271.

ECKERT, J. W.; OGAWA, J. M. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical and tropical fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, n.?, p. 421-454, 1985.

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

EL-KATANY, M. H. et al.Characterization of quitine and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 invlved in controlo f the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiological Biotecnology**, Cidade,v. 56, n.?, p. 137-143, 2001.

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.

EL-MEHALAWY, K. A.; SILVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 69-74, 2004.

EL TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. **Potencial de yeasts as biocontrol agentes of soil-borne fungal plant pathogens and plant growth promoters**. Mycoscience, Tokyo, v. 47, n.1, p. 25-35, 2006.

EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* disease of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n.1, p. 69-75, 2004.

FAO. FAOSTAT. Disponível em:<<http://www.fao.org>>. Acesso em 20 fev. 2016.

FILGUEIRA, F. A. R. Controle Fitossanitário, Não “Guerra Química”. In: FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 3ª ed., cap.7, p. 94-110.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: Samson, R.A. & Frisvad, J.C.; (eds.) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. **Studies in Mycology**, n 49, p. 201-242, 2004.

FOKKEMA, N. J.; DEN HOUTER, J. G.; KOSTERMAN, Y. J. C.; NELIS, A. L. Manipulation of yeast 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.

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.

GARRIDO, M. da. S.; MENDES, L. do. N. **Dicas sobre a cultura do inhame: uma linguagem simples para o pequeno e médio produtor rural**. Cruz das Almas, 1999. 13p. (Boletim informativo: Série Agricultor).

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.

GOLUBEV, W. I. Antagonistic interactions among yeasts. In: ROSA, C.A.; PÉTER, G. The yeastes handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: **Spring-Verlag**, p.198-219, 2006.

GOODMAN, R.N.; KIRALY, 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**. 1edª. Boca Taton: CRC-Lewis Publishers, 1997, p. 1771-199.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiple forms of catalase in tabaco leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 84, p. 450-455, 1987.

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**, Lanhan, v. 79, n. 6, p. 1459-465, 1986.

JANISIEWICZ, W. J., KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review Phytopathology**. Cidade, v. 40, p. 411-441, 2002.

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.

OLIVEIRA, I. S. et al. Distribuição Geográfica e Diversidade Morfológica de Culturas de *Penicillium sclerotigenum* em Inhames no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p.131-136, 2007.

OLIVEIRA, I. S. *Penicillium sclerotigenum*, **Agente etiológico da podridão-verde do inhame: Patogenia, distribuição geográfica, caracterização morfofisiológica e enzimática**. 2005, 109f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, n.?, p. 713-721, 1993.

LAFLEUR, M. D. **Characterization and eradication of persisters in *Candida albicans* biofilms**. 90f. Dissertation of Doctor of Philosophy. Northeastern University. Department of Biology. 2008.

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

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

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

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.

MENDES, L. do N. et al. Caracterização dos produtores de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) do município de Maragojipe – Bahia. In: Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, 41., 2003, Juiz de Fora, **Texto...** Juiz de Fora: SOBER, 2003. CD-ROM.

MENDES, L.N.; SILVA, J.A.; FAVERO, L. A. **Panorama da produção e comercialização do inhame no mundo e no Brasil e sua importância para o mercado pernambucano: uma análise das cinco forças competitivas.** Disponível em:<http://www.convibra.org/upload/paper/2013/30/2013_30_8413.pdf>. Acesso em: 20 de dez. 2016.

MENDES, L. N. **A cadeia produtiva de inhame em Pernambuco: Caracterização e estrutura de governança.** 2010, 134f. Dissertação (Mestrado em Administração Rural)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Imprensa Universitária, UFRPE, Recife, 2ª ed. 2004. 183p.

MESQUITA, A. S. Inhame-*Dioscorea cayennensis* Lam. e taro *Colocassia esculenta* (L) Schott - Cenários dos mercados brasileiros e internacional. In: Anais. II Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e taro. II SINCIT, João Pessoa, Paraíba, v. 1, p. 215-238, 2002.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia: a produção no caminho da competitividade. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.4, n.2, p.39-48, 2001.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165-199, 2001.

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

MOREIRA, L. M. et al. POSSAMAI, J.C. Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 27, n.?, p.395-398, 2002.

MOURA, R. M. Doenças do Inhame. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia.** Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 416-417.

MOURA, R. M. et al. *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto, principal fungo causador de podridão em túberas de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.), no Estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Cidade, v. 1, n.?, p.67-78, 1976.

MUKHERJEE, P. K.; ZHOU, G.; MUNYON, R.; GHANNOUM, M. A. Candida biofilm: a well-designed protected environment. **Medical mycology**, v.43, n. 3, p. 191-208, 2005.

- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**. Oxford, v. 22, n.?, p. 867-880, 1981.
- 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.
- NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S.; NISHIMURA, M.; EGUSA, H.; FURUKAWA, M.; SETIJANTO, D. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 46, p. 471-478, 2003.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.
- 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. 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.
- PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeast of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, v.41, p. 147-151, 1975.
- ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorgum. **Whorld Journal Microbiol Biotechnol**, Berlin, v. 26, n.8, p.1491-1502, 2010.
- ROSA-MAGRI, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 54, n.1, p.1-5, 2011.
- SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, 2000. p. 41-55.
- SANSONE, G. et al. Control of Botrytis cinerea strains resistente to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Phostharvest Biology and Technology**, Amsterdã, v. 35, p. 245-251, 2005.
- 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.

SANTOS, E. S. dos. et al. Inhame (*Dioscorea* sp.) Tecnologias de Produção e preservação ambiental. Tecnol. & Ciên. Agropec., NOME EXTENSO João Pessoa, v.1, n.1, p.31-36, 2007.

SANTOS, E. S. Cultura do inhame (*Dioscorea* sp.). João Pessoa PB. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba. 2002. p.?

SANTOS, E. S. Inhame (*Dioscorea* spp.). Aspectos Básicos da Cultura. João Pessoa PB. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, 1996. p.?

SARAVANAKUMAR, D. et al. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. **European Journal Plant Pathology** v.123, n.4, p.183-193, 2009.

SILVA, A. C. F. **Cultivo orgânico de hortaliça rizoma: Inhame** Disponível em: <http://cultivehortaorganica.blogspot.com.br/2013/02/cultivo-organico-de-hortalicas.html> Acesso em: 13 de jan de 2016.

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. *Microbiologia Research*. Jena, v. 163, n.5, p.523-530, 2008.

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

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

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

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

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

YAMAMOTO, W., YOSHITANI, K. & MAEDA, M. Studies on *Penicillium* and *Fusarium* rot of chinese yam and their control. *The Science Reports of the Hyogo University of Agriculture*, v.2, p.69-79, 1955.

Capítulo II

Mecanismos de biocontrole de leveduras à *Penicillium sclerotigenum* agente etiológico da podridão verde do inhame

**Artigo submetido à revista Pesquisa Agropecuária
Brasileira (PAB)**

**Mecanismos de biocontrole de leveduras à *Penicillium sclerotigenum* agente
etiológico da podridão verde do inhame**

Gisely Santana de França ⁽¹⁾, Viviane Maria da Silva ⁽¹⁾, Lilia Gomes Willadino ⁽¹⁾,
Iwanne Lima Coelho ⁽¹⁾, Rejane Pereira Neves ⁽²⁾ e Delson Laranjeira ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área Fitossanidade, Laboratório de Fungos de Solos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, CEP-52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: giselysf@hotmail.com, vmsilva.fito@gmail.com, willadino.lilia@gmail.com, iwannecoelho@gmail.com e delson.laranjeira@ufrpe.br

⁽²⁾ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Professor Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, CEP-50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: rejadel@yahoo.com.br

Autor para correspondência <delson.laranjeira@ufrpe.br>

Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB): Área de Fitopatologia

Autor para correspondência: Delson Laranjeira. Departamento de agronomia, Área de Fitossanidade, Laboratório de Fungos de Solos, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, CEP-52171-900, Recife, PE, Brasil. (081) 3320-6210

Resumo- A podridão verde do inhame, causada por *Penicillium sclerotigenum* é uma doença que incide com alta severidade sobre túberas. O controle é realizado com fungicidas a base de thiabendazole e práticas para diminuir o inóculo do fungo durante o armazenamento. No entanto é uma doença de difícil controle, havendo a necessidade de um controle integrado. O estudo objetivou: obter, selecionar leveduras antagonistas ao patógeno e estudar os possíveis mecanismos do biocontrole. Dez isolados do patógeno foram avaliados quanto à agressividade, sendo selecionado o mais agressivo. Foram obtidas quarenta leveduras e estas foram testadas quanto à eficiência no biocontrole da podridão verde. O potencial de biocontrole foi verificado através de um segundo teste, utilizando 1×10^6 cél/mL de suspensão das leveduras aplicada, de imediato e cinco dias após a primeira atomização dos fungos, onde se verificou a redução do diâmetro médio de lesão da doença. A estabilidade do biocontrole foi confirmada para LEV-02 e LEV-09, que apresentaram efeito inibitório na esporulação e crescimento micelial reduzido do isolado PES-02, positivas para produção de toxina *killer* e biofilme e não afetarem nos níveis das enzimas catalase e peroxidase nas túberas. A utilização das leveduras demonstra ser promissora no biocontrole da podridão verde do inhame.

Termo para indexação: túberas, antagonismo, controle integrado, fitopatógeno.

Biocontrol mechanisms of yeast to *P. Sclerotigenum* etiological agent of yam green rot

Abstract - Green yams rot caused by *Penicillium sclerotigenum* is a disease that affects high severity on tubers. The control is performed with the base fungicide thiabendazole and practices to reduce the fungus inoculum during storage. However it is a disease difficult to control, there is the need for an integrated control. The study aimed to: obtain, select yeast antagonists to the pathogen and study the possible biocontrol mechanisms. Ten isolates of the pathogen were evaluated for aggressiveness, being selected the most aggressive. Forty yeasts were obtained and these were tested for effectiveness in the biocontrol of green rot. The biocontrol potential was recorded by a second test utilizing 1×10^6 cells / ml suspension of yeast applied immediately to five days after the first spray of the fungi where there was a reduction in the average diameter of the disease lesion. The stability of biocontrol was confirmed to LEV-02 and LEV- 09, showed inhibitory effect on sporulation and reduced mycelial growth isolated PES-02, positive for killer toxin production and biofilm and not affect the levels of catalase and peroxidase in truffles. The use of yeast biocontrol shown to be promising in the green yam rot.

Index terms: tubers, antagonism, integrated control, pathogen.

Introdução

A cultura do inhame no Nordeste brasileiro é bastante representativa, gerando renda para os agricultores da agricultura familiar em sua maioria e promovendo o desenvolvimento da economia nas regiões da zona da mata e agreste do estado. No entanto, a produção e comercialização das túberas são afetadas significativamente devido à ocorrência da podridão verde (OLIVEIRA, 2005).

Esta é uma doença de grande importância para a cultura, pois inviabiliza as túberas sementes e comerciais e o seu controle é baseado no tratamento das túberas com fungicidas, o que contamina o meio ambiente e as pessoas; sendo necessária a adoção de um controle alternativo (MOURA, 2005).

Dentre os microorganismos utilizados no controle biológico, as leveduras surgem como uma nova classe de agentes de biocontrole, que vem sendo bastante estudadas e têm apresentado resultados de sucesso, no controle de vários fitopatógenos em pós-colheita (EL-TARABILY, 2004).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: isolar, selecionar e avaliar o potencial de leveduras no biocontrole da podridão verde em inhame; 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 túberas de inhame, através da análise enzimática da catalase e ascorbato peroxidase.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fungos do Solo e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, no período de fevereiro de 2015 a dezembro de 2016.

Isolamento e Identificação de *P. sclerotigenum*

Para o isolamento do fitopatógeno, foram utilizadas túberas de inhame com sintomas de podridão verde coletadas em produtor da região de Condado-PE e na Central de Abastecimento de Pernambuco (CEASA). O isolamento do patógeno, foi realizado a partir de fragmentos da região de transição do tecido sadio/doente. Posteriormente foram desinfestados, foram depositados em placa de Petri contendo álcool etílico 50% e posteriormente em placa de Petri contendo hipoclorito de sódio 2% diluído 1:3 para desinfestação e obtenção de culturas puras. Em seguida, os fragmentos foram lavados em água destilada estéril e plaqueados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

Isolamento e Identificação das leveduras

Para isolamento das leveduras, foram coletadas folhas e túberas de inhame de culturas das regiões de Condado, Recife, Bonito, Igarassu e Camaragibe-PE, através de produtores e compra de túberas na CEASA. Os isolamentos foram realizados a partir de fragmentos de tecidos de folhas e túberas de inhame aparentemente assintomáticas. Esses fragmentos foram imersos separadamente em tubos de ensaio (cinco fragmentos por tubo) contendo 10 mL de água de torneira esterilizada (AE) adicionada de cloranfenicol (50 mg L^{-1}). Em seguida, os tubos foram submetidos à agitação em “vórtex”, em seguida foi efetuada uma diluição (10^{-1}). Desta diluição, alíquotas de 0,1

mL foram distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) suplementado com extrato de levedura ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) e adicionado de cloranfenicol (50 mg L^{-1}), e uniformemente espalhadas na superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski.

Teste de patogenicidade de *P. sclerotigenum*

Para o teste de patogenicidade foram utilizadas suspensões preparadas pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada (ADE) ao meio de cultura contendo colônias do patógeno com 10 dias de crescimento, seguido de raspagem com alça de Drigalski e filtragem em camada dupla de gaze esterilizada. O inóculo foi ajustado à concentração de 1×10^6 esporos/mL. Foram utilizadas túberas de inhame comerciais assintomáticas, estas foram lavadas e desinfestadas pela imersão em NaClO 0,005% por cinco minutos. As túberas foram colocadas em bandejas e marcadas na superfície em dois pontos equidistantes. Em seguida procedeu-se a inoculação de 50 μl da suspensão do fitopatógeno na concentração de 1×10^6 esporos/mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, cada uma representada por uma túbera.

Seleção de isolados de leveduras

Túberas assintomáticas foram lavadas e desinfestadas pela imersão em NaClO 0,005% por cinco minutos e colocadas em bandejas. As suspensões das quarenta leveduras foram obtidas a partir da adição de 20 mL de ADE e raspagem da colônia com 72 horas de crescimento em placas de Petri contendo meio SDA. A concentração de cada suspensão foi ajustada para 1×10^7 células mL^{-1} com o auxílio da câmara de Neubauer. As túberas foram tratadas através da atomização com 25 mL da suspensão de leveduras e uma hora após atomização, o isolado PES-02 de *P. sclerotigenum* na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} foi inoculado. A testemunha padrão foi inoculada

apenas com o patógeno. Aplicou-se câmara úmida por 48 horas, e a doença foi avaliada 10 dias após a inoculação do patógeno e leveduras, medindo-se o diâmetro da lesão em dois sentidos opostos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, totalizando 41 tratamentos (40 isolados de leveduras e uma testemunha padrão), com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma túbera. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, os tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) utilizando o SISVAR.

Seleção de leveduras no biocontrole da podridão verde do inhame

Quinze isolados de leveduras selecionados em teste de biocontrole utilizando a metodologia descrita anteriormente foram avaliados em túberas atomizadas com 25 mL da suspensão de leveduras em dois períodos (uma hora antes da inoculação do patógeno) e (cinco dias após a inoculação do patógeno e leveduras). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto de 16 tratamentos (15 isolados de leveduras, um patógeno), quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma túbera. Os dados foram submetidos à análise de variância e, os tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico SISVAR.

Avaliação da atividade *killer* das leveduras

Na caracterização quanto à atividade *killer* dos isolados de leveduras com potencial no biocontrole de *P. esclerotigenum*, foram utilizados dois isolados de leveduras padrões de sensibilidade, sendo estes representados pelos isolados NCYC 1006 (*Saccharomyces cerevisiae*) e NCYC Y-55 (*Candida glabrata*).

Os isolados foram ativados a uma temperatura de 25 °C por 24 horas em placas de Petri contendo meio de cultura YEPD (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glucose, 20 g de ágar, 1000 mL de água destilada) suplementado com azul de

metileno (0,003%), utilizando tampão citrato-fosfato (100 mM) para ajuste do pH à 4,2. Após esta etapa, foi preparada suspensão (4×10^5 células/mL) da levedura sensível para o teste em solução salina (NaCl 0,85% m/v) e, posteriormente, espalhada com auxílio de um “swab” esterilizado sobre placas contendo meio YEPD adicionado de azul de metileno. Das leveduras testadas quanto ao antagonismo de *P. esclerotigenun*, cultivadas em meio SDA foram retiradas amostras, sendo estas plaqueadas em pontos identificados sobre a superfície de placas de Petri contendo meio YEPD adicionado de azul de metileno e foram incubadas a 25 °C por 72 horas.

Avaliação da indução de resistência em túberas de inhame

Para esta análise amostras das túberas experimentadas no teste de biocontrole foram coletadas. A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir et al. (1987). Em solução contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e 25 µL do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1,0 mM, a reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato protéico e, a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ por 60 segundos, através de alterações à 240 nm, sob temperatura de 25°C, em espectrofotômetro. A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano & Asada (1981). O meio de reação foi composto por 650 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100 µL de ascorbato 5,0 mM, 100 µL de EDTA 1,0 M, 100 µL de H₂O 1,0 mM e 50 µL do extrato protéico. A atividade foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato à 290 nm, temperatura de 30 °C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro. Todas as atividades enzimáticas foram medidas em mg/gMF (miligrama/grama de massa fresca).

Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Os isolados de leveduras foram semeados em placas de Petri contendo meio SDA por 24 horas e mantido a +/- 27 °C. Posteriormente, foi preparada uma suspensão em solução salina dos isolados de leveduras com concentração final de 10⁶ UFC/mL. 20 µL da suspensão e 180 µL de Sabouraud (SD) líquido foram postos em poços de microplacas de ELISA e mantidas a 37°C por 24 horas sem agitação. Em seguida, o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada, sendo adicionado posteriormente sobre estes, 200 µL do corante safranina por 5 minutos. A avaliação foi feita de acordo com a intensidade da coloração dos poços. Para interpretação os de fraca coloração foram lidos como (1+); os de coloração mediana (2+ a 3+) e fortemente corados (4+).

Produção de metabólitos voláteis pelas leveduras

Foi avaliado o efeito de metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras sobre a inibição do crescimento micelial e esporulação de *P. sclerotigenum in vitro*. Para a realização do ensaio, placas de Petri contendo meio de cultura BDA foram inoculadas, no centro, com um disco de 5 mm de diâmetro, contendo as estruturas do patógeno. Com o auxílio de uma alça de Drigalsk, 20 µL da suspensão de leveduras na concentração final de 1,0x10⁶ UFC/mL foram inoculadas em placas contendo meio SDA. As placas contendo o patógeno e as leveduras foram justapostas uma sobre a outra e vedadas com parafilme. O tratamento testemunha consistiu de placas contendo um disco do patógeno cultivado em meio BDA justapostas com placa contendo meio SDA. O diâmetro médio da colônia do patógeno foi avaliado medindo-se em dois diâmetros diametralmente opostos. O delineamento experimental utilizado foi o DIC,

com dezesseis tratamentos e quatro repetições. Quanto à esporulação de *P. sclerotigenum*, foram preparadas suspensões das colônias do patógeno, com adição de 20 mL de ADE em cada placa, seguida da raspagem das colônias com alça de Drigalski. Para cada suspensão de esporos, uma alíquota de 100 µL foi retirada e transferida para uma câmara de Neubauer, onde procedeu-se a contagem de esporos. Os dados foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados pelo teste de Scott knott ($P < 0,05$) utilizando o programa SISVAR.

Resultados e Discussão

Teste de patogenicidade de *P. esclerotigenum*

Dentre os dez isolados do patógeno avaliados, observou-se que todos foram patogênicos ao inhame, no entanto o isolado PES 02 apresentou maior diâmetro médio de lesão (Tabela 1), sendo selecionado para o ensaio de controle biológico.

Seleção de isolados de leveduras

No experimento de seleção de leveduras foram testados 40 isolados, dois quais 15 apresentaram redução do diâmetro médio da lesão da podridão verde. O fato das leveduras terem reduzido o diâmetro médio da lesão pode ser relacionado aos mecanismos de antagonismos destes fungos, como a competição por espaço e nutrientes. De acordo com Droby et al. (2009), a habilidade de competir por espaço e a capacidade de colonizar rapidamente ferimentos, promove as leveduras o consumo de nutrientes mais rapidamente que os fungos fitopatogênicos, promovendo uma vantagem competitiva e menor chance de estabelecimento da doença.

Ensaio de biocontrole da podridão verde do inhame

No ensaio de biocontrole as leveduras LEV 2, LEV 9 foram as mais eficientes, reduzindo o diâmetro médio da lesão (Tabela 2). Com relação à profundidade da lesão foi verificado que não houve diferença significativa entre os tratamentos não sendo evidenciado os dados neste estudo. Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por França et al. (2015), no patossistema *Colletotrichum* sp. e pimentão (*Capsicum annum* L.), onde se observou a controle da doença em frutos tratados com as leveduras *Candida kefir*, *Rhodotorula minuta*, *R. glutinis* e *R. aurantiaca*. De acordo com Zhang et al. (2009); Li et al. (2011) *R. glutinis* é eficaz no controle de doenças em pós- colheita.

Segundo Assunção et al. (2015) a atomização da suspensão de leveduras em folhas de couve-manteiga (*Brassica oleracea*) tratadas com *Alternaria brassicicola*, e promoveu a redução do índice de severidade da mancha-de-alternaria. Chachaichaovivat et al (2008), obtiveram resultados semelhantes na avaliação de *Pichia guilliermondii* no controle da antracnose em pimenta contra *Colletotrichum capsici* e os períodos de aplicação variação.

Avaliação da indução de resistência em túberas de inhame

No presente ensaio as leveduras foram avaliadas na indução de resistência em túberas de inhame, através da produção da enzima catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), não influenciando na produção enzimática, como evidenciado na (Tabela 3) não sendo a indução de resistência o fator responsável pelo biocontrole das leveduras avaliadas a *P. sclerotigenum*, diferentemente os resultados de outros autores como Reilly et al. (2004) em que muitas plantas se utilizam do mecanismo de morte

celular para impedir que o patógeno se estabeleça em seus tecidos. E os resultados obtidos por Zhao et al. (2008), com frutos de tomateiro inoculados com *R. nigricans* e tratados com *P. guilliermondii* estirpe CNM 21801, no qual houve a expressão de mudanças bioquímicas através do aumento da atividade da CAT. E Cai et al. (2015), trabalhando com frutos de morango (*Fragaria ananassa* Duch) em pré-colheita tratados com *H. uvarum* obteve indução de resistência nos frutos, a qual associou com a aumento nos níveis enzimático da CAT e APX. Resultado semelhante observaram Xu et al. (2013) em frutos de pêsego (*Prunus pérsica*) tratados com *P. caribica*, no qual verificou-se elevados níveis de CAT, quando comparado os tratamentos com a testemunha inoculada com *R. stolonifer*.

Avaliação da atividade *killer* das leveduras

As leveduras testadas foram consideradas positivas para a produção da toxina *killer* (Tabela 4). O resultado é evidenciado pela morte das células da levedura sensível à toxina, seguida da formação de um halo de inibição ao redor do ponto de inoculação das leveduras. Os resultados do presente estudo corroboram com os obtidos por Coelho et al. (2011) que verificaram os possíveis mecanismos de ação das leveduras *Sporobolomyces roseus* Kluyver & Niel, *P. membranifaciens* Hasen e *P. anomala*, e observaram que as cepas estudadas apresentaram fator *killer* positivo e, que o efeito antagônico destas leveduras sobre *P. expansum* foi causado pela competição por nutrientes e antibiose. Estas leveduras são aptas a destruir células e atuarem como agentes de biocontrole controlando organismos da mesma espécie ou espécies distintas (SATO et al., 1993).

Estudando o patossistema *C. gloeosporioides* em mamão, Lima et al. (2013), demonstraram que as leveduras *W. anomalus* (estirpe 422) e *M. guilliermondii* positivas

para a proteína *killer* isoladas de frutos de mamão e inoculadas em frutos de mamão com o patógeno foram capazes de reduzir os sintomas da doença.

Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Os isolados de leveduras testados produziram biofilme em diferentes níveis (Tabela 4). Este resultado pode estar relacionado às características de biocontrole da levedura. No entanto, nem sempre o biofilme pode estar presente, como mecanismo de biocontrole de uma doença. Leveduras que não formam biofilme podem atuar como agentes de biocontrole através de outros mecanismos de ação. Como observado por Parafati, et al. (2015) ao analisarem os possíveis mecanismos de ação das leveduras *Metschnikowia pulcherrima* Pitt & Mill, *W. anomalus*, *Aureobasidium pullulans* Arnaud estirpe P11 e *Saccharomyces cerevisiae* Gasperini no controle de *B. cinerea* em frutos de videira (*Vitis vinífera* L.), verificaram que apesar de *A. pullulans* estirpe P11 não ter produzido biofilme nos ensaios *in vitro*, a levedura mostrou-se eficiente, colonizando ferimentos nos experimentos *in vivo* e atuando como antagonista.

Segundo Droby et al. (2009), pouco se conhece sobre o papel do biofilme na atividade de biocontrole e como os estímulos ambientais regulam as transformações morfológicas em agentes de biocontrole, contribuindo para a seleção de antagonistas mais promissores. De acordo com Weber et al. (2008), isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, podem produzir uma quantidade significativa de biofilme quando em presença de glicose.

Produção de metabólitos voláteis pelas leveduras

As leveduras testadas quanto à produção de metabólitos voláteis promoveram reduções do crescimento micelial e inibiram totalmente a esporulação *in vitro* de *P.*

sclerotigenum (Tabela 4). A redução do crescimento *in vitro* e a inibição da esporulação de *P. sclerotigenum* pode ter ocorrido devido à produção de metabólitos voláteis tóxicos ao patógeno. Este resultado corrobora com os de Saravanakumar et al. (2009), nos quais observaram que o crescimento micelial de *B. cinerea* foi inibido e a germinação de conídios reduzida quando do pareamento de placa de Petri contendo a levedura *M. pulcherrima* estirpe MACH 1 e placa de Petri contendo o fungo.

Segundo Silva et al. (2015) *R. glutinis*, *C. laurentii* e *K. microstict* inibiu significativamente o crescimento micelial de *D. bryoniae* pela produção de metabólitos voláteis e não voláteis, que foram capazes de causar danos morfológicos as hifas e alterar a sua viabilidade *in vitro*.

Conclusões

1. As leveduras LEV-02 e LEV- 09 foram eficientes como agentes biocontroladores da podridão verde do inhame, causada por *P. sclerotigenum*.
2. As leveduras LEV-02 e LEV- 09 não induziram resistência em túberas de inhame a *P. sclerotigenum*.
3. As leveduras selecionadas no ensaio de biocontrole apresentaram potencial para produção de proteínas *killer*.
4. Os isolados de leveduras selecionados no ensaio de biocontrole apresentaram inibição da esporulação e redução do crescimento micelial de *P. sclerotigenum* através de metabólitos voláteis no meio de cultura.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e pela concessão da bolsa de pesquisa a Delson Laranjeira.

Referências

- ASSUNÇÃO, E.F. **Leveduras como agentes protetores e indutores de resistência no manejo da mancha-de-alternaria em couve-manteiga**. 2015, 64f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.
- 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**, v.100,p. 52-58, 2015.
- CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, Orlando, v. 42, n. 3, p. 326-335, 2008.
- COELHO, A.R.; NÓBREGA, G.M.A.; PAGNOCCA, F.C.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K.; HIROOKA, E.Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deteriorações por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p.1879-1892, 2011.
- 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.
- EL-TARABILY, K. A. Supression of *Rhizoctonia solani* disease of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n.1, p. 69-75, 2004.
- FRANÇA, G.S.; CARVALHO, R.R.C.; NEVES, R.P.; ARAUJO, E.R.; LARANJEIRA, D. Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. *Bioscience Journal*, v.31, p.451-459, 2015.
- 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.
- KUHN D.M.; CHANDRA J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect Immun**, 2002; v. 70, n. 2, p. 878-888.
- LI, R., ZHANG, H., LIU, W., ZHENG, X. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 151–156, 2011.

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

MOURA, R. M. Doenças do Inhame. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 416-417.

NAKAKO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in apinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

OLIVEIRA, I. S. *Penicillium sclerotigenum*, **Agente etiológico da podridão-verde do inhame: Patogenia, distribuição geográfica, caracterização morfofisiológica e enzimática**. 2005, 109f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

OKIGBO, R.N. A review of biological control methods for post harvestyams (*Dioscorea* spp.) in storage in south eastern Nigeria. *Science Journal*. v.1, p. 1-9, 2004.

PARAFATI, L.; VITA ALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, v.47, p.85-92, 2015.

REILLY, R.T.; PESTKA, J. Mycotoxins: metabolism, mechanism and biochemical markers. In: DIAZ, D.E. (Ed). *The mycotoxin blue book*. Nottingham University Press, P.279-294, 2005.

SARAVANAKUMAR, D. et al. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. **European Journal Plant Pathology** v.123, n.4, p.183-193, 2009.

SATO, H. H.; PASTORE, G.M.; PARK, Y. K. **Revista de Microbiologia**, 1993, v. 24, p.71-72.

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. **Microbiologia Research**. Jena, v. 163, n.5, p.523-530, 2008.

SILVIA, C. L. **Alternativas no controle do cretamento gomoso em meloeiro**. 2015, 85f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

WEBER, K.; SOHR, R.; SCHULZ, B.; FLEISCHHACKER, M.; RUHNKE, M. Secretion of E, E-Farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrob Agents Ch* 2008, v. 52, n. 5, p.1859-1861.

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

ZHANG, H. Y.; MA, L.; Turner, M.; Xu, H.; Ying Dong a, Song Jiang a. Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. *Food Chemistry, Reading*, v. 117, n. 3, p. 621–626, 2009.

XU, B.; ZHANG, H.; CHEN, K.; XU, Q.; YAO, Y.; GAO, H. Biocontrol of postharvest *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. **Current Microbiology**, v.67, p.255-261, 2013.

Tabela 1. Agressividade de isolados de *Penicillium sclerotigenum*, a túberas de inhame.

Isolados de <i>Penicillium sclerotigenum</i>	Diâmetro da lesão*
PES 02	25,27 a
PES 06	24,47 ab
PES 09	23,57 abc
PES 07	22,88 abc
PES 05	22,22 abc
PES 01	21,99 abc
PES 08	20,53 bc
PES 04	20,13 c
PES 03	20,07 c
Testemunha absoluta	0,00 d
C.V%	9,98

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

Tabela 2. Efeito de leveduras na redução do diâmetro médio de lesões em túberas de inhame causadas por *Penicillium sclerotigenum*.

Tratamento	Diâmetro da lesão*
LEV 2 ¹	16,59 a
LEV 9	18,29 b
LEV 3	18,79 b
LEV 4	19,29 b
LEV 5	19,59 b
LEV 1	20,39 c
LEV 8	20,54 c
LEV 6	20,55 c
LEV 7	20,82 c
LEV 13	21,21 c
LEV 10	21,48 c
LEV 11	21,73 c
LEV 12	22,15 c
LEV 14	22,28 c
LEV 15	23,69 d
Testemunha	24,45 d
C.V%	5,76

¹ Isolados de Leveduras

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

Tabela 3. Efeito de leveduras na indução de resistência a *P. sclerotigenum* por meio das enzimas catalase e ascorbato peroxidase.

Tratamento	Catalase (mg/gMF) ¹	Ascorbato peroxidase (mg/gMF) ¹
LEV 2	0,910 a	16,57 a
LEV 9	0,920 a	16,62 a
Testemunha absoluta ²	0,899 a	16,53 a
Testemunha padrão ³	0,901 a	16,68 a
C.V%	31,40	42,34

¹ Quantidade de enzimas produzidas por amostra de túbera (mg/g de massa fresca);

² Testemunha absoluta= Túbera de inhame sadia inoculadas apenas com água destilada e esterilizada

³ Testemunha padrão= Túbera de inhame inoculada apenas com *P. sclerotigenum*

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

Tabela 4. Avaliação de leveduras na inibição do crescimento micelial e esporulação de *Penicillium sclerotigenum* por compostos voláteis em meio de cultura e produção de toxina *killer* e biofilme.

Metabolitos voláteis				
Tratamento ⁽³⁾	Crescimento micelial	Número de conídios/mL ⁻¹	Produção de toxina	Formação de biofilme
LEV 2	2,54	0	+ ⁽²⁾	(4+)*
LEV 9	2,54	0	+	(4+)
LEV 3	2,57	0	+	(4+)
LEV 4	2,62	0	+	(2+)**
LEV 5	2,62	0	+	(4+)
LEV 1	2,72	0	+	(3+)**
LEV 8	2,87	0	+	(4+)
LEV 6	2,87	0	+	(2+ a 3+)**
LEV 7	2,99	0	+	(2+)
LEV 13	3,40	0	+	(4+)
LEV 10	3,44	0	+	(3+)
LEV 11	3,96	0	+	(2+)
LEV 12	5,65	0	+	(4+)
LEV 14	6,01	0	+	(4+)
LEV 15	6,90	0	+	(2+ a 3+)
Testemunha	9,0	4,40X10 ⁶	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾
C.V%	8,51	48,27	8,51	48,27

* isolado fortemente corado em poço de placa ELISA;

** isolado de coloração moderada a mediana corado em poço de placa ELISA

¹ O tratamento testemunha não apresenta produção de toxina *killer* nem formação de biofilme

² Reação positiva para a produção de toxina *Killer*

³ Tratamento = Isolado de *P. sclerotigenum* em placa de Petri pareado com isolado de levedura semeado em placa de Petri.

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

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- As leveduras LEV 2 e LEV 9 apresentaram potencial de controle da podridão verde em inhame;
- As leveduras LEV 2 e LEV 9 não induziram resistência nas túberas de inhame.
- Os isolados de leveduras, além de reduzirem o crescimento micelial de *P. sclerotigenum*, foram eficientes na inibição *in vitro* de 100% dos conídios do patógeno.
- Todos os isolados de leveduras avaliados apresentaram o potencial de produção de toxina *killer*.
- O uso de leveduras como agentes de biocontrole em túberas de inhame demonstra uma ferramenta promissora no controle biológico de *P. sclerotigenum*.