
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁREAS AGRÍCOLAS COMO AGENTES
NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS**

MÁRCIA MARIA ROSA

Outubro - 2009

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁREAS AGRÍCOLAS COMO AGENTES
NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS**

MARCIA MARIA ROSA

Orientadora: Dr^a Sâmia Maria Tauk-Tornisielo (CEA – UNESP)

Co-orientadora: Dr^a Sandra Regina Ceccato-Antonini (CCA – UFSCar)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Outubro - 2009

DEDICO

Ao meu companheiro eterno
Meu esposo, amigo, confidente...

André

Sem você tudo isso não teria sentido!!!!!!

OFEREÇO

À minha família
Meu pai Mauro, minha mãe Maria Isabel,
Meus irmãos Mauro Jr., Milena e Murilo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me proporcionar uma vida maravilhosa e colocar nela vários anjos...

...minha orientadora Dr^a Sâmia Tauk-Tornisielo, sempre compreensiva, amiga e conselheira...

...minha co-orientadora, amiga e comadre Dr^a Sandra Ceccato-Antonini, sem a qual meus sonhos de se tornar uma cientista e professora não seriam possíveis...

...minha sempre professora, amiga e também comadre Dr^a Silvana Perissato-Meneghin, sempre cuidadosa e amável...

...meus colegas do LAMAM: Lúcia, Cristina, Babi, Afra, Simoni, Manu, Carolina, Wesley, Ana Paula, Vanda, Fabrícia, Fabiano, Diogo...que transformaram o trabalho diário em momentos agradáveis...

...aos meus colegas da pós-graduação em Microbiologia Aplicada: Alex, Eduardo, André, Adriana, Maria Lúcia, com os quais dividi sofrimentos, dúvidas e alegrias...

...meus amigos queridos: Silvia, Murilo, Otávio, Mirela, Jackson, Cátia, Luciano, Patrícia, Natália, Douglas, Carol...sem os quais os dias seriam sem sentido...minhas afilhadas Bia e Alice...

...minhas cunhadas queridas, Valquíria e Renata, sempre amigas...

...meus sogros Maria Ivone e Alcides sempre cuidadosos e carinhosos...

...todos que me ajudaram a realizar esse sonho...

...obrigado Meu Deus!!!!

”Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e
corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”

Augusto Cury

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Controle Biológico.....	3
2.2. Leveduras.....	5
2.3. Leveduras no controle biológico.....	6
2.3.1. Produção de enzimas hidrolíticas.....	7
2.3.2. Competição por espaço e nutrientes.....	9
2.3.3. Produção de toxina <i>killer</i>	10
2.3.4. Indução de resistência ao hospedeiro.....	11
2.3.5. Micoparasitismo.....	12
2.3.6. Produção de sideróforos e substâncias promotoras de crescimento vegetal.....	12
2.3.7. Produção de antibióticos.....	14
2.4. Antracnose em milho e sorgo (<i>Colletotrichum graminicola</i> e <i>Colletotrichum sublineolum</i>).....	14
2.5. Podridão abacaxi em cana-de-açúcar (<i>Thielaviopsis paradoxa</i>).....	16
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Isolamento de leveduras.....	20
4.2. Fungos fitopatogênicos.....	21
4.3. Avaliação das leveduras isoladas quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos.....	21
4.4. Identificação das leveduras.....	22
4.4.1. Extração de DNA.....	22
4.4.2. Amplificação da região ITS do rDNA	23
4.4.3. Sequenciamento da região ITS do rDNA.....	24
4.4.4. Análise de diversidade genética utilizando marcador molecular ISSR.....	25

4.5. Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> em meios de cultura sólidos.....	26
4.5.1. Avaliação de diferentes meios de cultura no antagonismo <i>in vitro</i>	26
4.5.2. Avaliação de diferentes valores de pH no antagonismo <i>in vitro</i>	27
4.5.3. Avaliação de diferentes temperaturas de incubação no antagonismo <i>in vitro</i>	27
4.6. Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> em meios de cultura líquidos.....	27
4.7. Avaliação dos mecanismos de ação das leveduras isoladas.....	28
4.7.1. Detecção de atividade <i>killer</i>	28
4.7.1.1. Avaliação do pH e temperatura na atividade <i>killer</i>	29
4.7.1.2. Extração do plasmídeo dsRNA.....	29
4.7.2. Produção de compostos antifúngicos voláteis.....	30
4.7.3. Produção de enzimas hidrolíticas	30
4.7.3.1. Preparado de parede celular (PPC).....	30
4.7.3.2. Determinação da atividade enzimática - β -1,3-glucanase.....	31
4.7.3.3. Determinação da atividade enzimática – quitinase.....	31
4.7.4. Produção de sideróforos.....	32
4.7.5. Competição por nutrientes.....	32
4.7.6. Observação microscópica da hifa dos fungos fitopatogênicos da zona de antagonismo.....	33
4.7.7. Avaliação do crescimento micelial do fungo retirado da zona de antagonismo.....	33
4.8. Caracterização dos isolados de leveduras como promotores de crescimento vegetal.....	34
4.8.1. Produção de ácido indol-acético (AIA).....	34
4.8.2. Solubilização de fosfatos insolúveis.....	34
4.8.3. Solubilização de rochas potássicas.....	35
4.9. Experimentos <i>in vivo</i>	35
4.9.1. Avaliação do controle biológico de <i>Colletotrichum graminicola</i> em sorgo pela levedura <i>T. globosa</i> (1S112).....	35
4.9.2. Avaliação do controle do desenvolvimento de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> em toletes de cana-de-açúcar pela levedura <i>T. globosa</i> (isolado 1S112).....	36
4.10. Análises estatísticas.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Isolamento de leveduras.....	38
5.2. Avaliação das leveduras isoladas quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos.....	40
5.3. Identificação das leveduras.....	43
5.4. Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> em meios de cultura sólidos.....	49
5.4.1. Efeito de diferentes meios de cultura no antagonismo <i>in vitro</i>	49
5.4.2. Efeito de diferentes valores de pH no antagonismo <i>in vitro</i>	54

5.4.3. Avaliação de diferentes temperaturas de incubação no antagonismo <i>in vitro</i>	58
5.5. Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> em meios de cultura líquidos.....	63
5.6. Avaliação dos mecanismos de ação das leveduras selecionadas.....	69
5.6.1. Atividade <i>killer</i>	69
5.6.2. Produção de compostos antifúngicos voláteis.....	72
5.6.3. Produção de enzimas hidrolíticas	74
5.6.4. Produção de sideróforos.....	74
5.6.5. Competição por nutrientes.....	76
5.6.6. Observação microscópica da hifa dos fungos fitopatogênicos da zona de antagonismo.....	77
5.6.7. Avaliação do crescimento micelial do fungo retirado da zona de antagonismo.....	83
5.7. Caracterização das leveduras como promotoras de crescimento vegetal.....	84
5.7.1. Produção de ácido indol-acético (AIA)	84
5.7.2. Solubilização de fosfatos insolúveis.....	86
5.7.3. Solubilização de rochas potássicas.....	87
5.8. Experimentos <i>in vivo</i>	89
5.8.1. Avaliação do controle biológico de <i>Colletotrichum graminicola</i> em sorgo pelo isolado da levedura <i>T. globosa</i> (1S112).....	89
5.8.2. Avaliação do controle do desenvolvimento de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> em toletes de cana-de-açúcar pela levedura <i>T. globosa</i> (isolado 1S112)...	94
6. CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO I.....	122
ANEXO II.....	126
ANEXO III.....	129
ANEXO IV.....	138
ANEXO V.....	147
ANEXO VI.....	148
ANEXO VII.....	151

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto das placas do segundo isolamento de microrganismos de cana-de-açúcar, onde podem ser observados os diferentes grupos microbianos, a partir da rizosfera, colmo e folha (valor entre parênteses refere-se à diluição da amostra)..... 39
- Figura 2.** Escala de antagonismo da levedura contra o fungo filamentososo, em meio BDA. A- sem nenhum controle, o fungo cresce por cima da levedura (0); B- o fungo filamentososo cresce até o limite da colônia da levedura, mas não por cima desta (+); C – há a formação do halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação (++); D – há o retardo no desenvolvimento micelial, mas no fim do período de incubação o fungo filamentososo se desenvolve por cima da levedura (+/-)..... 42
- Figura 3.** Esquema do DNA ribossomal de eucariontes, apresentando em detalhes a região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e localização dos *primers* (ITS1 e ITS4) utilizados para a identificação das leveduras (baseado em esquema encontrado em www.phytid.org/Images/rna.jpg)..... 44
- Figura 4.** Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR das linhagens de leveduras selecionadas. M – marcador de peso molecular 100 bp..... 44
- Figura 5.** Gel de agarose (1,3%) dos produtos de PCR utilizando ISSR com *primer* GTG₅ das linhagens pertencentes à espécie *T. globosa*. (M1) – marcador de peso molecular 100 bp, (M2) – marcador de peso molecular 1Kb. O esquema à direita é uma representação gráfica das bandas de DNA..... 46
- Figura 6.** Dendrograma apresentando o grau de similaridade genética (*Neighbor Joining tree*) dos isolados de leveduras selecionados (destacados em vermelho), com outras espécies e gêneros constantes do banco de dados do GenBank, com base nas sequências de nucleotídeos da região ITS do rDNA, utilizando o alinhamento múltiplo de sequências Clustal W (<http://align.genome.jp> – Kyoto University Bioinformatics Center)..... 47
- Figura 7.** Aspecto das colônias (acima) em meio YM e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas (aumento de 400 X, para as fotos das células)..... 48
- Figura 8.** Características da levedura *T. globosa* (1S112) em meio YM. Legenda: TC – tubo de conjugação; AS – asco com dois ascósporos..... 49

Figura 9. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. sublineolum* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes meios de cultura, (◆ BDA, ■ YEPD, ▲ Extrato de folha de cana, ✖ Extrato de folha de milho, ✱ Meio com solo), a 25°C, pH 6. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 51

Figura 10. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. graminicola* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes meios de cultura, (◆ BDA, ■ YEPD, ▲ Extrato de folha de cana, ✖ Extrato de folha de milho, ✱ Meio com solo), a 25°C, pH 6. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 52

Figura 11. Inibição do crescimento micelial do fungo *T. paradoxa* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes meios de cultura, (◆ BDA, ■ YEPD, ▲ Extrato de folha de cana, ✖ Extrato de folha de milho, ✱ Meio com solo), a 25°C, pH 6. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 53

Figura 12. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. sublineolum* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (◆ pH 5, ■ pH 6, ▲ pH 7, ✖ pH 8), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 55

Figura 13. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. graminicola* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (◆ pH 5, ■ pH 6, ▲ pH 7, ✖ pH 8), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 56

Figura 14. Inibição do crescimento micelial do fungo *T. paradoxa* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (◆ pH 5, ■ pH 6, ▲ pH 7, ✖ pH 8), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 57

Figura 15. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. sublineolum* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (◆ 22°C, ■ 25°C, ▲ 30°C, ✖ 35°C), pH 6, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 59

Figura 16. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. graminicola* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (◆ 22°C, ■ 25°C, ▲ 30°C, ✖ 35°C), pH 6, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 60

- Figura 17.** Inibição do crescimento micelial do fungo *T. paradoxa* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (—♦— 22°C, —■— 25°C, —▲— 30°C, —✕— 35°C), pH 6, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 61
- Figura 18.** Avaliação dos efeitos dos diferentes sobrenadantes do cultivo das leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32) sobre a germinação de esporos. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 64
- Figura 19.** Avaliação do efeito dos diferentes sobrenadantes do cultivo de *T. globosa* (1S112) sobre a germinação (%) dos esporos do fungo *C. sublineolum*. C/FUNGO- sobrenadante do cultivo misto levedura-fungo filamentoso; S/FUNGO – sobrenadante do cultivo da levedura sem o fungo; B – meio de cultivo BDA; BT – meio de cultivo BDA tamponado; A – sobrenadante autoclavado; F – sobrenadante filtrado. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 66
- Figura 20.** Avaliação do efeito dos diferentes sobrenadantes do cultivo de *C. intermedia* (2S02) sobre a germinação (%) dos esporos do fungo *C. sublineolum*. C/FUNGO- sobrenadante do cultivo misto levedura-fungo filamentoso; S/FUNGO – sobrenadante do cultivo da levedura sem o fungo; B – meio de cultivo BDA; BT – meio de cultivo BDA tamponado; A – sobrenadante autoclavado; F – sobrenadante filtrado. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 67
- Figura 21.** Avaliação do efeito dos diferentes sobrenadantes do cultivo de *Rh. mucilaginosa* (2F32) sobre a germinação (%) dos esporos do fungo *C. sublineolum*. C/FUNGO- sobrenadante do cultivo misto levedura-fungo filamentoso; S/FUNGO – sobrenadante do cultivo da levedura sem o fungo; B – meio de cultivo BDA; BT – meio de cultivo BDA tamponado; A – sobrenadante autoclavado; F – sobrenadante filtrado. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 68
- Figura 22.** Atividade *killer* da linhagem 1S112 de *T. globosa*, mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 25°C, pH 4,5. 69
- Figura 23.** Gel de agarose (1,3%) dos produtos da extração de dsRNA. Legenda: 1- *T. globosa* (1S112); 2 – *Kluyveromyces marxianus* (CCA 510); 3 – *S. cerevisiae* (CCA 118); 4 - *S. cerevisiae* (CCA 015)..... 72
- Figura 24.** Avaliação da produção de compostos antifúngicos voláteis pelos isolados de leveduras contra os fungos fitopatogênicos *C. sublineolum*, *C. graminicola* e *T. paradoxa*, em meio BDA, a 25°C, após 7 dias de incubação..... 73
- Figura 25.** Avaliação da produção de sideróforos pelos isolados de levedura e pela linhagem de *A. niger* (CCT 4355), em meio extrato de malte 2%/CAS, a 25°C, após 7 dias de incubação..... 75

- Figura 26.** Germinação de esporos (%) do fungo *C. sublineolum* (CS) em cultivos puro e mistos com as leveduras *T. globosa* (TG), *C. intermedia* (CI) e *Rh. mucilaginosa* (RM), em meio caldo de batata, com diferentes concentrações de glicose, a 25°C, pH 6,5. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 77
- Figura 27.** Detalhes da morfologia das hifas do fungo *C. sublineolum*, vistas em microscópio óptico, retiradas da placa onde o fungo foi inoculado junto com a levedura *T. globosa* (1S112) (aumento 400X, fotos das hifas). Legenda: A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo..... 79
- Figura 28.** Detalhes da morfologia das hifas do fungo *C. sublineolum*, vistas em microscópio óptico, retiradas da placa onde o fungo foi inoculado junto com a levedura *C. intermedia* (2S02) (aumento 400X, fotos das hifas). A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo..... 80
- Figura 29.** Detalhes da morfologia das hifas do fungo *C. sublineolum*, vistas em microscópio óptico, retiradas da placa onde o fungo foi inoculado junto com a levedura *Rh. mucilaginosa* (2F32) (aumento 400X, fotos das hifas). A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo..... 81
- Figura 30.** Avaliação do crescimento micelial dos fungos *C. sublineolum*, *C. graminicola* e *T. paradoxa*, cujas hifas foram retiradas de diferentes locais da placa onde foram cultivados com as leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32). Legenda: A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo..... 83
- Figura 31.** Membrana de nitrocelulose e papel de filtro indicando, através da coloração avermelhada (setas), a produção de AIA pela levedura *T. globosa* (1S112). Legenda: meios de cultura (LB – Luria Bertani; TSA – *Tryptic Soy* Ágar; BDA e YEPD); 2F32 – linhagem de *Rh. mucilaginosa*; 2S02 – linhagem de *C. intermedia*; 1S112 – linhagem de *T. globosa*..... 85
- Figura 32.** Avaliação da solubilização de fosfato insolúvel pelas leveduras *in vitro*, em meio PDYA, a 25°C, após 3 dias de cultivo..... 86
- Figura 33.** Potássio solúvel (mmol/dm³), pH e acidez titulável (meqH⁺/ml) do meio de cultura contendo pó-de-rocha ultramáfica alcalina, pH 5,3, inoculado com *T. globosa* (1S112)..... 88
- Figura 34.** Avaliação do desenvolvimento da antracnose em sorgo, em casa-de-vegetação, por um período de 6 semanas, utilizando-se uma escala de 0 a 10 (0 a 100% dos sintomas em folhas). Legenda: T1 – controle (sem nenhum tratamento); T2 – levedura inoculada junto com o fungo; T3 – levedura inoculada 24 horas após o fungo; T4 – inoculação do fungo; T5 – levedura inoculada 24 horas após o fungo; T6

– aplicação do fungicida Metiltiofan e inoculação do fungo 48 horas depois. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% entre os tratamentos pelo teste de Tukey. A escala de notas está representada na Figura 35..... 90

Figura 35. Destaque das folhas de sorgo com sintomas da doença antracnose foliar, causada pelo fungo fitopatogênico *C. sublineolum*. A – fonte: EMBRAPA Milho e Sorgo; B – foto do experimento em casa-de-vegetação (UFSCar); C – esquema ilustrando os níveis de incidência da doença nas folhas de sorgo, e a escala de notas utilizada no experimento..... 91

Figura 36. Altura (cm) e massa seca (mg) da parte aérea das plantas de sorgo no momento da colheita após o término do experimento em casa-de-vegetação (após 6 semanas)..... 93

Figura 37. Incidência da doença podridão abacaxi (%) em toletes de cana-de-açúcar, variedade RB72454 causada pelo fungo *T. paradoxa*, após 30 dias de incubação, a 28°C. Legenda: controle – tolete não inoculado com *T. paradoxa* e *T. globosa*; levedura – tolete inoculado somente com *T. globosa*; fungo – tolete inoculado somente com *T. paradoxa*; fungo+levedura – tolete inoculado com *T. paradoxa*+*T. globosa*. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey..... 95

Figura 38. Aspectos dos toletes de cana-de-açúcar do experimento *in vivo* do controle da podridão abacaxi, causada pelo fungo fitopatogênico *T. paradoxa*, pela levedura *T. globosa* (1S112), após 30 dias de incubação, a 28°C, nos diversos tratamentos..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação dos isolados de leveduras no controle do crescimento dos fungos fitopatogênicos *C. graminicola*, *C. sublineolum* e *T. paradoxa*..... 41

Tabela 2. Efeito da temperatura e do pH do meio de cultura YEPD-azul de metileno tamponado sobre a atividade *killer* de *T. globosa* (1S112). H = halo de inibição; ZA = zona azul (morte celular)..... 71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados dos isolamentos de leveduras da cana-de-açúcar e milho..... 39

TITULO: AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁREAS AGRÍCOLAS COMO AGENTES NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

RESUMO

As leveduras são microrganismos importantes em diferentes processos biotecnológicos, sendo amplamente empregadas industrialmente. Apesar de se apresentarem em grande número em ambientes naturais, como na superfície de plantas (folhas, flores e frutos) e na rizosfera, pouco é conhecido sobre sua função nestes habitats. O controle de fitopatógenos tem sido estudado como um potencial papel das leveduras, principalmente inibindo fungos que causam podridões em frutas no período pós-colheita, e controlando doenças de diversas culturas de interesse econômico no campo, pois são ótimas competidoras por nutrientes e espaço. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi isolar, avaliar e caracterizar leveduras de áreas agrícolas quanto ao controle de fungos fitopatogênicos *in vitro* e *in vivo*. Foram isoladas mais de uma centena de linhagens de leveduras, as quais foram avaliadas inicialmente quanto ao antagonismo à três fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum sublineolum*, *Colletotrichum graminicola* e *Thielaviopsis paradoxa*) em testes *in vitro*. Os isolados com comportamento antagonístico foram identificados através do sequenciamento da região ITS do rDNA e por *fingerprinting* utilizando-se a técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Foram realizados testes de antagonismo em meios de cultura sólidos (pela avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno) e líquidos (pela avaliação da germinação dos esporos fúngicos), além de experimentos *in vivo* em plantas de sorgo e toletes de cana-de-açúcar, verificando-se o controle das doenças antracnose e podridão abacaxi, respectivamente. Foram realizadas análises para detecção de possíveis mecanismos de ação das leveduras, como competição por nutrientes; produção de toxina *killer*, compostos voláteis, enzimas hidrolíticas e sideróforos, além da avaliação de possíveis danos causados pela levedura ao micélio fúngico. Os resultados obtidos na seleção de antagonistas indicaram três espécies de leveduras com bons resultados (*Torulaspora globosa*, *Candida intermedia* e *Rhodotorula mucilaginosa*). Nos testes de antagonismo em meios sólidos *in vitro*, todas as leveduras selecionadas foram capazes de controlar os fungos fitopatogênicos, dependendo do tipo de meio de cultura, pH do meio e temperatura de incubação. As leveduras causaram alterações morfológicas nas hifas dos fungos filamentosos, como vacuolização e granulação do micélio, porém não houve perda da viabilidade. Os sobrenadantes (extratos livres de células) dos cultivos da leveduras apresentaram controle significativo da germinação dos esporos de *C. sublineolum*, demonstrando que não há necessidade da presença das células vivas das leveduras para o antagonismo. Para as três leveduras, não houve estímulo na produção de compostos antifúngicos pela presença do fitopatógeno, havendo acúmulo destes ao final de 60 horas de cultivo. Dependendo da levedura, verificou-se a sensibilidade dos compostos à temperatura ou às variações do pH do meio. A levedura *T. globosa* (1S112) apresentou atividade *killer* contra duas linhagens sensíveis, não tendo sido encontrados relatos anteriores de fenótipo *killer* nesta espécie. Testes mostraram que os genes *killer* devem ser cromossomais, pois não foi detectada a presença de plasmídios de dsRNA, o que caracteriza maior estabilidade da atividade *killer*, além desta ser maior em pH 4,5 e temperatura de 25°C. Não foram obtidos resultados positivos para nenhuma levedura nos testes de produção de compostos voláteis, enzimas hidrolíticas e

sideróforos, sendo que todas foram capazes de competir por nutrientes e assim inibir a germinação dos esporos fúngicos. Além da atividade *killer*, a levedura *T. globosa* foi capaz de produzir ácido indol-acético (AIA) e solubilizar fosfatos insolúveis e potássio de rochas, o que contribuiria para a promoção do crescimento vegetal. Esta levedura apresentou resultados significativos de controle da antracnose em sorgo nos experimentos em casa-de-vegetação, provavelmente devido à melhor eficiência na competição por nutrientes. Foi também capaz de controlar a incidência da doença podridão abacaxi, causada por *T. paradoxa*, em experimentos com toletes de cana-de-açúcar. Conclui-se que a levedura *T. globosa* (linhagem 1S112), por apresentar resultados significativos no controle dos fitopatógenos estudados, bem como demonstrar características que promovam o crescimento vegetal, constitui-se em uma levedura com potencial para ser utilizada no controle biológico.

Palavras-chave: leveduras *killer*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum sublineolum*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Torulaspota globosa*

TITLE: EVALUATION OF YEASTS ISOLATED FROM AGRICULTURAL AREAS AS AGENTS OF THE BIOLOGICAL CONTROL

ABSTRACT

The yeasts are important microorganisms for different purposes in biotechnological processes and widely utilized industrially. Although in high numbers in natural environments, as plant surfaces (leaves, flowers and fruits) and rhizosphere, a little is known about their functions in the habitats. The control of phytopathogens by the yeasts has been studied, mainly inhibiting molds which cause fruit rots in the post-harvesting period, and controlling diseases of economically important cultures in the field, once they are good competitors for nutrients and space. In this context, the aim here is the isolation, screening and characterization of yeasts from agricultural areas regarding their ability to control phytopathogenic molds *in vitro* and *in vivo*. More than a hundred of strains were isolated, which were initially screened for the *in vitro* antagonism against three phytopathogenic molds (*Colletotrichum sublineolum*, *Colletotrichum graminicola* and *Thielaviopsis paradoxa*). The isolates with antagonistic behavior were identified by the sequencing of ITS region in the rDNA and by fingerprinting with the ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) technique. Antagonism tests in solid media (evaluating the mycelial growth of the phytopathogen) and liquid media (evaluating the fungal spore germination) were carried out, besides *in vivo* experiments with sorghum and sugar cane to verify the control of anthracnose and pineapple disease, respectively. Mechanisms of action by yeasts towards the molds were evaluated as competition for nutrients; production of killer toxin, volatile compounds, hydrolytic enzymes and siderophores. The damage caused by the yeast in the fungal hyphae was also approached. The results indicated three yeast species with good results as antagonists (*Torulasporea globosa*, *Candida intermedia* and *Rhodotorula mucilaginosa*). All the yeasts exhibited antagonism against the phytopathogenic molds in solid media, on the dependence of the medium type, medium pH and incubation temperature. They also caused morphological deformities in the hyphae, as vacuolization and granulation of the mycelia; however, no loss of viability was verified. The supernatants (free-of-cell extracts) of yeast cultures showed significant control of the spore germination in *C. sublineolum*, showing that living cells are not demanded for the antagonism. For all the yeasts, there was no stimulation in the production of antifungal compounds when the mold was cultivated together, with accumulation after 60 hours of cultivation. Depending on the yeast, sensitivity to temperature or to pH variations were verified for the compounds produced in the supernatant. The yeast *T. globosa* (1S112) has showed killer activity against two sensitive strains and no previous report was found for killer phenotype in this yeast species. The absence of dsRNA plasmid suggested that the killer genes are chromosomal, which characterizes stability of the killer activity, higher in pH 4.5 and at 25°C. Not even a yeast produced volatile antifungal compounds, hydrolytic enzymes and siderophores, but they were all able to compete for nutrients and so to inhibit the fungal spore germination. Besides the killer activity, the yeast *T. globosa* was also capable to produce indole-acetic-acid (IAA) and to solubilize insoluble phosphates and potassium from rocks, which would contribute to the promotion of plant growth. This yeast significantly controlled the anthracnose in sorghum in the greenhouse experiments, probably due to the better efficiency in the

competition for nutrients. It was also able to control the incidence of the pineapple disease, caused by *T. paradoxa*, in sugar cane. It is concluded that the yeast *T. globosa* (strain 1S112) is a potential organism to be used for the biological control of causative agents of plant diseases, not only by the good antagonistic profile against the phytopathogens studied, but also by the characteristics that promote plant growth.

Key words: killer yeasts, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum sublineolum*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Torulaspota globosa*.

1. INTRODUÇÃO

Leveduras são microrganismos conhecidos por participarem ativamente em diversos processos biotecnológicos importantes. Atualmente, com o grande interesse na produção e economia de energia através de tecnologias sustentáveis, a mais conhecida espécie representante deste grupo, *Saccharomyces cerevisiae*, é comprovadamente essencial neste caminho. Outras espécies de leveduras também estão em estudo e diferentes aplicações são apresentadas, sendo o controle biológico uma das áreas mais promissoras. Leveduras como *Candida oleophila* podem ser encontradas comercialmente e apresentam ótimos resultados quando aplicadas no controle de fungos de podridão pós-colheita, permitindo menores perdas e desperdícios, além de proporcionar maiores lucros para produtores e comerciantes (DROBY et al., 1998; GAMAGAE et al., 2004).

O controle biológico de fitopatógenos fúngicos no campo também pode empregar espécies de leveduras, sendo encontrados trabalhos com resultados positivos e animadores (ASSIS et al., 1999; MASIH et al., 2000; EL TARABILY, 2004); porém pouco ainda se conhece sobre a função e comportamento deste grupo microbiano no ambiente.

Algumas espécies de leveduras podem apresentar a habilidade de produzir compostos antimicrobianos, como a toxina *killer*, que pode causar a morte de outras espécies de leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Além disso, outros mecanismos de ação foram observados no controle biológico de fitopatógenos, como a produção de enzimas hidrolíticas, produção de compostos antifúngicos voláteis, indução de resistência do hospedeiro, produção de sideróforos e outros compostos conhecidos como promotores de crescimento vegetal, além de micoparasitismo (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006).

A principal característica descrita na literatura é a habilidade da levedura

em colonizar de forma rápida a superfície de folhas, frutos e flores, atuando por competição por espaço e nutriente, principalmente em locais com presença de açúcar, não permitindo o desenvolvimento de outros microrganismos.

O desafio nesta área é a expansão do conhecimento sobre o comportamento da levedura em áreas com cultivo agrícola, e a descoberta de como esse grupo microbiano pode auxiliar no processo de produção, contribuindo para o equilíbrio do ecossistema e minimizando a aplicação de produtos tóxicos no ambiente, como os fungicidas químicos, que podem poluir o solo, lençóis freáticos, rios e lagos, além de serem potenciais causadores de doenças e morte de animais e seres humanos.

2. REVISÃO BIBLOGRÁFICA

2.1. Controle Biológico

O início da produção de alimentos pelo homem há mais de 10.000 anos atrás, pelo advento da agricultura, trouxe consigo o surgimento das pragas agrícolas, principalmente, devido ao desequilíbrio da diversidade microbiana natural do ecossistema pela prática da monocultura. Microrganismos patogênicos têm causado perdas no campo e na pós-colheita, reduzindo a produtividade, o valor e o período de armazenamento dos produtos agrícolas (PUNJA e UTKHEDE, 2003).

Para combater as doenças nas plantas e impedir seu prejuízo, é necessário o uso de agrotóxicos, os quais se apresentam, hoje, muitas vezes, como única ferramenta capaz de exterminar o problema. A aplicação destes produtos no campo, porém, causa a poluição do ambiente, podendo contaminar o solo, rios, lagos, lençóis freáticos e, como são substâncias venenosas, podem se acumular em animais, causar câncer e mutações genéticas em descendentes (LIMA et al., 2000).

Atualmente, o desafio de produtores e pesquisadores é a substituição destes produtos por controles alternativos, com substâncias livres de resíduos tóxicos ou através da tecnologia do controle biológico. Cook e Baker (1983) definiram controle biológico como “a redução da soma de inóculo ou atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”. De acordo com Lima et al. (2000), o controle biológico tem como premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas, associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis.

No geral, o controle biológico apresenta-se como uma ferramenta para o combate das doenças no campo e na pós-colheita, em substituição ou em conjunto com os agroquímicos, tornando assim a produção de alimentos mais sustentável e ecológica. Os testes para o uso dessa tecnologia ainda se concentram nos laboratórios de pesquisa, no entanto, é possível encontrar no mercado biopesticidas, os quais oferecem como ingrediente ativo, microrganismos antagonistas.

O sucesso destes microrganismos, hoje produzidos em larga escala, é o interesse de várias empresas no desenvolvimento de produtos biológicos para o controle de doenças, principalmente em frutas e vegetais no período pós-colheita. Atualmente, quatro microrganismos antagonistas, duas leveduras (*Candida oleophila* e *Cryptococcus albidus*) e duas linhagens de uma mesma espécie de bactéria (*Pseudomonas syringae*) estão disponíveis comercialmente sob o nome de “Aspire” (Ecogen Inc., Langhorn, PA), “YieldPlus” (Anchor Yeast, Cape Town, South Africa), “BIOSAVE-110” e “BIOSAVE-111” (EcoScience, Orlando, FL), respectivamente (DROBY et al., 2002).

O número de biopesticidas para controle biológico está aumentando, porém representam somente 1% das vendas de defensivos agrícolas nos EUA. Os fungicidas representam aproximadamente 15% das vendas dos pesticidas (FRAVEL, 2005).

Uma dificuldade comum no uso de fungicidas químicos é a resistência adquirida pelo patógeno ao produto utilizado (DUFFY et al. 2003). No controle biológico existe também a possibilidade de haver mudanças no microrganismo patogênico que levam ao surgimento de populações resistentes, devido às constantes pressões exercidas pelos agentes de controle no patógeno alvo. As contribuições dos biopesticidas, porém, são importantes porque oferecem modalidades diferentes da ação em relação aos pesticidas químicos e podem, conseqüentemente, ser aplicados na rotação com esses produtos para reduzir o desenvolvimento possível da resistência (FRAVEL, 2005)

Diferentes grupos de microrganismos antagonistas têm sido estudados no controle de fitopatógenos, apresentando bons resultados para o desenvolvimento de potenciais biopesticidas. As rizobactérias são microrganismos que vivem naturalmente na rizosfera das plantas, sendo conhecidas por promover o crescimento vegetal. Os mecanismos utilizados por esse grupo microbiano no controle biológico de fitopatógenos são competição por nutrientes, produção de sideróforos e antibióticos (DAVE e DUBE, 2000; SOTTERO et al., 2006; REDDY et al., 2008), resistência induzida do hospedeiro (NANDAKUMAR et al., 2001; RAMAMOORTHY et al., 2001), promoção de crescimento através da produção de

fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes na solução do solo pela fixação de nitrogênio (ANTOUN et al., 1998; REIS JUNIOR et al., 2004) ou solubilização de fosfatos insolúveis (CHABOT et al., 1996; SOUCHIE et al., 2007).

Dentre os fungos filamentosos, *Trichoderma* se destaca como um agente efetivo no controle biológico de fitopatógenos. Os mecanismos de ação utilizados por esse fungo filamentoso são produção de enzimas hidrolíticas (INNOCENTI et al., 2003), parasitismo, competição por nutrientes e espaço, além de produção de compostos tóxicos voláteis ou não (MARTINS-CORDER e MELO, 1998).

As leveduras constituem um grupo microbiano com diferentes propriedades, que as caracterizam como potenciais candidatas ao controle de fungos filamentosos causadores de doenças em plantas. Leveduras estão presentes naturalmente na superfície de plantas, conseguem se reproduzir de forma rápida, e ocupam de forma competitiva os locais de infecção fúngica nas plantas (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006). Outros modos de ação antagônica são a produção de enzimas hidrolíticas (JIJAKLI e LEPOIVRE, 1998), produção de compostos antibióticos (McCORMACK et al., 1994) e toxinas *killer* (WALKER et al., 1995).

2.2. Leveduras

A importância das leveduras remonta ao começo da história da humanidade, ou seja, cerca de 8.000 a.C., através da produção do pão, alimento de grande importância para a maioria das culturas, além da relevância na elaboração de outros produtos tais como, álcool etílico, vinho e cerveja (EL-DASH et al., 1980). No geral, leveduras são definidas como fungos, cujo estado sexual não apresenta corpos de frutificação e o crescimento vegetativo ocorre por brotamento ou fissão. São microrganismos predominantemente unicelulares, não móveis, sendo a maioria sapróbio e alguns parasitas oportunistas (MILLER, 1979; LACHANCE e STARMER, 1998).

A distribuição das leveduras no ambiente é bastante ampla, podendo ser encontrada em flores, folhas, solo, frutos, ar, lagos, rios, mares, e até em insetos e animais. As leveduras estão historicamente associadas a processos fermentativos e substratos que contenham hexoses (açúcares). A habilidade destes microrganismos em assimilar uma larga gama de compostos orgânicos, expande a sua capacidade de dispersão e sobrevivência em diferentes nichos ecológicos (PHAFF e STARMER, 1987).

Diferentes funções têm sido atribuídas às leveduras encontradas no ambiente, como a solubilização de fosfatos no solo, com a levedura *Yarrowia lipolytica* auxiliando na nutrição das plantas (MEDINA et al., 2004); como agentes no biocontrole de patógenos de pós-colheita de produtos agrícolas (CASTORIA et al., 2001; DRUVEFORS et al., 2005); no controle biológico de fitopatógenos de culturas no campo (ASSIS et al., 1999; EL-TARABILY, 2004), além de produzirem compostos promotores de crescimento vegetal, como hormônios vegetais e sideróforos (MEDINA et al., 2004; NASSAR et al., 2005).

Apesar de todo o conhecimento sobre algumas funções das leveduras no ambiente, muito ainda há para ser descoberto, principalmente sobre o seu modo de ação frente à ambientes diversos e outros microrganismos. O fato de as leveduras se adaptarem a diferentes ambientes as torna capazes de produzir diferentes compostos, sendo que muitos deles podem ser benéficos ao homem e integrar processos biotecnológicos importantes.

Saccharomyces cerevisiae é a mais estudada e utilizada dentre todas as espécies de leveduras. Seu emprego envolve a indústria alimentícia, a produção de pães e bebidas alcoólicas (vinho, cachaça e cerveja), e a indústria sucroalcooleira. Esta última baseia-se na capacidade desta levedura em consumir o açúcar da cana-de-açúcar e transformá-lo em álcool etílico. O Brasil é o maior produtor de álcool para uso como combustíveis em carros, com produção na safra de 2008/2009 de 27,5 milhões de litros (UNICA, 2009), alternativa aos combustíveis derivados de petróleo.

Outros processos biotecnológicos nos quais as leveduras podem ser empregadas são na produção de aromas, com as espécies *Pichia fermentans* (HUANG et al., 2001) e *Kluyveromyces marxianus* (GARAVAGLIA et al., 2007); na produção de carotenóides, utilizando as espécies *Phaffia rhodozyma* e *Rhodotorula glutinis* (FRENGOVA e BESHKOVA, 2008), além do emprego de algumas espécies como probióticos e fontes nutricionais (*Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*) (MARTINS et al., 2005).

2.3. Leveduras no controle biológico

As leveduras apresentam características que as tornam eficientes como agentes no controle biológico de fungos fitopatogênicos. Em geral, leveduras não produzem esporos que possam causar processos alérgicos, ou micotoxinas, potencialmente causadoras de doenças, como ocorrem em fungos filamentosos; também não produzem substâncias antibióticas como espécies bacterianas antagônicas (DROBY e CHALUTZ, 1994), tornando sua aplicação

segura em alimentos para o consumo humano. Outra característica das leveduras é o fato deste grupo habitar naturalmente a superfície das plantas, apresentando a capacidade de sobreviver em superfícies secas por um longo período, além de serem capazes de viver em superfícies com pesticidas (WILSON e WISNIEWSKI, 1989; EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006).

Outro ponto importante é que a célula da levedura contém grandes quantidades de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais, verificando-se trabalhos que indicam grandes benefícios das leveduras como complemento alimentar (HUSSEIN et al., 1996).

O emprego de leveduras no controle biológico de fungos fitopatogênicos, porém, tem recebido pouca atenção em comparação com bactérias, actinobactérias e fungos filamentosos (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006). Alguns mecanismos observados em leveduras como biocontroladores de doenças de folhas e frutos são: competição por nutrientes e espaço (FOKKEMA, 1984; DROBY et al., 1989; FILONOW, 1998; JANISIEWICZ et al., 2000); produção de enzimas que degradam parede celular, como β -1,3-glucanase e quitinase (CASTORIA et al., 2001; MASIH e PAUL, 2002; URQUHART e PUNJA, 2002); produção de metabólitos antifúngicos (WALKER et al., 1995; MASIH et al., 2001; HOFTE et al., 2004); indução de resistência em hospedeiro (WILSON et al., 1994; DROBY et al., 2002; EL GHAOUTH et al., 2003) e micoparasitismo (WISNIEWSKI et al., 1991; ARRAS et al., 1998; EL GHAOUTH et al., 1998).

2.3.1. Produção de enzimas hidrolíticas

Uma das principais características das estruturas fúngicas é a presença de uma camada rígida, conhecida como parede celular. Essa camada reveste todas as células e apresenta a capacidade de manter a forma e proteger o organismo contra adversidades ambientais (MADIGAN et al., 2004). A parede celular acomoda todo o aparato celular proporcionando a ocorrência plena dos processos vitais para o bom desenvolvimento fúngico (PUNJA e UTKHEDE, 2003; FIALHO, 2005). Entre os infortúnios ambientais enfrentados pela parede celular, um dos mais desafiadores é a pressão dos microrganismos antagonistas, os quais, em alguns casos, apresentam mecanismos para romper a parede celular e/ou interromper processos relacionados à sua síntese (LORITO et al., 1996; LIMA et al., 2000, PUNJA e UTKHEDE, 2003).

A composição da parede celular é de 80 a 90% de carboidratos, entre eles a quitina e a β -1,3-glucana, além de proteínas e lipídios. Por isso, a capacidade do organismo antagonista em produzir enzimas como quitinase e β -1,3-glucanase torna-o capaz de atuar no controle do desenvolvimento fúngico.

É possível encontrar na literatura exemplos de leveduras capazes de produzir enzimas hidrolíticas, utilizando esse mecanismo no controle de fungos fitopatogênicos. Trabalhos envolvendo o controle de patógenos foliares e de frutas indicam que espécies como *Pichia anomala*, *P. membranifaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus laurentii*, *Aureobasidium pullulans*, *Tilletiopsis albescens* e *T. pallescens* foram capazes de produzir a enzima β -1,3-glucanase contra os fungos *Botrytis cinerea* (JIJAKLI e LEPOIVRE, 1998; MASIH e PAUL, 2002), *Sphaerotheca fugilinea* (URQUHART et al., 1994; URQUHART e PUNJA, 2002), *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer* (CASTORIA et al., 1997, 2001). Jijakli e Lepoivre (1998) observaram que a levedura *P. anomala* causou deformações na hifa do fungo *B. cinerea*, sendo que a mais observada foi lise e achatamento da ponta das hifas. Masih e Paul (2002), avaliando a ação da espécie *P. membranifaciens* sobre o fungo *B. cinerea*, observaram a produção da enzima β -1,3-glucanase pela levedura, e notaram que a enzima causou coagulação e rompimento citoplasmático das hifas fúngicas.

A produção de quitinases foi observada pela levedura *A. pullulans*, no controle do fungo *P. expansum* (CASTORIA et al., 2001); pelas leveduras *T. albescens* e *T. pallescens* (URQUHART e PUNJA, 2002) e, em *Candida saitoana*, no controle de *B. cinerea* (EL GHAOUTH et al., 1998).

Chanchaichaovivat et al. (2008), estudando os possíveis modos de ação de *Pichia guilliermondii* (R13) no controle de antracnose em pimenta, causado pelo fungo *Colletotrichum capsici*, observaram que um dos mecanismos envolvidos no controle foi a produção das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase. Esses autores observaram que o sinergismo entre o mecanismo enzimático e a competição por nutrientes do meio foram fundamentais para o controle do fitopatógeno estudado.

É possível observar na literatura exemplos de antagonistas que apresentam diferentes modos de ação no controle fúngico e seu emprego simultâneo no controle biológico. A ação de antibióticos e enzimas hidrolíticas foi capaz de controlar de forma significativa o desenvolvimento dos fungos *Fusarium oxysporum* (SCHIRMBOCK et al., 1994) e *B. cinerea* (LORITO et al., 1996), o que não ocorreu se apenas um dos mecanismos de ação fosse empregado.

El-Tarabily (2004) observou que a aplicação das leveduras de rizosfera, *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii*, individualmente ou em combinação, reduziu significativamente o *damping-off* (tombamento) das plântulas de beterraba, causado pelo fungo *Rhizoctonia solani*, sob condições de casa-de-vegetação. El-Mehalawy et al. (2004), estudando a aplicação de *Candida glabrata*, *Candida maltosa*, *Candida slooffiae*, *Rhodotorula rubra* e *Trichosporon cutaneum*, individualmente ou em conjunto, observaram a redução significativa da incidência de doença no milho causada por *Cephalosporium maydis*, através da produção de metabólitos antifúngicos e de degradadores de parede celular, como quitinase e β -1,3-glucanase. Os mesmos autores também observaram a produção de metabólitos antifúngicos por *Saccharomyces unispora* e *Candida steatolytica*, as quais reduziram significativamente a incidência do ataque pelo fungo *Fusarium oxysporum*, em feijão.

2.3.2. Competição por espaço e nutrientes

A disponibilidade de nutrientes afeta fortemente o metabolismo secundário de fungos, incluindo a produção de micotoxinas, as quais, dentre outras funções, protege o fungo contra microrganismos antagônicos (LUCHESE e HARRIGAN, 1993). As espécies de leveduras que apresentam características antagônicas a fungos fitopatogênicos podem atuar na inibição do desenvolvimento fúngico sem reduzir a sua atividade metabólica, nem atuar na degradação da sua parede celular. A competição entre os microrganismos por fatores ambientais essenciais, como nutrientes e espaço, apresenta-se como um dos mecanismos de controle biológico, fundamental nos estudos das interações levedura-fungo filamentosos (BLEVE et al., 2006).

Fitopatógenos fúngicos necessitam de portas de entrada para o tecido da planta, a fim de colonizar e causar a doença. Parasitas obrigatórios possuem a capacidade de invadir os tecidos com a penetração direta da hifa; parasitas facultativos, porém, na sua maioria saprófitas, necessitam de aberturas como ferimentos, tecidos em senescência, estômatos ou lenticelas, as quais, geralmente são ricas em nutrientes, como açúcares e aminoácidos. Agentes de controle biológico devem ser capazes de competir efetivamente com o patógeno por esses locais de infecção, sendo que a falta de nutrientes e espaço pode inibir o desenvolvimento do patógeno e prevenir a germinação de propágulos e a infecção (PUNJA e UTKHEDE, 2003).

A interação entre a levedura *Cryptococcus magnus* e o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* na superfície de mamão foi avaliada por Capdeville et al.

(2007). Os autores observaram que a levedura foi capaz de crescer e colonizar a superfície do fruto de forma muito mais rápida que o patógeno, competindo de forma eficaz por espaço e provavelmente por nutrientes, impedindo a ação patogênica do fungo.

2.3.3. Produção de toxina killer

O sistema *killer* em leveduras tem sido investigado extensivamente desde sua descoberta em *S. cerevisiae* por Makower e Bevan (1963). A partir disso, foi observado que linhagens de leveduras *killer* atuam através da secreção de uma toxina proteica, a qual mata outras leveduras sensíveis a ela. Essa característica *killer* já foi reportada em várias leveduras, entre elas, *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* (PHILLISKIRK e YOUNG, 1975; YOUNG, 1982), *Ustilago* (KANDEL e KOLTIN, 1978), *Rhodotorula*, *Trichosporon* (MORACE et al., 1984), *Hanseniaspora* (RADLER et al., 1985), *Williopsis*, *Zygowilliopsis* (KAZANTSEVA e ZIMINA, 1989) e *Zygosaccharomyces* (RADLER et al., 1993).

A característica *killer* é encontrada em vários gêneros de leveduras e as toxinas são ativas contra grande variedade de leveduras de diferentes gêneros e espécies. As toxinas *killer* de leveduras são classificadas em diferentes tipos de acordo com seu aspecto de letalidade e de imunidade, como K1, K2, K3, e outros (ROGERS e BEVAN, 1978; YOUNG e YAGIU, 1978; WICKNER, 1979; TIPPER e BOSTIAN, 1984). A frequência do fenômeno *killer* em leveduras parece ser alta em ambientes naturais, sendo que linhagens *killer* têm sido isoladas de frutas, cogumelos, plantas em decomposição, solo (STUMM et al., 1977), de processos fermentativos para a produção de cerveja, vinho (YOUNG, 1982; SHIMIZU et al., 1985) e de álcool (CECCATO-ANTONINI et al., 2004, 2005).

Além de controlar o crescimento de outras leveduras, as linhagens *killer* podem apresentar comportamento antagônico a outros grupos microbianos, como bactérias e fungos filamentosos. Vários trabalhos podem ser encontrados na literatura empregando leveduras *killer* no controle de bactérias de importância clínica (IZGU e ALTINBAY, 1997; FUENTEFRÍA et al., 2008) e contaminantes de fermentação alcoólica (MENEHIN et al., 2009).

Tem sido sugerido que as toxinas *killer* têm grande potencial como agente antifúngico no controle de fitopatógenos (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006). Walker et al. (1995) observaram que leveduras *killer* apresentam grande potencial de controle de fungos

filamentosos patogênicos, mostrando-se capazes de inibir fortemente o crescimento micelial de *Heterobasidion annosum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, entre outros. Apesar de esses estudos terem sido realizados *in vitro*, há uma clara indicação do potencial de uso desses microrganismos como controladores biológicos de fungos fitopatógenos.

Coelho (2005), avaliando a ação das leveduras *killer Candida guilliermondii* e *Pichia ohmeri* sobre o fungo fitopatogênico *Penicillium expansum* e na degradação da micotoxina patulina, observou que a ação da toxina *killer* foi ineficaz quando purificada e aplicada de forma isolada, indicando haver ação de mecanismos sinérgicos para a total ação dos agentes antagonistas. Cabral et al. (2009) realizaram o isolamento de leveduras de frutas e de solo da Floresta Amazônica e a avaliação dos isolados quanto à produção de compostos micocinogênicos (toxina *killer*) e no controle biológico do fungo *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa em cacau. Os resultados indicaram um isolado de *Candida* sp. e um isolado de *Dipodascus capitatus* como os mais eficientes no controle fúngico, sendo a primeira observação de *Dipodascus* com atividade *killer*.

2.3.4. Indução de resistência ao hospedeiro

A resistência induzida é um fenômeno biológico complexo que envolve a ativação de vários mecanismos, entre eles a hipersensibilidade, barreiras estruturais, aumento de síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), como a hidrolase β -1,3-glucanase (HAMMERSCHMIDT, 1999). A ativação desses mecanismos de resistência apresenta-se como um método alternativo para o controle de fitopatógenos. De acordo com Pascholatti e Leite (1995), os mecanismos podem ser bioquímicos e/ou estruturais, e atuam de forma dinâmica e coordenada, permitindo que a planta se defenda do ataque dos patógenos.

Os mecanismos de defesa da planta podem ser induzidos por elicitores bióticos, os quais correspondem a microrganismos (fungos filamentosos, leveduras, bactérias, partículas virais) e plantas, e moléculas por eles produzidas (oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos); ou abióticos, os quais podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos (metais pesados) e luz ultravioleta (PASCHOLATTI e LEITE, 1995; LEITE et al., 1997).

A enzima peroxidase, conhecida por participar de vários processos fisiológicos, está relacionada à oxidação de compostos fenólicos e síntese do hormônio vegetal etileno, sendo que a alteração na sua atividade no processo de infecção tem sido relacionada à resistência das

plantas contra o ataque de fungos fitopatogênicos. Roncatto e Pascholatti (1998) avaliaram a ação da levedura *S. cerevisiae* no perfil eletroforético de peroxidase em plantas de milho e sorgo, e observaram que a suspensão de células ou mesmo o filtrado da levedura foi capaz de alterar o padrão de atividade da enzima peroxidase nas plantas. Esse resultado caracteriza a ação da levedura como estimuladora do processo de resistência da planta à fitopatógenos que potencialmente podem vir a causar danos na cultura.

A ação de microrganismos promotores de crescimento vegetal na indução de resistência é conhecida, porém há dúvidas sobre os mecanismos e elicitores empenhados para engatilhar o início do processo de defesa na planta (PUNJA, 2001).

2.3.5. *Micoparasitismo*

A adesão das células de leveduras nas hifas e esporos fúngicos foi observada em muitos estudos (CASTORIA et al., 1997; ARRAS et al., 1998; SPADARO et al., 2002). Esse fenômeno indica uma grande interação entre o patógeno e a levedura antagonista (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006).

Arras et al. (1996) observaram rápida colonização do micélio de *Penicillium digitatum* por *Candida famata*, com ação lítica e fagocítica da levedura contra a hifa fúngica. A forte ligação de células de *Pichia guilliermondii* ao micélio de *Penicillium italicum* causou a degradação da parede celular da hifa próxima do local onde as células de leveduras se aderiram (ARRAS et al., 1998). Hifas pertencentes ao fungo *B. cinerea* apresentaram injúrias severas quando próximas de células de *C. saitoana*, mostrando degeneração citoplasmática (EL GHAOUTH et al., 1998).

2.3.6. *Produção de sideróforos e substâncias promotoras de crescimento vegetal*

Microrganismos que apresentam a habilidade de produzir compostos capazes de promover o crescimento vegetal (MPCV) apresentam-se como um grupo importante no contexto do controle biológico. Esses microrganismos são capazes de solubilizar fosfatos e outros minerais e melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas sendo apontados como promotores de crescimento e resistência vegetal (YEDIDIA et al., 2001).

As principais ações diretas desses microrganismos nas plantas estão na produção de fitormônios de crescimento e no auxílio à nutrição da planta (fixação biológica de nitrogênio e

solubilização de fosfatos e outros nutrientes). Os benefícios indiretos desses microrganismos consistem no controle biológico de muitos fitopatógenos (VASSILEV et al., 2006). O ácido indol-acético (AIA) e os compostos sideróforos apresentam-se como os principais metabólitos produzidos pelos MPCV.

Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular, quelante de íons férricos, e sintetizados por algumas espécies microbianas (WINKELMANN, 1991). A produção de compostos sideróforos ajuda o microrganismo a competir efetivamente contra outros organismos pelo ferro disponível no ambiente. Nessas circunstâncias, o microrganismo se desenvolve de maneira satisfatória, enquanto limita a disponibilidade de ferro para os seus competidores, restringindo o desenvolvimento. Essa competição é aceita como um mecanismo de supressão, o qual pode atingir microrganismos patogênicos. Também é conhecida a ação dos compostos sideróforos em solubilizar o ferro presente no solo, anteriormente indisponível para as plantas (PRABHU et al., 1996).

Rhodotorula glutinis apresenta a capacidade de produzir compostos sideróforos (ácido rhodotorúlico), os quais foram capazes de inibir a germinação de esporos e a severidade da podridão em maçã causada pelo fungo *B. cinerea* (SANSONE et al., 2005). Wang et al. (2009), isolando leveduras de ambiente marinho, observaram que um isolado identificado como *A. pullulans* apresentou alta produção de compostos sideróforos. Os pesquisadores avaliaram a ação desta levedura contra duas bactérias patogênicas marinhas *Vibrio anguillarum* e *Vibrio parahaemolyticus*, as quais foram controladas pela levedura.

O fitormônio auxina, particularmente através do composto regulador de crescimento vegetal AIA, apresenta envolvimento na interação entre o fitopatógeno e seu hospedeiro. Vários autores têm propostos mecanismos de ação de biocontrole do AIA, sendo que duas hipóteses foram sugeridas: (1) potencial envolvimento do AIA em conjunto com glutathione S-transferase, relacionado às reações de defesa da planta (DROOG, 1997); (2) inibição da germinação dos esporos e desenvolvimento micelial dos fungos fitopatogênicos (BROWN e HAMILTON, 1993). Trabalho desenvolvido por Martinez Noel et al. (2001) mostraram que a adição de AIA em folhas de batata cortadas reduziu a severidade da doença provocada por *Phytophthora infestans*.

2.3.7. Produção de antibióticos

A produção de compostos antimicrobianos por leveduras tem sido observada em diversos estudos. McCormack et al. (1994) isolaram leveduras habitantes de filoplano e observaram que *A. pullulans*, presente neste ambiente, foi capaz de produzir dois compostos antibióticos, os quais foram isolados e estudados pelos autores.

Choudhury et al. (1994) isolaram dois novos metabólitos secundários (ácido 4-metil-7,11-heptadecadinenal e ácido 4-metil-7,11-heptadecadienóico) das espécies *yeast-like Sporothrix flocculosa* e *S. rugulosa*, com atividade antifúngica e antibacteriana. Hajlaoui et al. (1994) avaliaram a ação do antibiótico produzido por *S. flocculosa* na produção de biomassa e germinação de esporos dos fungos *B. cinerea* e *Fusarium oxysporum*, e observaram controle significativo no desenvolvimento dos fitopatógenos.

Urquhart e Punja (2002) purificaram um ácido graxo com atividade antifúngica da *yeast-like Tilletiopsis pallescens*. A aplicação deste composto foi capaz de inibir o desenvolvimento do tubo germinativo e causar o colapso da hifa e do conídio do fitopatógeno *Podosphaera xanthii*. A levedura *Pseudozyma flocculosa* também apresenta a habilidade de produzir um composto contendo ácidos graxos, o qual tem a capacidade de afetar a permeabilidade da membrana de microrganismos alvo e inibir seu desenvolvimento (AVIS e BÉLANGE, 2001).

2.4. Antracnose em milho e em sorgo (*Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum sublineolum*)

Colletotrichum graminicola (Cesati) Wilson (Syn. *Colletotrichum sublineolum* P. Henn) é o agente causal da antracnose do milho e do sorgo. No Brasil, a antracnose é uma das mais importantes doenças destes cereais, ocorrendo em todas as áreas onde as culturas são produzidas (CRUZ et al., 1996; PINTO, 2003).

Trabalhos envolvendo isolados de *C. graminicola* oriundos de milho e sorgo têm demonstrado grande especificidade de hospedeiro, indicando que os isolados que atacam o milho e sorgo são distintos, podendo ser considerados *formae speciales* ou espécies distintas (JAMIL e NICHOLSON, 1987). Sherriff et al. (1995) compararam as seqüências da região ITS do rDNA dos isolados de *C. graminicola* oriundos de milho e sorgo, e observaram que entre eles houve uma homologia de apenas 92%, indicando que os isolados pertencem à

espécies diferentes. Foi proposta a modificação do nome da espécie do isolado patogênico à cultura do sorgo para *C. sublineolum* P. Henn., Kabat e Bubak (COSTA et al., 2003). Apesar das espécies apresentarem semelhança morfológica, é importante considerar que existem diferenças fisiológicas quanto ao modo de infecção, esporulação e controle, requerendo diferentes medidas para o manejo e combate da doença nos diferentes hospedeiros (COSTA et al., 2003).

Os fungos podem infectar qualquer parte da planta, sendo mais comuns os ataques às folhas e colmo. As lesões são necróticas nas folhas e estreitas e encharcadas nos colmos, sendo de coloração pardo avermelhada (SHURTTLEFF, 1980).

Os fitopatógenos formam acérvulos esféricos ou piriformes de tamanho 8 a 15 μm , e seus conídios são falciformes, medindo de 23 a 29 μm de comprimento por 3,5 a 5 μm de largura (PONTES, 1987). O patógeno sobrevive como saprófita em restos de cultura por até dez meses (NAYLOR e LEONARD, 1977), porém há redução em sua sobrevivência se em contato com o solo, pois é um fungo pouco eficiente na competição com outros microrganismos do solo (LIPPS, 1985).

Os conídios podem permanecer viáveis por semanas a meses, contanto que os mesmos estejam recobertos por uma matriz mucilaginosa produzida pelo próprio fungo, que o protege de condições ambientais adversas (NICHOLSON e MORAES, 1980). Para a germinação dos conídios é necessária a presença de água para a solubilização dessa matriz, que abriga substâncias inibidoras. Além de atuar na sobrevivência dos conídios, a matriz mucilaginosa está envolvida no processo de patogênese do fungo (BERGSTROM e NICHOLSON, 1983; PASCHOLATTI et al., 1993; ANDERSON e NICHOLSON, 1996). Sua dispersão no ambiente se dá através de respingos de chuva ou pelo vento (BERGSTROM e NICHOLSON, 1999).

Segundo Pande et al. (1994), o máximo desenvolvimento da doença foi observado em temperaturas próximas a 25°C, enquanto temperaturas abaixo de 15°C e acima de 30°C restringiram seu desenvolvimento. A ocorrência de chuvas frequentes parece ser o fator comum nas áreas onde a doença ocorre em maior frequência, sendo que em muitas regiões pode se tornar fator limitante, com redução na produção de grãos de 50% ou mais, em epidemias mais severas (WARREN, 1986), ou na diminuição na qualidade das sementes ou grãos (CASELA, 1992). Um período mínimo de 24 horas de molhamento foliar é necessário para o desenvolvimento da doença, cuja severidade aumenta com o prolongamento desse período (PANDE et al., 1994).

Um dos métodos de controle mais eficiente e econômico para esta doença é o uso de variedades geneticamente resistentes, porém tal medida é dificultada pela alta variabilidade apresentada pelo fungo, a qual determina, muitas vezes, a rápida adaptação do patógeno às variedades resistentes (CASELA et al, 1998).

Condições ambientais podem interferir na resistência do hospedeiro, como a intensidade de luz, a qual está diretamente relacionada com o nível de resistência da planta, devido provavelmente à biossíntese de compostos fenólicos, associados à resistência, os quais são altamente dependentes de luz (SCHALL et al., 1980). A resistência pode estar associada ao estágio fenológico da planta, sendo que na fase vegetativa, as plantas encontram-se mais suscetíveis à colonização fúngica, provavelmente devido à maior concentração de açúcares (BERGSTROM e NICHOLSON, 1999).

Grande ênfase tem sido dada à busca por alternativas que permitam ampliar a durabilidade da resistência do sorgo à antracnose. Estratégias como a utilização de resistência dilatória, que atua reduzindo a taxa de desenvolvimento da doença (GUIMARÃES et al., 1998), a identificação de dissociação de virulência na população do patógeno (CASELA et al., 1998, 2001) e a utilização de misturas de cultivares (GUIMARÃES et al., 1998) têm sido adotadas com esse propósito. São limitadas as informações básicas, importantes para dar suporte à essas e também às estratégias alternativas que possibilitem ampliar a durabilidade da resistência genética à antracnose em sorgo.

Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura avaliando o potencial de microrganismos antagonistas no controle da antracnose. Silva e Pascholatti (1992) avaliaram, em casa-de-vegetação, que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta resultados favoráveis no controle do fungo *C. graminicola* em milho. Piccinin et al. (2005) estudaram a aplicação da levedura *S. cerevisiae* em plantas de sorgo para o controle do fungo *C. sublineolum* no campo, obtendo redução significativa da doença.

2.5. Podridão abacaxi em cana-de-açúcar (*Thielaviopsis paradoxa*)

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, com uma produção na safra 2008/2009 de 569 milhões de toneladas. A cana-de-açúcar é a matéria prima das usinas sucroalcooleiras, a qual transforma o caldo da cana em açúcar e álcool etílico, produtos os quais o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores (UNICA, 2009).

Atualmente os produtores de cana-de-açúcar estão fazendo o plantio em diversas épocas do ano, visando escalonar a colheita da cultura e melhorar o aproveitamento do parque de máquinas, do aparato industrial e dos recursos humanos. Isso tem causado o aumento na incidência de pragas e doenças desde antes da emergência das plantas do solo (FERREIRA et al., 2008). O fungo *T. paradoxa*, neste contexto, aparece como um desafio e tem preocupado pesquisadores e produtores, justamente quando a cana-de-açúcar é plantada nos períodos mais secos do ano (de abril a setembro), sobretudo devido ao crescimento, que é mais lento nesta época do ano, pois além da diminuição da precipitação, as temperaturas permanecem abaixo de 25°C (ALFONSI et al., 1987; CASAGRANDE, 1991).

Esse patógeno é incapaz de penetrar por seus próprios meios em tecidos íntegros ou por aberturas naturais da planta, necessitando de cortes ou ferimentos nesta como porta de entrada para a colonização. Na cana-de-açúcar isso é particularmente importante, porque o corte das mudas em toletes para o plantio oferece uma entrada fácil ao fungo. Em toletes infectados, o desenvolvimento de raízes e gemas é retardado ou inibido. Em geral, os brotos morrem antes de emergirem do solo ou emergem vagarosamente, produzindo plantas fracas que são dominadas pela competição com plantas vizinhas e perdem produtividade (TOKESHI, 2005; FERREIRA et al., 2008). Devido à cana-de-açúcar ser uma planta semiperene, o plantio apresenta-se como uma etapa crítica da produção, e falhas na linha de cultivo podem gerar perdas irreparáveis até o momento da reforma do canavial, o que ocorre a cada 5 ou 6 anos, dependendo da variedade (FERREIRA et al. 2008).

O fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) von Höhn (Syn=*Ceratocystis paradoxa*) habita o solo e é responsável por causar doenças em diferentes culturas de importância econômica. *T. paradoxa* é o nome dado ao fungo em sua fase imperfeita ou assexual. Na fase sexual ou perfeita é chamado de *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau, raramente encontrado na natureza (FERRARI, 2009).

Em sua fase imperfeita, o fungo produz conidióforos em forma de clava (fiálides) geralmente pigmentados, com 3 a 4 septos, eretos, hialinos, longos e afilados. As fiálides terminais são mais largas próximas à base, onde são formados os endoconídios hialinos, cilíndricos, inicialmente em cadeias. Os aleuriosporos formam-se em cadeia, de forma elíptica, escuros, de tamanhos 3 a 4 vezes maior que os conídios, sendo produzidos no interior de conidióforos curtos (FERRARI, 2009).

Há relatos de ataques deste patógeno à palmeiras (*Phoenix dactylifera*) nos Estados Unidos e Kuwait, coco (*Cocos nucifera*) na Venezuela, e abacaxi (*Ananas comosus*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) no Brasil (SANCHEZ et al, 2007).

O tolete contaminado inicialmente apresenta uma coloração amarelo-pardacenta, passando à negra, com destruição total do tecido parenquimatoso, permanecendo indestrutíveis os tecidos fibrovasculares. Os toletes atacados não germinam, provocando falhas na lavoura, causando grandes prejuízos. Durante o ataque pode haver exalação de odor típico, semelhante ao de abacaxi maduro (AGROBYTE, 2009), daí o nome da doença, podridão abacaxi.

A estratégia mais largamente utilizada para o manejo de doenças é o uso de variedades de plantas resistentes. Porém, para algumas variedades ou doenças, isso ainda não é disponível ou eficaz e exige outros métodos de controle, dentre os quais o mais empregado é a aplicação de fungicidas (MOHANRAJ et al., 2002). Porém o uso de fungicidas químicos de maneira descuidada ou indiscriminada pode trazer prejuízos financeiros e ecológicos, os quais necessitam de critérios para utilização (FERREIRA et al., 2008). Plantio em época correta, bom preparo do solo e a colocação do tolete à profundidade adequada aceleram a germinação e constituem o melhor controle da doença (AGROBYTE, 2009).

Poucos são os estudos envolvendo o controle biológico no controle do fungo fitopatogênico *T. paradoxa*. Sanchez et al. (2007) avaliaram o emprego da espécie *Trichoderma longibrachiarum* no controle do fungo, causador de podridão em agave, planta utilizada para a produção da bebida alcoólica tequila, no México. Os autores obtiveram resultados de controle satisfatórios, através da produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo antagonista. Meneghin (2008) observaram que bactérias isoladas da rizosfera da cana-de-açúcar foram capazes de controlar de forma significativa o desenvolvimento do fungo *T. paradoxa*, tanto em placas de Petri como em toletes de cana-de-açúcar.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a ação de leveduras isoladas de áreas agrícolas (planta e solo) no controle biológico de fitopatógenos de cana-de-açúcar, milho e sorgo, em testes *in vitro* e *in vivo*, verificando os possíveis mecanismos de ação envolvidos no antagonismo.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar, selecionar e identificar leveduras da rizosfera, de folhas e colmo de milho e cana-de-açúcar com potencial de aplicação como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos;
- Quantificar o potencial antagônico *in vitro* e avaliar fatores envolvidos no controle (meios, pH, temperaturas, autoclavagem), em meios de cultura sólido e líquido;
- Identificar possíveis mecanismos envolvidos no controle biológico (produção de toxina *killer*, enzimas hidrolíticas, sideróforos, compostos voláteis, competição e substâncias promotoras de crescimento vegetal);
- Avaliar *in vivo* o controle do fungo *C. sublineolum* em sorgo e *T. paradoxa* em cana-de-açúcar, utilizando o isolado de levedura com melhores resultados de antagonismo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento de leveduras

As leveduras foram isoladas da rizosfera, de folhas e colmos de cana-de-açúcar (variedade RB867515) e milho (variedade DKB-390, Dekalb). As amostragens foram realizadas em áreas pertencentes à Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras-SP, onde essas variedades são cultivadas. O município de Araras está localizado entre as longitudes de 47°15' e 47°30' a Oeste de Greenwich e as latitudes de 22°10' e 22°30', no sentido Sul; está localizado a 611 metros de altitude, possui clima quente, chuvas concentradas no verão e inverno seco; temperatura média máxima de 32 graus e mínima de 8 graus Celsius (

A coleta das amostras foi efetuada em três momentos, sendo duas amostragens realizadas na cana-de-açúcar (planta com um corte - soca) em dois estágios: no início do desenvolvimento (com cerca de 50 cm de altura) no mês de março de 2007, e no final do desenvolvimento (momento anterior à colheita), no mês de setembro de 2007. A terceira amostragem foi realizada em área com cultivo de milho, no estágio fenológico R1 (florescimento e polinização), no mês de março de 2008.

Os isolamentos das leveduras da rizosfera, folhas e colmos da cana-de-açúcar e do milho foram realizados de acordo com Azeredo et al. (1998), usando as técnicas de diluição decimal, utilizando solução salina 0,85% para solo, e solução estéril de lavagem para colmo e folhas, com agitação a 250 rpm por 30 minutos; o plaqueamento foi realizado em triplicata, utilizando os meios de cultura YEPD, YM e WLN (ver ANEXO I).

As placas foram incubadas a 25°C por um período de 3 a 7 dias. As colônias de leveduras com morfologia distinta (análise das características da colônia e das células ao microscópio) foram isoladas e purificadas em placas de Petri, em meio YEPD e, após isolamento, as leveduras foram mantidas em tubos com meio de cultura inclinado, a 4°C, para testes posteriores e identificação.

4.2. Fungos fitopatogênicos

Os patógenos selecionados para o trabalho são agentes causadores de doenças em cana-de-açúcar (podridão abacaxi, *Thielaviopsis paradoxa*), sorgo (antracnose, *Colletotrichum sublineolum*) e milho (antracnose, *Colletotrichum graminicola*).

O patógeno de cana-de-açúcar foi cedido pela Prof^a Dr^a Silvana Perissatto Meneghin, do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras, SP. Os patógenos de milho e sorgo estudados foram cedidos pelo Dr. Carlos Casela, da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Os fungos fitopatogênicos foram mantidos em placas de Petri em meio BDA em geladeira (4°C) até o momento dos testes.

4.3. Avaliação das leveduras isoladas quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos

Todas as leveduras isoladas da cana-de-açúcar e do milho foram avaliadas quanto ao potencial antagonístico aos fungos fitopatogênicos selecionados. O teste foi realizado em placa de Petri, em meio de cultura BDA, no qual foi colocado de um lado, o fungo filamentososo (disco de micélio em pleno desenvolvimento de 5 mm de diâmetro) e no lado oposto, a levedura (um risco vertical com uma alçada retirada de uma cultura nova). Foi considerada levedura antagonista aquela que impediu o crescimento normal do micélio fúngico, comparado ao controle (placa com fungo filamentososo sem levedura).

Para uma melhor caracterização dos antagonistas, foi determinada uma escala de antagonismo com quatro diferentes níveis: (0) – o fungo filamentososo cresce independentemente da presença da levedura; (+) - o fungo filamentososo cresce até o limite da colônia da levedura e não se desenvolve por cima desta; (++) - há formação de halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação; (+/-) – há retardo no

desenvolvimento micelial, mas no fim do período de incubação, o fungo filamentososo se desenvolve por cima da levedura.

O objetivo desta avaliação é a seleção e identificação de linhagens que, de acordo com Sharma et al. (2009) devem apresentar as seguintes características para serem consideradas potenciais agentes de controle biológico: serem geneticamente estáveis; efetivos mesmo em pequenas concentrações; não fastidiosas em suas necessidades nutricionais; capazes de sobreviver sob condições ambientais adversas; serem hábeis no controle de diferentes fitopatógenos; resistentes à pesticidas; não produzirem compostos tóxicos aos seres humanos; não patogênicas à planta hospedeira; preparadas de uma forma que possam ser armazenadas e transportadas; e compatíveis com outros tratamentos químicos e físicos.

4.4. Identificação das leveduras

Os isolados de leveduras que apresentaram melhores resultados, no processo de seleção anteriormente descrito, foram identificados através da análise do material genético, utilizando técnicas de biologia molecular.

4.4.1. Extração de DNA

Foi realizada, inicialmente, a extração de DNA das leveduras, através da metodologia descrita por Vancetto et al. (2006). Uma alçada de células de uma colônia nova (2 dias de crescimento em meio YEPD) foi transferida para tubos com 10 ml de meio de cultura YEPD líquido. Os tubos foram incubados a 25°C com agitação de 160 rpm por um período de 18 horas (*overnight*). O material foi centrifugado a 3000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 10 ml de água Milli-Q estéril e 1,5 ml da suspensão foram transferidos para microtubos. Estes foram centrifugados a 3000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 200 µl de tampão de extração.

Deu-se início a três ciclos de choque térmico (congelamento e descongelamento) utilizando nitrogênio líquido (-196°C) e bloco de aquecimento (65°C). Para a desproteinização do material, adicionou-se 200 µl de clorofane e agitou-se o tubo por 8 minutos. Foram adicionados 200 µl de tampão TE 1X e o tubo foi agitado por 30 segundos, sendo após, centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e

transferido para outro microtubo. O processo de desproteinização com clorofane foi repetido mais duas vezes. Para completar o processo, foram adicionados 500 µl de CIA, e o tubo foi agitado por 30 segundos, sendo logo após, centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e foi adicionado 1 ml de etanol absoluto gelado. O tubo foi misturado suavemente, sendo em seguida centrifugado a 13000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação o tubo foi incubado em freezer (-20°C) por 12 horas. Passado o período de incubação, o tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado, sendo o material precipitado e ressuspenso em 500 µl de etanol 70% gelado, para lavagem do *pellet*. O tubo foi centrifugado novamente e o sobrenadante descartado, sendo o *pellet* seco ao ar por 5 minutos, para a evaporação do álcool, sendo em seguida ressuspenso em 50 µl de tampão TE 1X, e armazenado em freezer (-20°C).

Para a estimativa da presença, quantidade e integridade do DNA extraído, 5 µl da amostra foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) em tampão TBE 1X. O gel foi submetido a uma voltagem de 2,24 volts/cm e corrente de 90 mA, por 90 minutos (Fonte EPS301 – Amersham Biotechnology). A estimativa de concentração do DNA foi realizada comparativamente com a espessura e intensidade das bandas do marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 0,3 µl/ml, sendo a visualização do gel realizada em transiluminador de luz UV. O gel foi fotodocumentado em câmara fotográfica digital Sony CyberShot 5.1 megapixels.

4.4.2. Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, incluindo o gene 5.8S, foi realizada através de reação de PCR (Reação da Polimerização em Cadeia), utilizando-se os seguintes *primers*: *forward* - ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e *reverse* - ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), conforme protocolo de White et al. (1994). A reação ocorreu em um volume de 100 µl, contendo 10 µl do tampão 10X, 3 µl de cloreto de magnésio 50 mM, 8 µl de cada dNTP 2,5 mM, 1 µl de cada *primer* 100 µM, 0,25 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 100 ng de DNA genômico e 51,75 µl de água milli-Q estéril. O ciclo de amplificação foi o seguinte: 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos, e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de 1 ciclo final de extensão 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit comercial “DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Health Care).

Para a estimativa da presença, quantidade e integridade dos amplicons, 5 µl do produto de amplificação foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 1X. O gel foi submetido a uma voltagem de 2,24 volts/cm e corrente de 90 mA, por 90 minutos (Fonte EPS301 – Amersham Biotechnology). A estimativa de concentração do DNA foi realizada comparativamente com a espessura e intensidade das bandas do marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 0,3 µl/ml, sendo a visualização do gel realizada em transiluminador de luz UV. O gel foi fotodocumentado em câmara fotográfica digital Sony CyberShot 5.1 megapixels.

4.4.3. Sequenciamento da região ITS do rDNA

A reação de sequenciamento foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pertencente ao Instituto Agronômico de Campinas, em Cordeirópolis/SP.

A reação consistiu de 3 µl do produto de PCR purificado, 0,5 µl de *primer* (ITS1 ou ITS4), 0,4 µl do kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), 2 µl do tampão SM e água Milli-Q estéril para completar 10 µl. O programa constou de 1 ciclo de 96°C por 2 minutos, 25 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos, e 60°C por 4 minutos. O produto foi estocado sob refrigeração a 4°C. Para a precipitação foram utilizados 80 µl de isopropanol 65%, agitando-se suavemente e deixando-se em repouso na bancada por 15 minutos. Após o repouso, foi realizada a centrifugação a 3000 rpm por 45 minutos, sendo o sobrenadante descartado e deixado para secar ao ar por 1 minuto. Foram adicionados 200 µl de etanol 60%, e nova centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e realizou-se a secagem e lavagem com etanol novamente. Em seguida foi dado um pulso de centrifugação e secagem ao ar por 1 hora. Ressuspendeu-se em 10 µl de Hi-Di Formamida, procedendo-se a desnaturação do DNA por incubação a 95°C por 5 minutos e imediatamente em seguida, a solução foi colocada em gelo até o momento do sequenciamento, realizado em sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram trabalhadas utilizando-se o programa BioEdit, e comparadas com outras já conhecidas e disponíveis no banco de dados GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), sendo estas submetidas a um alinhamento através do aplicativo Clustal W 1.4 (Thompson et al., 1994).

4.4.4. Análise de diversidade genética utilizando marcador molecular ISSR

Com o objetivo de verificar se as linhagens identificadas como sendo da mesma espécie eram semelhantes geneticamente, foi realizada técnica de *fingerprinting* conhecida ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Esta técnica consta de uma reação de PCR, que utiliza apenas um *primer* com seqüências repetidas, o qual pode se anelar em locais aleatórios no genoma, resultando em padrões de amplificação específicos para cada linhagem. O protocolo desta técnica foi baseado nos trabalhos de Silva-Filho et al. (2005) e modificado para adaptações às condições do laboratório.

Na extração do DNA nuclear, os isolados foram inoculados em 10 ml do meio YEPD líquido e incubados *overnight* (cerca de 18 horas) a 30°C a 160 rpm. As células foram lavadas com água estéril e amostras de 875 µl de cada cultura foram transferidas para microtubo de 1,5 ml e 525 µl de tampão de lise (0.2 M Tris-HCl; 25 mM EDTA; 1% SDS; 25 mM NaCl, pH 8) foram adicionados, seguindo-se de incubação a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão ocasional. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi coletado e transferido para novo microtubo, onde foi adicionado um volume da solução fenol:clorofórmio (1:1). Nova centrifugação foi realizada (13000 rpm por 5 minutos), sendo a fase aquosa coletada e a ela adicionado um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), centrifugando-se por mais uma vez. O sobrenadante foi coletado e dois volumes de etanol absoluto gelado foram adicionados, permanecendo por duas horas a -20°C para precipitação do DNA.

Após precipitação, o DNA foi coletado por centrifugação por igual período e rotação e lavado por duas vezes com etanol 70%, seco ao ar por cinco minutos e ressuspenso em 100 µl de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8). A estimativa da concentração de DNA foi determinada por comparação visual de cada amostra com padrões de DNA de concentração conhecida em gel de 1% de agarose em tampão TBE 1X, submetido a uma voltagem de 2,24 volts/cm e corrente de 90 mA por 3 horas (fonte EPS301 - Amersham biotech.). O gel foi corado então com solução de brometo de etídeo 0,3 ng/µl sendo a visualização do DNA feita em transiluminador de luz UV. As imagens foram fotodocumentadas em câmera digital Sony Cyber Shot 5.1 megapixels.

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando o marcador molecular ISSR (GTG)₅ em 25 µl de volume final, utilizando-se o termociclador modelo Gene Cycler (BioRad), de acordo com protocolo a seguir, que utilizou as seguintes concentrações dos

reagentes: tampão 1X, BSA (*bovine serum albumin*) 0,025 µg/µL, dNTP 0,5 mM, *primer* GTG₅ (Invitrogen) 0,2 µM, MgCl₂ 3 mM, DNA 2 ng/µl e DNA polimerase 0,05 U/µl.

A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 6 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3%, submetidos a 7,5 volts/cm por 150 minutos em tampão TBE 0,5 X, corados em brometo de etídeo (0,3 µl/ml), visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados em câmera digital Sony Cyber Shot 5.1 megapixels.

4.5. Avaliação do antagonismo *in vitro* em meios de cultura sólidos

As leveduras que apresentaram resultado positivo de antagonismo na avaliação de seleção (*Torulaspota globosa* - 1S112; *Candida intermedia* - 2S02 e *Rhodotorula mucilaginosa* - 2F32) foram reavaliadas em placa de Petri quanto ao seu potencial no controle do desenvolvimento dos fitopatógenos testados. Para tal, foram avaliados diferentes fatores possivelmente envolvidos no processo antagônico, como fonte nutricional, pH e temperatura. Estes experimentos constaram da inoculação do fungo (disco de micélio com 0,5 cm de diâmetro com crescimento ativo) e uma alçada da levedura em locais opostos, como realizado no processo de avaliação e seleção de antagonistas.

4.5.1. Avaliação de diferentes meios de cultura no antagonismo in vitro

Neste experimento foi avaliada a influência de diferentes meios de cultura no antagonismo das leveduras em relação aos fitopatógenos *in vitro*. Os meios testados foram: meio de cultura BDA, YEPD, Solo + Glicose, Extrato de Folha de Cana, Extrato de Folha de Milho, todos padronizados em pH 6. O experimento foi realizado avaliando-se o antagonismo de três isolados de leveduras em esquema fatorial 3 X 3 X 5 (3 isolados de levedura X 3 fungos fitopatogênicos X 5 meios de cultura), com cinco repetições. As placas foram incubadas a 25°C, com medição do diâmetro do crescimento micelial a cada 4 dias, em um total de 12 dias de incubação. O crescimento micelial dos tratamentos onde a levedura foi inoculada foi comparado em relação ao tratamento controle, no qual havia apenas o fungo filamentoso.

4.5.2. Avaliação de diferentes valores de pH no antagonismo *in vitro*

Neste experimento foi avaliada a influência de diferentes valores de pH do meio no antagonismo *in vitro* das leveduras em relação aos fitopatógenos. Foi preparado o meio BDA e este foi ajustado para pH 5, 6, 7 e 8, utilizando-se NaOH 0,5 N ou HCl 1 N. O experimento foi realizado avaliando-se o antagonismo de três isolados de levedura em esquema fatorial 3 X 3 X 5 (3 isolados de levedura X 3 fungos fitopatogênicos X 5 valores de pH), com cinco repetições. As placas foram incubadas a 25°C, com medição do diâmetro do crescimento micelial a cada 4 dias, em um total de 12 dias de incubação. O crescimento micelial dos tratamentos onde a levedura foi inoculada, foi comparado em relação ao tratamento controle, no qual havia apenas o fungo filamentososo.

4.5.3. Avaliação de diferentes temperaturas de incubação no antagonismo *in vitro*

Neste experimento foi avaliado o fator temperatura de incubação na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos pelos isolados de levedura testados, *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi BDA, pH 6, e as temperaturas testadas foram 22, 25, 30 e 35°C. O experimento foi realizado avaliando-se o antagonismo de três isolados de leveduras em esquema fatorial 3 X 3 X 5 (3 isolados de levedura X 3 fungos fitopatogênicos X 5 temperaturas de incubação), com cinco repetições. As placas foram incubadas a 25°C, com medição do diâmetro do crescimento micelial a cada 4 dias, em um total de 12 dias de incubação. O crescimento micelial dos tratamentos, onde a levedura foi inoculada, foi comparado em relação ao tratamento controle, no qual havia apenas o fungo filamentososo.

4.6. Avaliação do antagonismo *in vitro* em meios de cultura líquidos

A avaliação do antagonismo em meio líquido foi realizado segundo Coelho (2005). O objetivo deste experimento foi avaliar a inibição da germinação dos esporos fúngicos na presença dos sobrenadantes do cultivo das leveduras.

Inicialmente foi realizado o preparo do extrato bruto, que seguiu o seguinte protocolo: uma alçada da levedura foi transferida para frascos com 25 ml de meio líquido BD (Batata Dextrose) e estes incubados a 25°C, a 160 rpm até obtenção de 3×10^7 células/ml. Desta

suspensão, 100 µl foram utilizados como inóculo para os seguintes tratamentos: 50 ml de meio BD com a levedura testada; 50 ml de meio BD com a levedura testada e o fungo fitopatogênico (10^5 esporos/ml do fungo *C. sublineolum*); 50 ml de meio BD tamponado com a levedura; e 50 ml de meio BD tamponado com a levedura e o fungo (10^5 esporos/ml do fungo *C. sublineolum*). Após 24, 48 e 60 horas a 25°C e 90 rpm, foi realizada a amostragem de 2 ml dos cultivos, sendo estes filtrados em membrana de porosidade 0,22 µm ou autoclavados a 120°C, 1 atm por 15 minutos.

Em tubos de cultura foram colocados 1 ml do meio de cultivo filtrado ou autoclavado e um volume igual de meio BD inoculado com 10^5 esporos/ml do fungo *C. sublineolum*. O controle (branco) foi obtido com a inoculação do meio BD com o fungo e a adição de 1 ml de água destilada estéril. A avaliação foi feita em Câmara de Neubauer para contagem do número de esporos germinados. Foram utilizadas três repetições, cada uma constituída da contagem de seis campos da câmara de Neubauer para avaliação da porcentagem de esporos germinados.

4.7. Avaliação dos mecanismos de ação das leveduras isoladas

4.7.1. Detecção de atividade killer

As leveduras isoladas e analisadas e selecionadas como antagonistas aos fungos fitopatogênicos, foram caracterizadas quanto à presença do fator *killer*, de acordo com metodologia descrita por Ceccato-Antonini et al. (2004), em meio de cultura YEPD + azul de metileno, tamponado a pH 4,3-4,7. Foram utilizadas as leveduras padrões sensíveis, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Torulopsis glabrata* ATCC 15126, preparando-se as suspensões das células a 4×10^5 células/ml, após cultivo por 24 horas a 30°C em meio YEPD. Da suspensão, foi retirado 0,1 ml, o qual foi espalhado em meio de cultura, e após secagem, as leveduras a serem testadas foram inoculadas com palitos estéreis (em pontos), sendo a seguir as placas incubadas a 30°C, por 3 dias. Os isolados foram considerados micocinogênicos (produtores de toxina *killer*) quando produziram um halo de inibição de crescimento e zona azul adjacente, indicando morte celular da levedura sensível.

4.7.1.1. Avaliação do pH e temperatura na atividade *killer*

Utilizando o mesmo meio de cultura para a detecção da atividade *killer* (YEPD + azul de metileno) e mesma metodologia, foi realizada a avaliação da influência do pH e temperatura na atividade *killer*. Os valores de pH testados foram 3,5; 4,5 e 5,5, sendo estes ajustados no momento do preparo do tampão do meio de cultura. As temperaturas de incubação analisadas foram 25, 30 e 35°C.

A levedura *killer* avaliada foi contrastada com as leveduras sensíveis *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Torulopsis glabrata* ATCC 15126, sendo avaliadas a presença e características do halo formado, como morte celular ou inibição do desenvolvimento da levedura sensível.

4.7.1.2. Extração do plasmídeo dsRNA

A extração foi realizada de acordo com a metodologia de Goto et al. (1990) modificada por Soares e Sato (1999). Em 10 ml de meio de cultura YEPD acondicionados em tubos de cultivo (Falcon) foram inoculadas 2 alçadas da levedura, sendo o tubo colocado em agitador refrigerado por 12 horas, a 25°C e 160 rpm.

As células foram coletadas após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, e lavadas com EDTA 50 mM pH 8,0. Foi realizada nova centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos e as células incubadas a 60°C por 1 hora em solução de lise contendo EDTA 25 mM, Tris-HCl 200 mM pH 8,0, NaCl 25 mM e SDS 1%. A suspensão de células foi então centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa (sobrenadante) foi tratada duas vezes com um volume de fenol, fenol clorofórmio (1:1) e clorofórmio, para a extração dos plasmídios. A fase superior foi precipitada com isopropanol (1:1), e o precipitado foi resuspenso em tampão TE 1X.

Para a estimativa da presença dos plasmídios, 10 µl da solução foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 1X. O gel foi submetido a uma voltagem de 7,5 volts/cm e corrente de 70 mA, por 120 minutos (Fonte EPS301 – Amersham Biotechnology). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 0,3 µl/ml, sendo a visualização do gel realizada em transiluminador de luz UV. O gel foi fotodocumentado em câmara fotográfica digital Sony CyberShot 5.1 megapixels.

4.7.2. Produção de compostos antifúngicos voláteis

Para a verificação da produção de compostos antifúngicos voláteis pelos isolados de leveduras testados, foi avaliado o crescimento dos fungos fitopatogênicos inoculados conjuntamente com os isolados de leveduras, porém utilizando placas com divisão, a qual impede que exsudatos não voláteis produzidos pela levedura tenham contato com o fungo através do meio de cultura. A mesma quantidade de meio de cultura BDA foi vertida em cada um dos lados da placa, sendo inoculada uma alçada da levedura de um lado e um disco de 5 mm de diâmetro com micélio fúngico em crescimento ativo do outro. Após 10 dias de incubação a 30°C foi realizada a avaliação que constou da medida do diâmetro micelial do fungo fitopatogênico frente à levedura, comparada à placa com apenas a presença do fungo filamentososo (sem a inoculação da levedura).

4.7.3. Produção de enzimas hidrolíticas

Este experimento foi realizado para avaliar a produção e liberação de enzimas hidrolíticas por três isolados de leveduras (1S112, 2S02 e 2F32), seguindo-se o procedimento utilizado por Fialho (2005). Os isolados foram transferidos através de uma alça de inoculação para 2,5 ml de meio YEPD líquido e incubados a 32°C por 12 horas. Após esse período, 1 ml da suspensão foi transferido para erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio YEPD e YEPD modificado (com preparado de parede celular do fungo filamentososo testado a 1% em substituição à glicose). O cultivo foi realizado em triplicata a 32°C sob agitação a 90 rpm. Nos tempos de 12, 24, 36, 48 e 60 horas de incubação, uma amostra de 2 ml foi retirada e centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi recuperado e utilizado para análise das atividades de β -1,3-glucanase e quitinase.

4.7.3.1. Preparado de parede celular (PPC)

Para a produção do preparado de parede celular, 4 discos de micélio do fungo testado foram colocados em erlenmeyers contendo 100 ml de meio batata-dextrose (BD). O cultivo foi realizado a 25°C com agitação de 150 rpm, por 10 dias. O micélio fúngico obtido foi coletado por filtração a vácuo e lavado várias vezes com água destilada. O material foi

homogeneizado em 100 ml de água destilada e centrifugado a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o excesso de água retirado. O micélio foi então macerado em almofariz com nitrogênio líquido. O produto da maceração foi adicionado a 100 ml de água destilada e submetido a 3 ciclos de centrifugação e ressuspensão. O sedimento foi submetido à incubação a 55°C por 12 horas para secagem, constituindo o preparado de parede celular (PPC).

4.7.3.2. Determinação da atividade enzimática - β -1,3-glucanase

Para a avaliação da produção de β -1,3-glucanase foi utilizada a técnica de quantificação colorimétrica de glicose liberada do substrato laminarina, através da dosagem de açúcares redutores. A reação foi realizada com 50 μ l de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0; 200 μ l da amostra de cultivo e 250 μ l de laminarina (4 mg/ml). A mistura da reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Após esse período, a reação foi paralisada através da adição de 250 μ l do reagente ADNS a 250 μ l da reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados. A determinação de açúcares redutores foi realizada segundo o método utilizado por Miller (1959). Para a realização do procedimento, a mistura da reação e o reagente ADNS foi aquecida em água fervente por 5 minutos e resfriados em gelo até a temperatura de 25°C. A solução foi diluída com 2,5 ml de água destilada, homogeneizada e foi determinada a 540 nm, em espectrofotômetro BioMate3 (Thermo Electron Corporation), contra o branco, contendo tampão em substituição ao meio de cultivo.

As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose e a atividade enzimática expressa em U/ml, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1 μ g de açúcar redutor liberado (glicose) da laminarina por minuto nas condições de ensaio.

4.7.3.3. Determinação da atividade enzimática – quitinase

A avaliação da produção de quitinase foi realizada através da técnica da liberação de N-acetil glucosamina (NAG), a partir do substrato glicol quitina. Para a realização da análise, 100 μ l da amostra de cultivo foram misturados com 200 μ l de tampão McIlvaine e 100 μ l de glicol quitina 0,01% (p/v) neste mesmo tampão. Após incubação por 15 minutos a 37°C, a reação foi interrompida através da adição de 250 μ l do reagente ADNS a 250 μ l da mistura de reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados, de acordo com Miller (1959).

Para a realização do procedimento, a mistura da reação e o reagente ADNS foram aquecidos em água fervente por 5 minutos e resfriados em gelo até a temperatura de 25°C. A solução foi diluída com 2,5 ml de água destilada, homogeneizada e foi determinada a 540 nm, em espectrofotômetro BioMate3 (Thermo Electron Corporation), contra o branco, contendo tampão em substituição ao meio de cultivo. A atividade enzimática foi expressa em U/ml, no qual uma unidade de atividade (U) foi definida como 1 µg de açúcar redutor liberado (n-acetil glucosamina) enzimaticamente da glicol quitina por minuto nas condições de ensaio.

4.7.4. Produção de sideróforos

Para a detecção da produção de sideróforos pelas leveduras antagonistas, foi utilizada metodologia de Milagres et al. (1999). O meio de cultura utilizado foi CAS (cromo azurol S) azul agar, preparado de acordo com Schwyn e Neilands (1997). Apesar de indicar a produção de sideróforos através da mudança de cor, muitos microrganismos não conseguem se desenvolver nesse meio de cultura, por isso, após a solidificação, metade do meio na placa foi retirado e substituído pelo meio de cultura extrato de malte 2% (EM), no qual a levedura se desenvolve bem. A levedura foi inoculada apenas no meio EM e a placa foi incubada a 25°C por 10 dias no escuro. Foi analisado o crescimento da levedura e se houve a mudança da cor do meio de azul para avermelhado ou amarelo, indicativos de produção de sideróforos. Como controle positivo, foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* (CCT 4355), conhecido por produzir sideróforos do tipo catecol, que modifica a cor do meio CAS de azul para vermelho.

4.7.5. Competição por nutrientes

Para a detecção da competição de nutrientes entre o fungo fitopatogênico e a levedura antagonista, foi realizado um experimento no qual, diferentes concentrações de glicose foram adicionadas em meio caldo de batata, a seguir: 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 %.

O experimento foi realizado em tubos de ensaio, em triplicata. O inóculo consistiu da adição aos tubos de 100 µl de uma suspensão de 10^5 esporos/ml do fungo *C. sublineolum* e 100 µl de uma suspensão de 10^8 células/ml da levedura testada. Foram avaliadas as três linhagens de leveduras que apresentaram melhores resultados de antagonismo (*T. globosa* - 1S112, *C. intermedia* - 2S02 e *Rh. mucilaginoso* - 2F32), sendo os tubos incubados a 25°C por 16 horas, em triplicata.

A análise do experimento constou da avaliação da porcentagem de esporos germinados, conforme procedimento descrito no item 4.6.

4.7.6. Observação microscópica da hifa dos fungos fitopatogênicos da zona de antagonismo

Com o objetivo de observar possíveis danos causados pelas leveduras selecionadas ao micélio fúngico, foi realizada a observação microscópica das hifas do fungo filamentosso *C. sublineolum* em microscópio óptico. Para isto, discos de 5 mm de diâmetro de diferentes locais da placa de Petri com antagonismo, isto é, próximo, na porção mediana e longe do halo de antagonismo, foram retirados, e com a ajuda de uma lâmina, foram cortados longitudinalmente para a retirada do excesso de meio de cultura e obtenção de finas camadas com micélio para montagem das lâminas para observação. Para fins de comparação, foi montada uma lâmina de uma placa de Petri com micélio em crescimento ativo. As hifas foram observadas, fotografadas e comparadas quanto à morfologia, de acordo com cada tratamento.

4.7.7. Avaliação do crescimento micelial do fungo retirado da zona de antagonismo

A partir da observação do halo de inibição entre os isolados de levedura antagonicos e os fungos fitopatogênicos estudados, foi realizado um experimento para quantificar o crescimento micelial do fungo retirado da zona de antagonismo (micélio localizado adjacente do halo de inibição de crescimento fúngico), com o intuito de verificar se as hifas estavam viáveis. Com o objetivo de comparação do crescimento micelial, foram realizadas retiradas de micélio fúngico (disco de 5 mm de diâmetro) de placas apresentando antagonismo, de três diferentes locais: no halo de inibição, na região mediana (próxima ao halo de inibição) e, para fins de comparação, do micélio longe da levedura (onde o micélio não está sofrendo a ação inibitória da levedura). Para os fungos *C. graminicola* e *C. sublineolum*, o tempo de incubação foi de 12 dias, e para o fungo *T. paradoxa* o tempo de incubação foi de 3 dias, período que cada fungo leva para crescer em toda a extensão da placa de Petri (9 cm diâmetro). O experimento foi realizado em triplicata e a avaliação constou da medida do diâmetro do crescimento micelial do fungo a cada 4 dias para os fungos *C. graminicola* e *C. sublineolum*, e a cada 24 horas para o fungo *T. paradoxa*.

4.8. Caracterização dos isolados de leveduras como promotores de crescimento vegetal

Com o objetivo de avaliar o potencial das leveduras avaliadas quanto à promoção direta e indireta de crescimento vegetal, foram realizados três testes, sendo eles, a capacidade dos isolados em produzir ácido indol-acético, solubilização de fosfatos insolúveis e solubilização de pó-de-rocha potássica.

4.8.1. Produção de ácido indol-acético (AIA)

As leveduras isoladas e estudadas quanto ao seu potencial como agente no controle biológico de fitopatógenos, foram avaliadas também quanto à sua capacidade de sintetizar *in vitro* ácido indol-acético (AIA). A técnica qualitativa utilizada foi baseada no trabalho de Bric et al. (1991). As leveduras foram cultivadas em placas de Petri, em três diferentes meios de cultura: BDA, TSA 10% (Tryptic Soy Ágar) e YEPD, todos suplementados com triptofano 5mM (100 µl/ml) e cobertas com uma membrana de nitrocelulose ou papel filtro. As placas foram incubadas durante 42 horas a 28°C. Após esse período, as membranas foram removidas, tratadas com 10 ml do reagente de Salkowski por 10 minutos. A presença de um halo rosa a violeta indicou a produção de AIA pelas leveduras.

4.8.2. Solubilização de fosfatos insolúveis

Para avaliar o potencial das leveduras analisadas quanto a solubilização de fosfatos insolúveis, foi utilizada a metodologia baseada no trabalho de Freitas et al. (1997). O meio de cultura utilizado foi BDA suplementado com 5 g/l de extrato de levedura. Separadamente, no momento de verter o meio nas placas, foi realizada a adição de uma solução composta de K₂HPO₄ 10% (50 ml/l) e CaCl₂ 10% (10 ml/l), ambas esterilizadas por filtração em membrana de porosidade 0,22 µm. As leveduras foram inoculadas na placa, que apresentou um meio com característica de opacidade. As culturas foram incubadas por 48 horas a 28°C. Após esse período foi observada a formação de um halo translúcido próximo à colônia da levedura, o qual indica que esta é capaz de solubilizar o fosfato insolúvel presente no meio.

4.8.3. Solubilização de rochas potássicas

Foi avaliada a capacidade da levedura *T. globosa* (1S112) em solubilizar pó-de-rocha e liberar potássio solúvel *in vitro*. O pó-de-rocha utilizado nos ensaios foi a ultramáfica alcalina proveniente de Lages, em Santa Catarina, Brasil. O percentual de potássio presente neste pó de rocha é de 2,73 %, conforme Sobral et al. (2006), apresentando granulometria entre 0,002 e 0,05 mm.

Para a produção do inóculo, tubos com meio líquido GYMP foram inoculados com uma alçada da levedura e incubados a 30°C e 160 rpm por 48 horas, até obtenção de 10^7 células/ml. Para a realização do ensaio, foram considerados os seguintes tratamentos: 1 – ultramáfica alcalina + meio; 2 - levedura + meio; e 3 – ultramáfica alcalina + levedura + meio. O ensaio foi realizado em frascos erlenmeyers de 500 ml contendo 200 ml de meio de cultura para solubilização, conforme trabalho de Vassileva et al. (2000), sendo adicionados à ele 0,8 g de pó de rocha autoclavado (nos tratamentos 1 e 3). O pH foi ajustado para 5,3 com HCl 0,1 N. Para o inóculo, 2,0 ml da suspensão de células 10^7 células/ml foram adicionados ao meio de cultura (tratamentos 2 e 3). O ensaio foi realizado em triplicata, a 30°C e 160 rpm por 15 dias, com amostragem a cada 3 dias.

Foram analisadas a concentração de potássio solúvel por fotometria de emissão de chama; o pH, em pH-metro digital; e a acidez titulável, por titulação das amostras até pH 7 com NaOH 0,05M.

4.9. Experimentos *in vivo*

4.9.1. Avaliação do controle biológico de *Colletotrichum sublineolum* em sorgo pela levedura *T. globosa* (1S112).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* de antagonismo, foram realizados experimentos em casa-de-vegetação pertencente à Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras/SP, para avaliação do potencial de uso das leveduras como agentes no controle dos fitopatógenos estudados.

Para a avaliação do controle de *C. sublineolum*, causador de antracnose em sorgo, pelo isolado *T. globosa* (1S112), foi utilizada a variedade de sorgo BR 009, susceptível a *C. graminicola*, cedida pela EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Após 30 dias da data do plantio foi realizada a inoculação de 10 ml da suspensão microbiana, nas concentrações de 10^5 esporos/ml do fungo *C. sublineolum* e de 10^8 células de levedura/ml. A inoculação foi realizada utilizando-se borrifadores diretamente nas folhas.

Os tratamentos constaram da testemunha (T1) sem nenhum tipo de inóculo, levedura aplicada junto com o fungo filamentososo (T2), levedura aplicada 24 horas após a inoculação do fungo filamentososo (T3), inoculação do fungo filamentososo (T4), levedura aplicada 24 horas antes do fungo filamentososo (T5) e o tratamento químico com fungicida sistêmico Metiltiofan (90g/100L), aplicado 2 dias antes da inoculação do fungo (T6).

Uma semana após a inoculação iniciou-se a avaliação da severidade da doença sendo atribuídas notas de 0 a 10 indicando de 0 = ausência de lesões foliares até 10 = lesões em 100% da superfície foliar (ver Figura 35). Essas avaliações foram realizadas durante 6 semanas, quando as plantas foram coletadas para avaliação de altura e massa seca da parte aérea.

Para avaliação de altura, as plantas foram colhidas cortando a planta na altura da sua base (logo acima do solo) e colocando-a em horizontal uma superfície plana. Foi realizada a medida utilizando-se uma trena comum. A massa seca da parte aérea foi avaliada utilizando as mesmas plantas colhidas para a análise de altura. As plantas foram colocadas em sacos de papel e secas a 150°C para secagem, até peso constante. Após esse período a massa foi aferida em balança semi-analítica.

4.9.2. Avaliação do controle do desenvolvimento de *Thielaviopsis paradoxa* em toletes de cana-de-açúcar pela levedura *T. globosa* (1S112)

Para avaliação do controle do fungo *T. paradoxa* em toletes de cana-de-açúcar pela levedura antagonista *T. globosa* (linhagem 1S112), foram utilizados toletes de cana-de-açúcar da variedade RB867515, a mesma da qual foi realizado o isolamento da levedura antagonista. Os toletes empregados apresentavam 3 gemas (aproximadamente 50 cm); estes foram lavados para retirada da sujeira aparente, e em seguida imersos em solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 30 minutos. Após esse período, os toletes foram lavados várias vezes em água destilada estéril para retirada do excesso de cloro, e colocados para secar ao ar por 3 horas.

Os tratamentos empregados foram toletes não inoculados (T1), toletes inoculados com o fungo patogênico (T2), toletes inoculados com a levedura antagonista (T3) e toletes inoculados com o fungo fitopatogênico e a levedura juntos (T4). Foram utilizados cinco toletes para cada tratamento.

Para a inoculação da levedura foram preparados 6 litros de suspensão com 10^8 células/ml, nas quais foram mergulhados os toletes e ali deixados por 3 horas. A inoculação do fungo foi realizada aplicando-se 2 ml de uma suspensão de 10^5 esporos/ml nas extremidades do tolete, com a ajuda de uma pipeta, de forma lenta, até que o tolete absorvesse a suspensão com os esporos.

Após a inoculação da levedura e/ou fungo nos toletes, estes foram colocados em sacos plásticos pretos, juntamente com um chumaço de algodão embebido de água destilada esterilizada. Os sacos foram fechados com barbante e incubados a temperatura de 28°C por 30 dias. A análise constou do corte longitudinal do tolete e medida da infecção causada pelo fungo no interior dos vasos condutores do tolete. O cálculo de porcentagem de controle foi realizado através da medida de tecido afetado pelo fungo, em centímetros, em relação à medida total de tecido vegetal inoculado, também em centímetros.

4.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando o software STATÍSTICA versão 6.0, sendo que os resultados estão tabulados nos Anexos III, IV, V, VI e VII.

Para a análise dos dados obtidos no experimento *in vivo* da avaliação do controle de *C. sublineolum* em plantas de sorgo (item 4.9.1), foi utilizado o modelo GLM (*General Lineal Model*) seguido da análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o software SAS (*Statistical Analysis System*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de leveduras

Foram isoladas 317 leveduras da cana-de-açúcar e milho, sendo que 16 foram obtidas da rizosfera, 78 do colmo e 223 das folhas. Dentre os isolamentos da rizosfera, a amostra retirada do milho forneceu o maior número de leveduras, o mesmo ocorrendo para o colmo; das folhas de cana-de-açúcar, porém, foi isolado o maior número de leveduras dentre todas as amostras. No geral, a melhor fonte de leveduras foi a folha, seguida do colmo e por último a rizosfera (Quadro 1 e Figura 1).

Este resultado sugere que no solo a população de leveduras é menor em relação à outros grupos microbianos, principalmente bactérias e fungos filamentosos, fato já descrito na literatura (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006). As superfícies de plantas e frutos são consideradas os ambientes mais propícios para o desenvolvimento de leveduras, devido a maior concentração de açúcares (FIALHO, 2004), permitindo que se desenvolvam de forma rápida, utilizando-se de todos os nutrientes e espaço (SHARMA et al., 2009).

O resultado apresentado neste trabalho é semelhante ao que foi encontrado por Azeredo et al. (1998), os quais isolaram leveduras de plantas de cana-de-açúcar, sendo 103 linhagens da folha, 73 do colmo e 54 da rizosfera. Apesar dos autores apresentarem uma proporção de isolados similar a este trabalho, eles conseguiram maior número de isolados do solo da rizosfera, quando comparado com os resultados aqui observados. O uso de diferentes meios de cultura e antibióticos pode interferir no número de indivíduos e espécies isoladas,

além das características químicas e físicas da amostra analisada, o que pode explicar os resultados distintos quanto ao isolamento.

Quadro 1. Dados dos isolamentos de leveduras da cana-de-açúcar e milho.

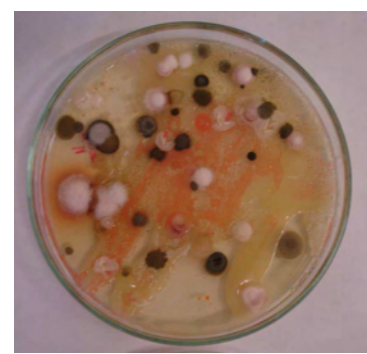
Isolamento	Total de isolados	Locais de isolamento
1º isolamento cana-de-açúcar	46	3 isolados da rizosfera 11 isolados do colmo 32 isolados da folha
2º isolamento cana-de-açúcar	139	4 isolados da rizosfera 27 isolados do colmo 108 isolados da folha
3º isolamento milho	132	9 isolados da rizosfera 40 isolados do colmo 83 isolados da folha



Rizosfera (10^{-2})



Colmo (10^{-2})



Folha (10^{-2})

Figura 1. Aspecto das placas do segundo isolamento de microrganismos de cana-de-açúcar, onde podem ser observados os diferentes grupos microbianos, a partir da rizosfera, colmo e folha (valor entre parênteses refere-se à diluição da amostra).

O isolamento de microrganismos do ambiente tem sido empregado por muitos pesquisadores com o objetivo de encontrar espécies antagonistas à bactérias e fungos filamentosos. Leveduras antagonistas foram isoladas por McCormack et al. (1994) do filoplano de trigo e maçã, sendo obtidas espécies capazes de produzir compostos antibacterianos que controlaram o desenvolvimento de *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*. Chand-Goyal e Spotts (1996) isolaram leveduras saprófitas dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* da superfície de pêras e avaliaram sua capacidade de controlar os fungos causadores de podridão, *Monilinia fructicola* e *Penicillium expansum*.

Bagas de uvas e solo de rizosfera de videiras foram as fontes para o isolamento de microrganismos para o controle de *B. cinerea* por Rabosto et al. (2006), que detectaram um isolado do gênero *Bacillus* com grande potencial antagônico. Blevé et al. (2006) isolaram leveduras epífitas da superfície de bagas de uvas com o intuito de avaliar os isolados contra os fungos filamentosos *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*; os autores observaram que seis isolados pertencentes à cinco espécies foram capazes de controlar os fungos patogênicos, indicando que a microbiota natural das uvas é uma fonte de potenciais antagonistas.

Os dados obtidos neste trabalho aliados aos estudos realizados por outros autores supra citados, como poderá ser visto em seguida, confirmam a idéia de que o ambiente, natural e/ou agrícola, é a uma excelente fonte de microrganismos com potencial antagônico para aplicação no controle biológico de agentes causadores de patologias.

5.2. Avaliação das leveduras isoladas quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos

Todas as leveduras isoladas foram testadas quanto à capacidade antagônica aos fungos fitopatogênicos *C. graminicola*, *C. sublineolum* e *T. paradoxa*, cujos resultados podem ser observados na Tabela 1. Utilizou-se uma escala de antagonismo, de acordo com o grau de ação da levedura e comportamento do fungo (Figura 2).

Na Tabela 1 estão relacionados os isolados que apresentaram algum tipo de inibição do desenvolvimento micelial de algum dos fungos fitopatogênicos. Do total de leveduras avaliadas (317), somente 9 (2,84 %) apresentaram resultados indicativos de antagonismo (1S110, 1S111, 1S112, 2S01, 2S02, 2S03, 2S04, 2F32 e 2F58). Estas leveduras (destacadas na Tabela 1 em negrito e grifadas) foram selecionadas para identificação e avaliação como potenciais agentes de controle biológico.

Todos os isolados selecionados foram obtidos de cana-de-açúcar, sendo 3 da rizosfera do primeiro isolamento, 4 também da rizosfera do segundo isolamento, e 2 da superfície da folha no segundo isolamento. Este resultado indica que, apesar da folha ser a maior fonte de leveduras, o solo apresentou-se como o habitat do maior número de antagonistas.

Tabela 1. Avaliação dos isolados de leveduras no controle do crescimento dos fungos fitopatogênicos *C. graminicola*, *C. sublineolum* e *T. paradoxa*.

Isolados	Fungos fitopatogênicos		
	<i>C. graminicola</i>	<i>C. sublineolum</i>	<i>T. paradoxa</i>
1C94	+/-	+/-	0
1C107	+	+	0
1C117	+	+	0
1F100	+/-	+/-	0
1F102	+/-	+/-	0
1F121	+/-	+/-	0
1F91	+/-	+/-	0
1F99	+/-	+/-	0
<u>1S110</u>	++	++	+
<u>1S111</u>	++	++	+
<u>1S112</u>	++	++	+
2C124	+/-	+/-	0
2C125	+/-	+/-	0
2F27	+/-	+/-	0
<u>2F32</u>	+	+	+/-
<u>2F58</u>	++	++	+
<u>2S01</u>	++	++	+
<u>2S02</u>	++	++	+/-
<u>2S03</u>	++	++	+/-
<u>2S04</u>	++	++	+
3C108	+/-	+/-	0
3C66	+/-	+/-	0
3C67	+/-	+/-	0
3C81	+/-	+/-	0
3C82	+/-	+/-	0
3C84	+/-	+/-	0
3F133	+/-	+/-	0
3F154	+/-	+/-	0
3F155	+/-	+/-	0
3F157	+/-	+/-	0
3F173	+/-	+/-	0
3F174	+/-	+/-	0
3F175	+/-	+/-	0
3F25	+/-	+/-	0
3S49	+/-	+/-	0

Os sinais (0, +, ++, +/-) referem-se à escala de antagonismo, conforme Figura 2.

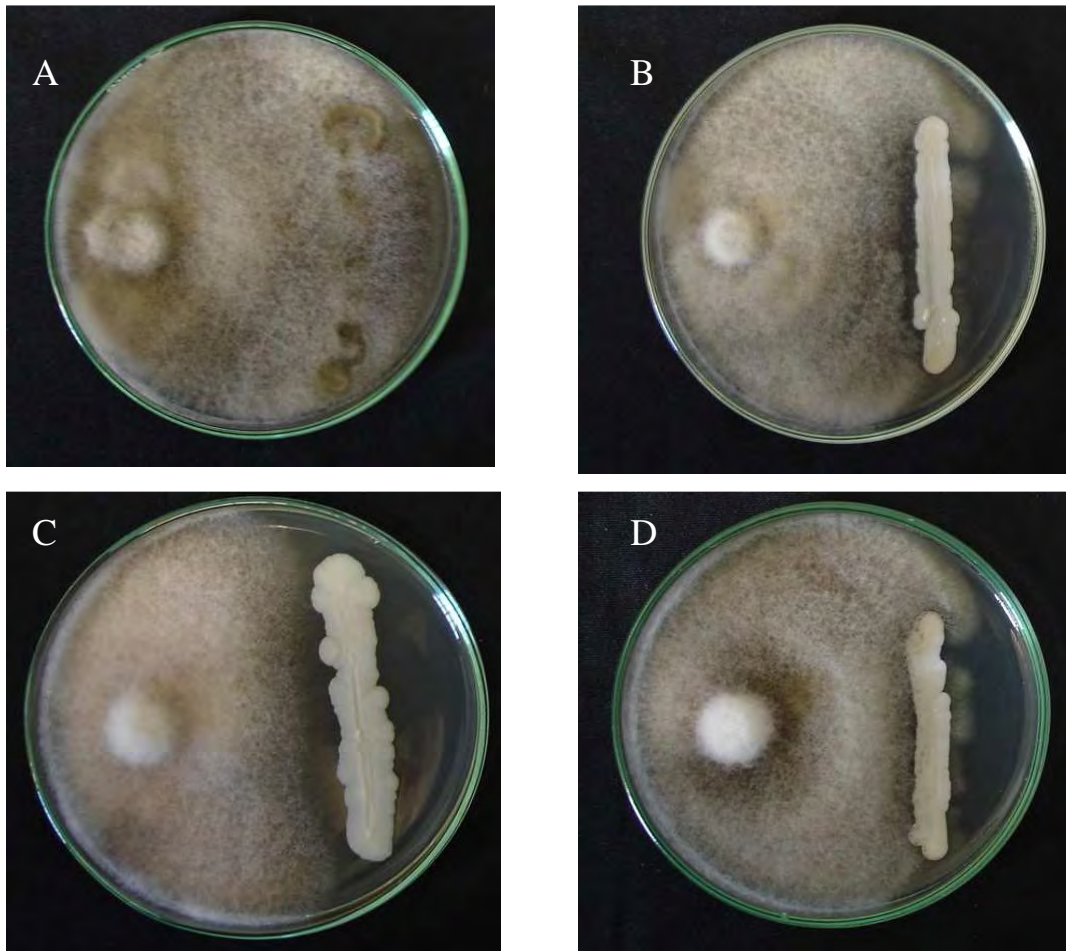


Figura 2. Escala de antagonismo da levedura contra o fungo filamentos, em meio BDA. A- sem nenhum controle, o fungo cresce por cima da levedura (0); B- o fungo filamentos cresce até o limite da colônia da levedura, mas não por cima desta (+); C – há a formação do halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação (++); D – há o retardo no desenvolvimento micelial, mas no fim do período de incubação o fungo filamentos se desenvolve por cima da levedura (+/-).

Isto pode estar relacionado ao fato do solo ser um ambiente extremamente complexo e com alta biodiversidade microbiana, sendo que somente os microrganismos que apresentam mecanismos antagônicos de defesa e competição conseguem se adaptar e sobreviver neste ecossistema.

O baixo número de leveduras antagonistas obtidas nos isolamentos é comum, fato também descrito por muitos pesquisadores. Bleve et al. (2006) isolaram 144 leveduras de uvas e obtiveram resultados favoráveis no controle dos fungos *A. carbonarius* e *A. niger* com apenas 6 isolados. Chanchaichaovivat et al. (2007) isolaram 225 leveduras da superfície de frutas e vegetais e apenas 4 isolados apresentaram bons resultados de controle do fungo *Colletotrichum capsici* em pimenta. Cabral et al. (2009) avaliaram 155 isolados de leveduras

de diferentes solos (Floresta Amazônica, Mata Atlântica e solos orgânicos), sendo 15 isolados micocinogênicos (com atividade *killer*), dos quais apenas 2 apresentaram comportamento antagônico ao fungo *Moniliophthora perniciosa*. Wang et al. (2009) isolaram leveduras epífitas (463 isolados) da superfície de folhas e flores de várias espécies de plantas de diferentes locais da China, selecionando apenas 8 com comportamento antagônico à bactéria *Acidovorax avenae*, causadora de mancha aquosa em melão.

5.3. Identificação das leveduras

Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, a identificação de microrganismos pode ser realizada de forma rápida e mais eficiente, sem a necessidade de uso dos métodos clássicos que utilizam padrões de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, além de testes fisiológicos e morfológicos, os quais são laboriosos, demorados e muitas vezes não conclusivos. A identificação de leveduras através do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal tem-se apresentado como uma tecnologia muito aplicada e eficiente (WHITE et al. 1994; DROBY et al., 1999; CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2007). O DNA ribossomal apresenta regiões conservadas e repetitivas de aproximadamente 11 kb, dentro das quais está localizada a região ITS, composta pelas seqüências ITS1 e ITS2, incluindo a região denominada 5,8S (Figura 3).

Os isolados selecionados nos testes iniciais de antagonismo foram submetidos à extração do DNA genômico, seguido de PCR da região ITS do rDNA, purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados. Na Figura 4 é apresentado o gel de agarose com o produto de PCR das linhagens de leveduras, utilizando-se os *primers* ITS-1 e ITS-4.

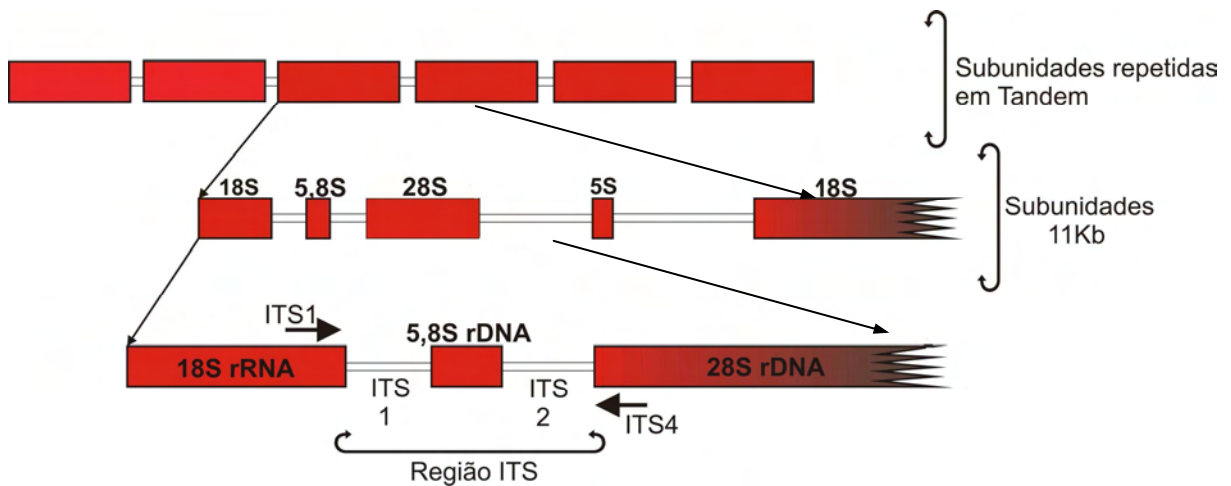


Figura 3. Esquema do DNA ribossomal de eucariontes, apresentando em detalhes a região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e localização dos *primers* (ITS1 e ITS4) utilizados para a identificação das leveduras (baseado em esquema encontrado em www.phytid.org/Images/rna.jpg).

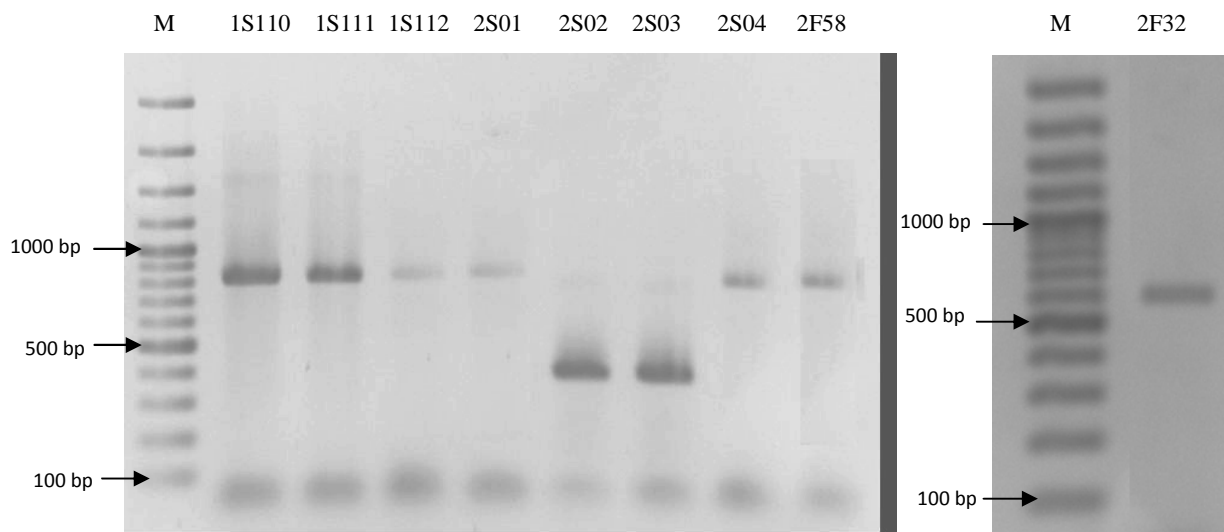


Figura 4. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR das linhagens de leveduras selecionadas. M – marcador de peso molecular 100 bp.

Os resultados mostraram que as linhagens 1S110, 1S111, 1S112, 2S01, 2S04, 2F58 apresentaram região ITS do rDNA por volta de 850 bp; 2S02 e 2S03 aproximadamente 400 bp, e a linhagem 2F32, ao redor de 600 bp. A partir dos amplicons foi realizado o sequenciamento, demonstrando que os isolados 1S110, 1S111, 1S112, 2S01, 2S04 e 2F58 pertencem à espécie *Torulaspota globosa*, os isolados 2S02 e 2S04 à espécie *Candida intermedia*, e o isolado 2F32 à espécie *Rhodotorula mucilaginosa*.

A identificação de leveduras através da amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA é empregada em diversos estudos. Droby et al. (1999) realizaram o isolamento de leveduras da superfície de uvas e estas foram identificadas através da amplificação da região ITS e sequenciamento dos amplicons resultantes. Para comprovar a identidade da levedura *Pichia membranifaciens*, Masih et al (2001) utilizaram a amplificação completa da região ITS do rDNA e o sequenciamento deste fragmento, sendo a seqüência comparada à outras do banco de dados GenBank. Blevé et al. (2006) realizaram o isolamento de leveduras da superfície de uvas e utilizaram a análise de polimorfismos da região ITS através da digestão dos amplicons por enzimas de restrição para agrupar os isolados, seguindo-se o sequenciamento desta região.

Os isolados 1S110, 1S111 e 1S112 (isolados da rizosfera no 1º isolamento) provavelmente constituem uma mesma linhagem devido ao fato de terem sido isolados da mesma amostra, o mesmo ocorrendo para os isolados 2S01 e 2S04 (rizosfera no 2º isolamento), sendo que o isolado 2F58 foi obtido no 2º isolamento, das folhas de cana-de-açúcar. O fato, porém, da mesma espécie ter sido isolada em diferentes épocas (1º e 2º isolamento) e de diferentes locais (rizosfera e folha da cana-de-açúcar) pode sugerir que *T. globosa* é freqüente no ambiente. Estudos mais aprofundados de ecologia, porém, devem ser realizados para confirmação desta observação.

Como o resultado do seqüenciamento apresentou os isolados 1S110, 1S111, 1S112, 2S01, 2S04 e 2F58 como pertencentes à mesma espécie (*T. globosa*), foi utilizada a técnica de *fingerprinting* ISSR, que emprega um marcador molecular de microssatélite para distinguir diferentes linhagens dentro da mesma espécie, através de padrões de bandas de DNA, resultantes da amplificação de regiões repetitivas no genoma. Neste trabalho foi utilizado o primer GTG₅, de acordo com Silva-Filho et al. (2005), cujos resultados podem ser observados na Figura 5.

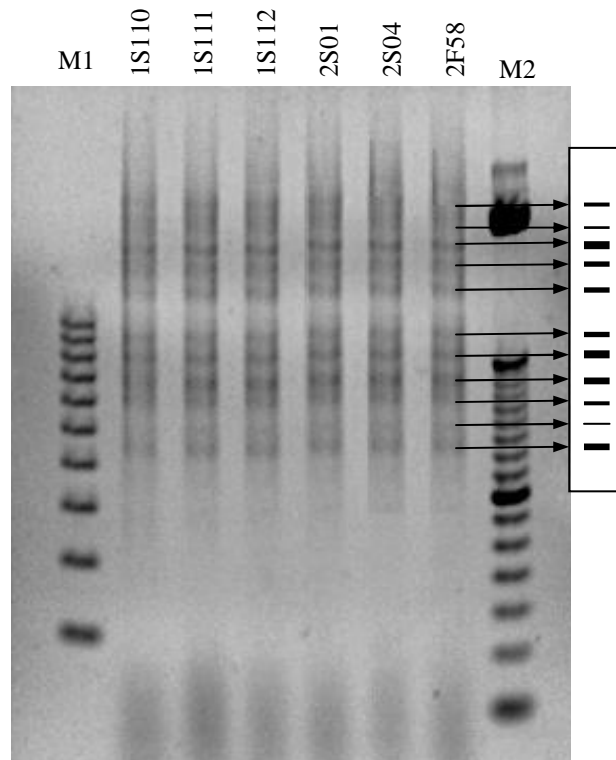


Figura 5. Gel de agarose (1,3%) dos produtos de PCR utilizando ISSR com *primer* GTG₅ das linhagens pertencentes à espécie *T. globosa*. (M1) – marcador de peso molecular 100 bp, (M2) – marcador de peso molecular 1Kb. O esquema à direita é uma representação gráfica das bandas de DNA.

Os resultados do ISSR mostraram que as linhagens pertencentes à espécie *T. globosa* apresentam o mesmo perfil de bandas, ou seja, similaridade genética. Desta forma, foi utilizada somente uma linhagem para os testes posteriores, a de código 1S112. Além desta, outras duas leveduras foram também selecionadas, a 2F32 (*Rh. mucilaginosa*) e a 2S02 (*C. intermedia*), pelos resultados apresentados nos testes de antagonismo.

Na Figura 6 é apresentado um dendrograma que ilustra o grau de similaridade genética dos isolados de leveduras identificados a outras espécies e gêneros. É possível observar que a linhagem 1S112 apresenta grande similaridade com a linhagem de *T. globosa*; o isolado 2S02 com *C. intermedia*, e o isolado 2F32 com *Rh. mucilaginosa*. No Anexo II pode-se consultar as seqüências obtidas dos três isolados, os relatórios e os resultados do alinhamento com a linhagem que apresentou maior porcentagem de identidade dentro do banco de dados do GenBank (BLAST/NCBI).

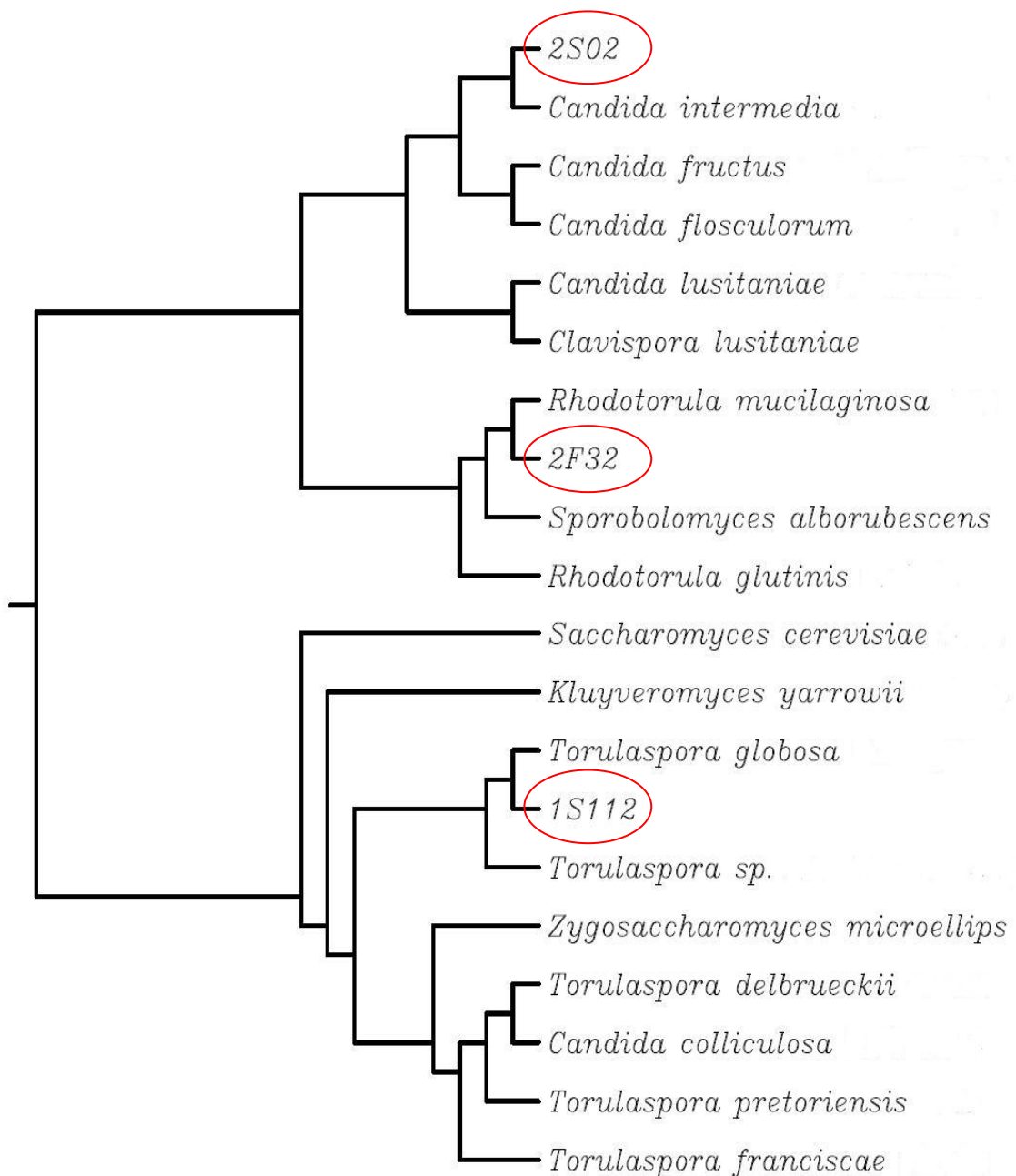


Figura 6. Dendrograma apresentando o grau de similaridade genética (*Neighbor Joining tree*) dos isolados de leveduras selecionados (destacados em vermelho), com outras espécies e gêneros constantes do banco de dados do GenBank, com base nas seqüências de nucleotídeos da região ITS do rDNA, utilizando o alinhamento múltiplo de seqüências Clustal W (<http://align.genome.jp> – Kyoto University Bioinformatics Center).

As características morfológicas das leveduras selecionadas como potenciais agentes no controle de fitopatógenos estão apresentadas na Figura 7 e 8.

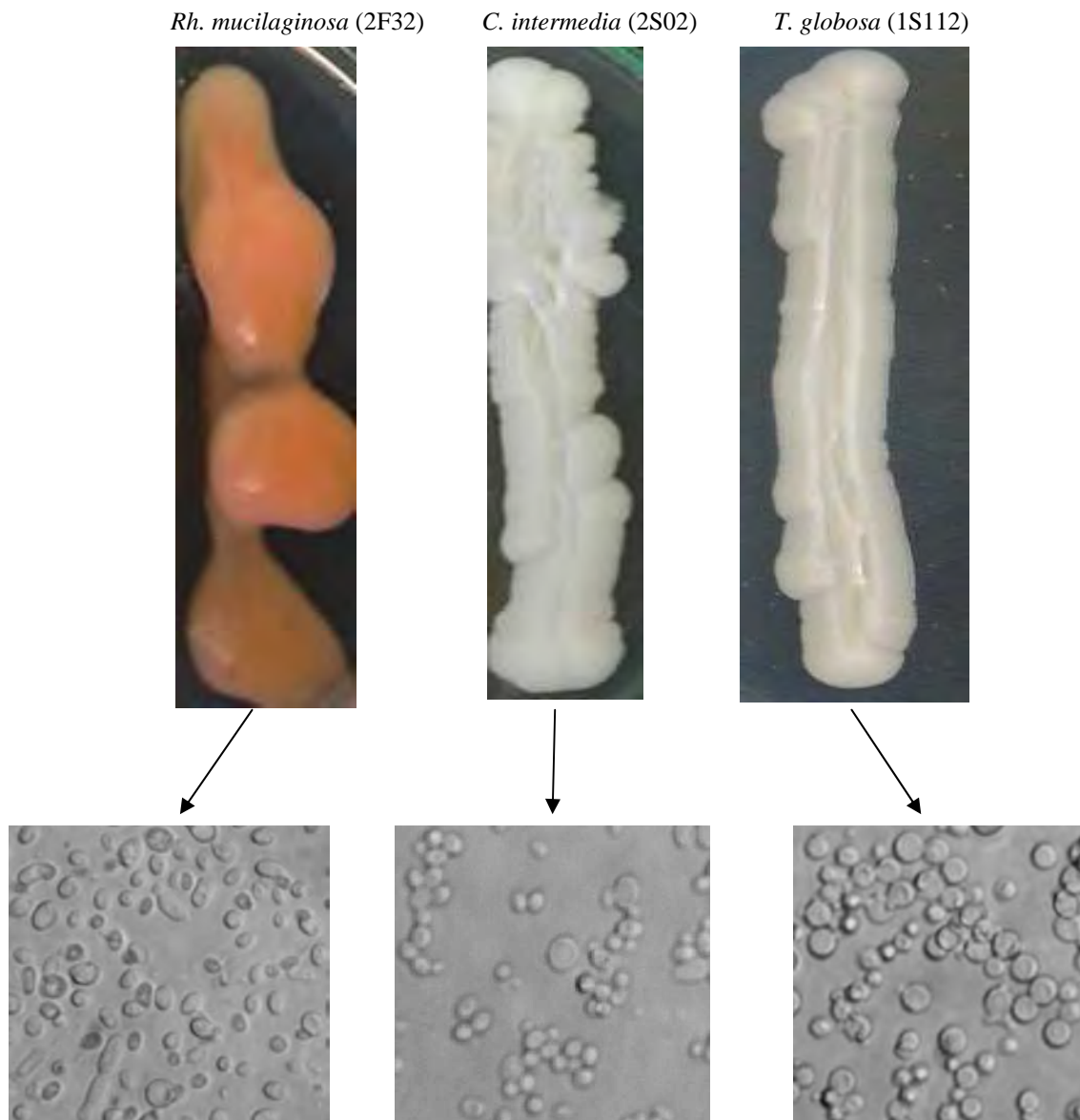


Figura 7. Aspecto das colônias (acima) em meio YM e das células (abaixo) dos isolados de leveduras selecionados como antagonistas (aumento de 400 X, para as fotos das células).

Segundo Barnett et al. (1990), a levedura *Rh. mucilaginoso* (sub-divisão Basidiomycota) é encontrada no ar, solo, lagos, oceanos e produtos lácteos, podendo colonizar plantas, seres humanos e outros mamíferos. As colônias apresentam-se cremosas ou pigmentadas (róseas ou avermelhadas), mucosas, sem reprodução sexuada e capacidade fermentativa. A espécie *C. intermedia* (sub-divisão Ascomycota) já foi isolada de solo, uvas, cerveja e de seres humanos, e se caracteriza pela presença de pseudohifas e ausência de reprodução sexuada. Apresenta perfil fermentativo e pertence a um gênero muito diversificado e numeroso em termos de espécie. A levedura *T. globosa* é também

representante da sub-divisão Ascomycota, apresenta ascos persistentes, com 1 ou 2 esporos redondos e tubo de conjugação, conforme Figura 8. Apresenta perfil fermentativo, tendo sido isolada de solo de vários países.

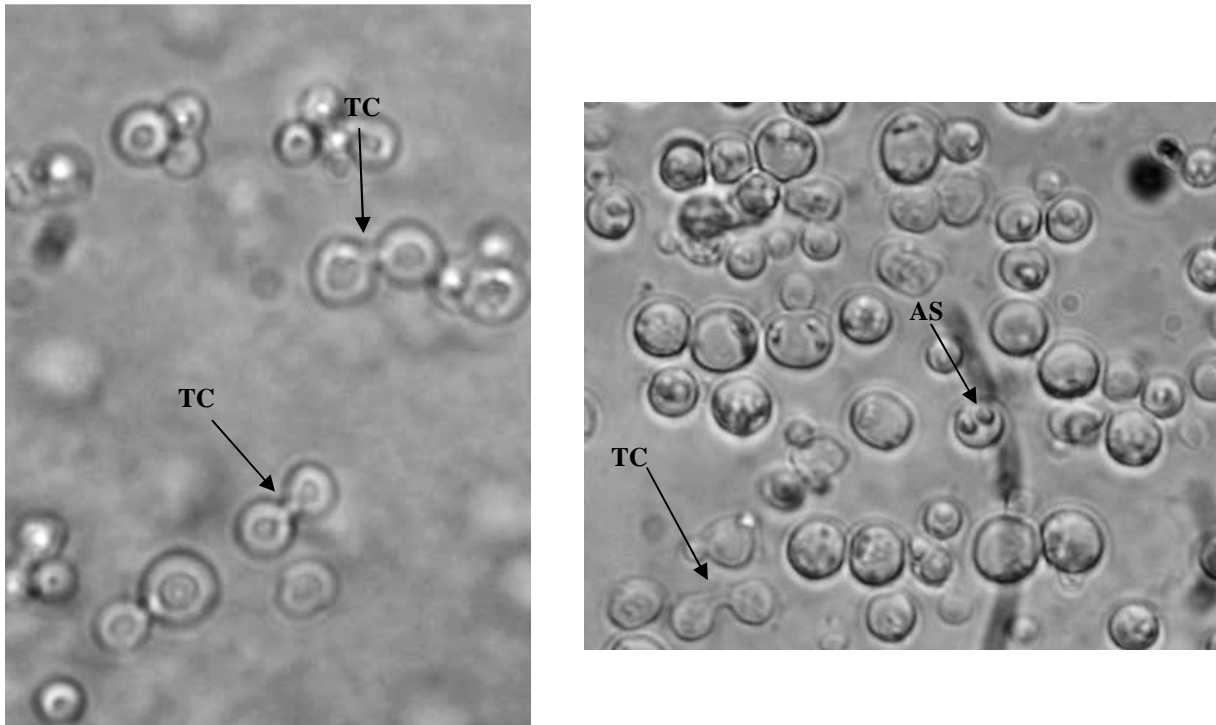


Figura 8. Características da levedura *T. globosa* (1S112) em meio YM. Legenda: TC – tubo de conjugação; AS – asco com dois ascósporos.

5.4. Avaliação do antagonismo *in vitro* em meios de cultura sólidos

Os resultados das análises estatísticas encontram-se no anexo III.

5.4.1. Efeito de diferentes meios de cultura no antagonismo *in vitro*

O principal objetivo deste trabalho foi a análise das leveduras isoladas quanto ao potencial emprego no controle biológico de fitopatógenos. A avaliação do antagonismo *in vitro* consistiu na primeira etapa do processo, que teve por finalidade detectar o controle e quantificá-lo, para, a partir disso, considerar possíveis causas e fatores envolvidos.

Durante a seleção, as leveduras foram avaliadas, e os isolados que apresentaram resultado positivo no controle foram escolhidos para a próxima fase, que investigou alguns

fatores que podem interferir no antagonismo da levedura contra o fungo filamentoso. Inicialmente verificou-se a ação de diferentes meios de cultura na inibição, sendo utilizados os meios BDA, YEPD, extrato de folha de cana, extrato de folha de milho e meio com solo.

Os resultados indicaram que para o fungo *C. sublineolum*, os isolados de leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32) foram capazes de controlá-lo de forma significativa, sendo que *T. globosa* foi a que apresentou melhor resultado no controle, diferindo significativamente dos outros isolados. Dentre os meios de cultura avaliados, BDA e extrato de folha de milho proporcionaram as maiores taxas de inibição, seguidos dos meios extrato de folha de cana e meio com solo. O meio YEPD apresentou as menores taxas de inibição, sendo que neste não houve crescimento satisfatório do fungo filamentoso mesmo em cultura pura, sem a presença da levedura.

Para o fungo *C. graminicola*, as leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32) foram igualmente capazes de inibir o crescimento micelial. Dentre os meios de cultura utilizados o meio extrato de folha de milho apresentou os melhores resultados de na inibição do desenvolvimento fúngico (Figura 10). Os meios de cultura BDA, meio com solo e extrato de folha de cana não diferiram entre si. Também neste caso, o fungo filamentoso não foi capaz de se desenvolver plenamente no meio YEPD, mesmo na placa controle, sem a levedura.

O fungo *T. paradoxa*, por sua vez, foi controlado de forma significativa pelos isolados de leveduras, sendo que o melhor controle foi obtido pela levedura *T. globosa* (1S112), seguido pela *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32). Os meios de cultura utilizados apresentaram diferenças, sendo que o meio extrato de solo apresentou melhores resultados no controle, não diferindo significativamente dos meios BDA e YEPD, porém foram superiores aos meios de cultura extrato de cana e extrato de milho (Figura 11).

Diferentes meios de cultura fornecem variadas fontes nutricionais, e através de suas características químicas e físicas, podem indicar o ambiente favorável de ação da levedura no controle biológico. Meios derivados de extratos foliares foram utilizados devido ao fato de a superfície das folhas ser o ambiente de origem do isolado *Rh. mucilaginosa* (2F32) e dos fungos fitopatogênicos *C. sublineolum* e *C. graminicola*. Com o mesmo objetivo foi utilizado o meio de cultura extrato de solo, sendo que da rizosfera da cana-de-açúcar foram isoladas as leveduras *T. globosa* (1S112) e *C. intermedia* (2S02), além do fungo fitopatogênico *T. paradoxa*.

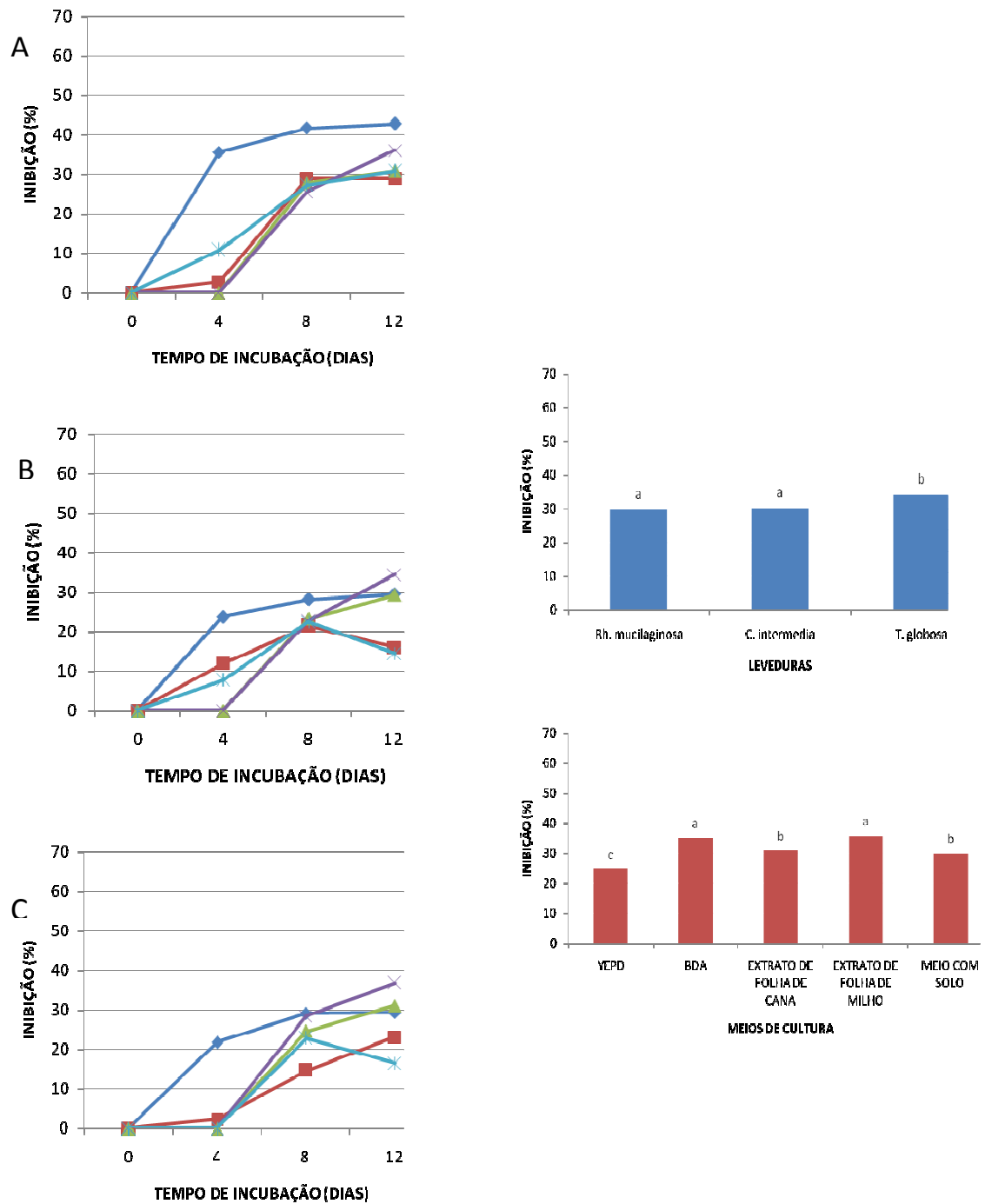


Figura 9. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. sublineolium* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes meios de cultura, (—♦— BDA, —■— YEPD, —▲— Extrato de folha de cana, —×— Extrato de folha de milho, —*— Meio com solo), a 25°C, pH 6. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

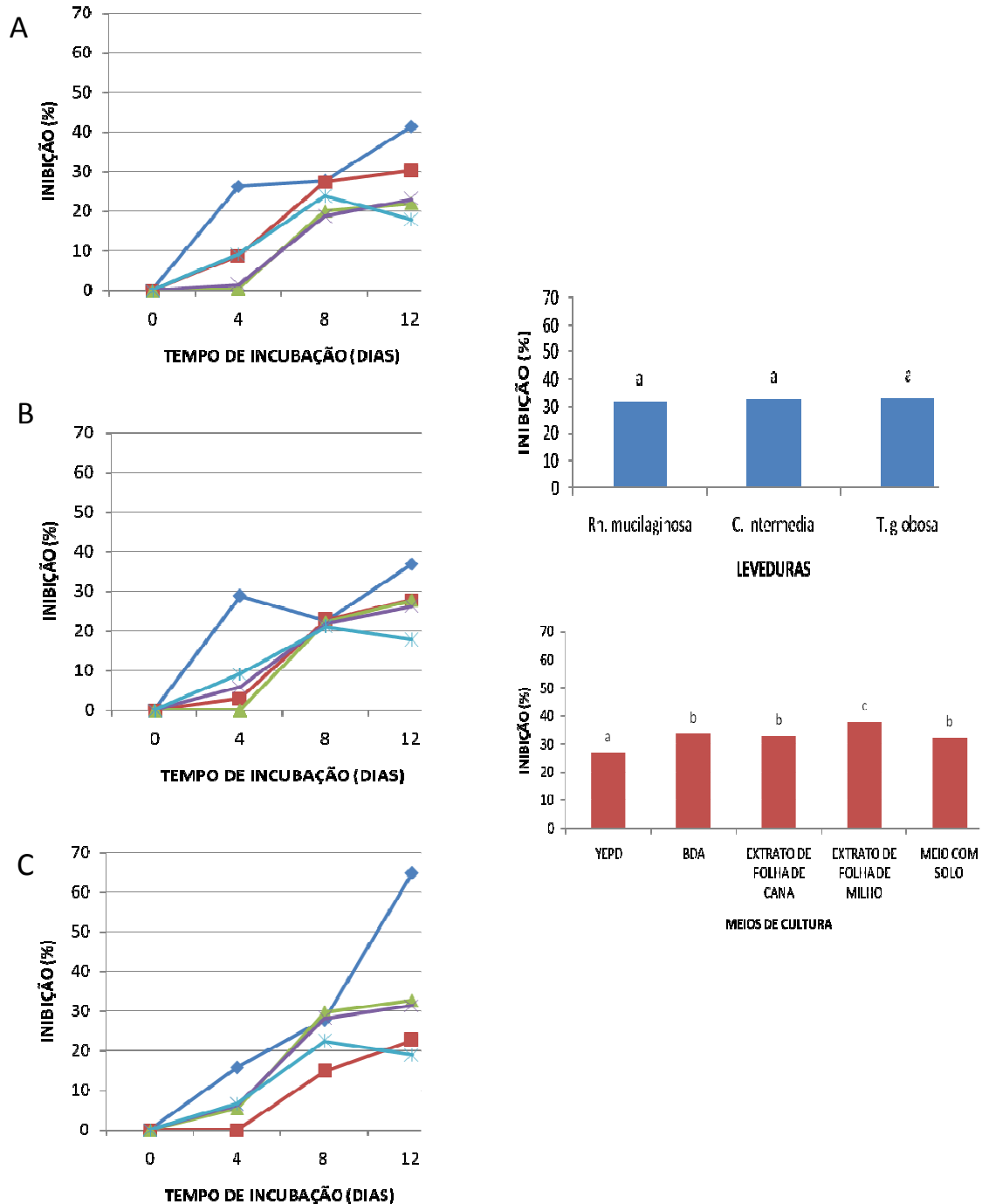


Figura 10. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. graminicola* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes meios de cultura, (—♦— BDA, —■— YEPD, —▲— Extrato de folha de cana, —×— Extrato de folha de milho, —*— Meio com solo), a 25°C, pH 6. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

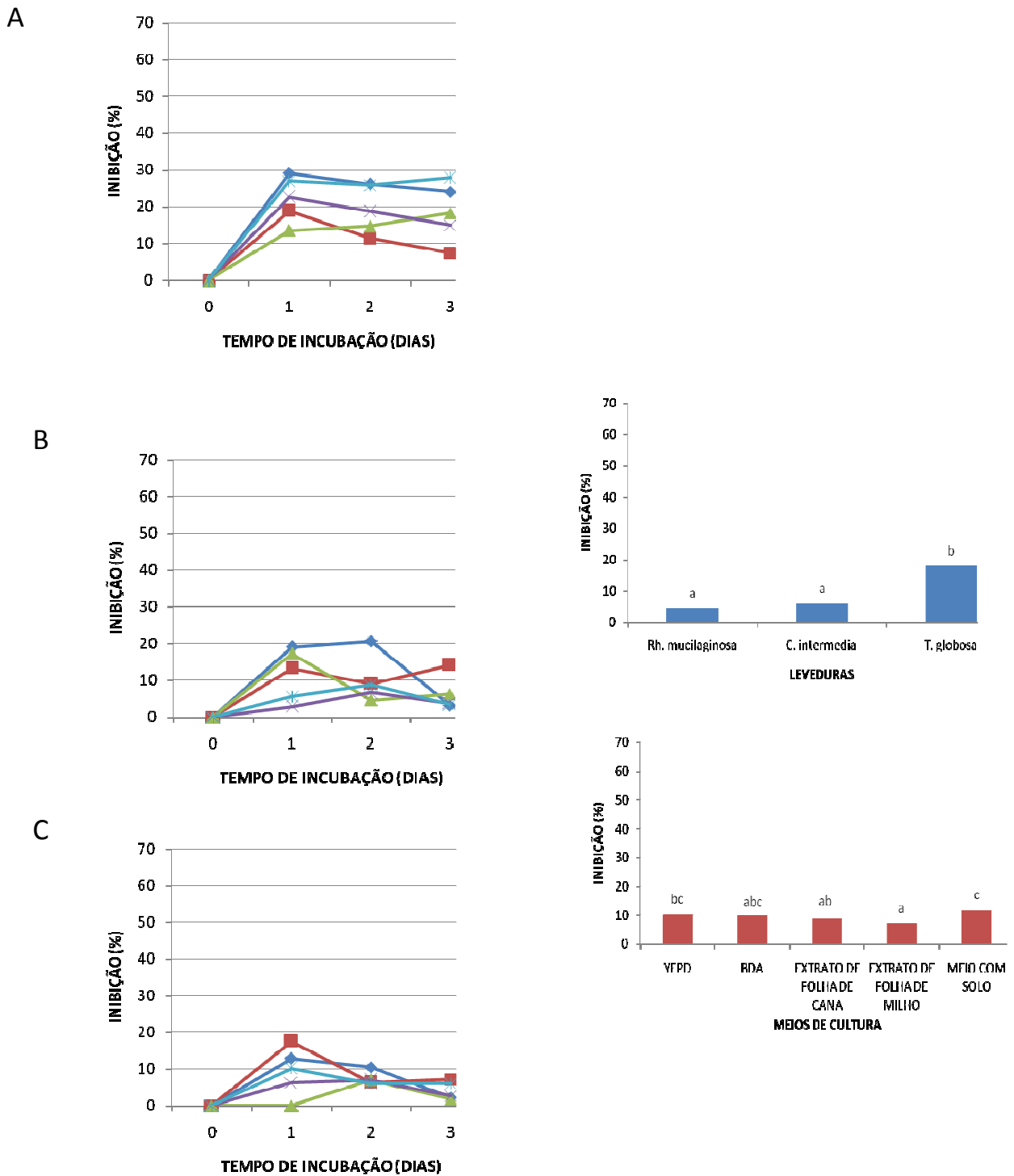


Figura 11. Inibição do crescimento micelial do fungo *T. paradoxa* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes meios de cultura, (—♦— BDA, —■— YEPD, —▲— Extrato de folha de cana, —×— Extrato de folha de milho, —*— Meio com solo), a 25°C, pH 6. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

Helbig (2002) avaliando a habilidade da levedura *Cryptococcus albidus* em controlar *Botrytis cinerea* em morango, utilizou meio de cultura constituído da polpa da fruta e água destilada. Reyes et al. (2004) estudaram a ação de leveduras isoladas da superfície de abacaxi no controle de *T. paradoxa* (linhagem causadora de podridão em abacaxi) e para isso utilizaram meio de cultura a partir do suco da fruta e água destilada. Suco de pimenta foi o meio de cultura utilizado para a avaliação do controle biológico de *Colletotrichum capsici*, causador de antracnose em pimenta, pela levedura *P. guilliermondii* (CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2008).

Apesar dos testes realizados com os extratos foliares e de solo, o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) foi, no geral, o que apresentou melhores resultados no desenvolvimento, tanto das leveduras como dos fungos filamentosos; este meio de cultura é utilizado como padrão para isolamento, cultivo e manutenção de fungos, tendo sido utilizado em diversos trabalhos (CALVO et al., 2003; ZHANG et al., 2004; CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2007, 2008; LASSOIS et al., 2008). O meio de cultura YEPD, considerado um meio completo para o cultivo de leveduras, não apresentou resultados satisfatórios no desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos. Não foi encontrado na literatura referências sobre o uso deste meio no cultivo de fungos filamentosos, sendo que provavelmente, o excesso ou a falta de algum nutriente pode ter causado este resultado.

5.4.2. Efeito de diferentes valores de pH no antagonismo *in vitro*

Outro fator avaliado quanto à sua influência no antagonismo dos isolados de levedura aos fungos fitopatogênicos foi o pH do meio de cultivo. O comportamento da levedura e a ação de diferentes compostos, potencialmente produzidos pelas leveduras no controle, podem sofrer a influência deste fator. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 12, 13 e 14.

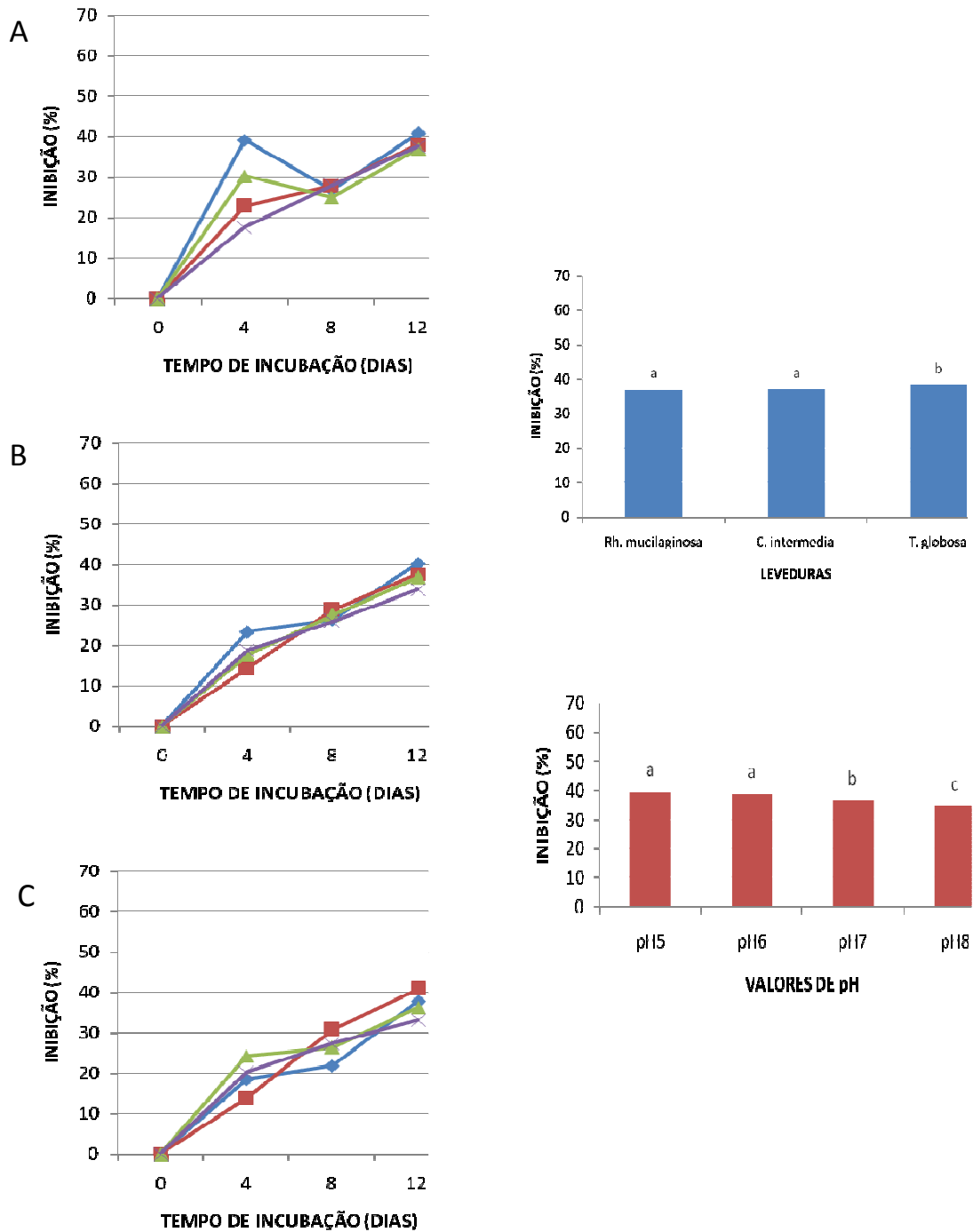


Figura 12. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. sublineolum* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (—♦— pH 5, —■— pH 6, —▲— pH 7, —×— pH 8), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

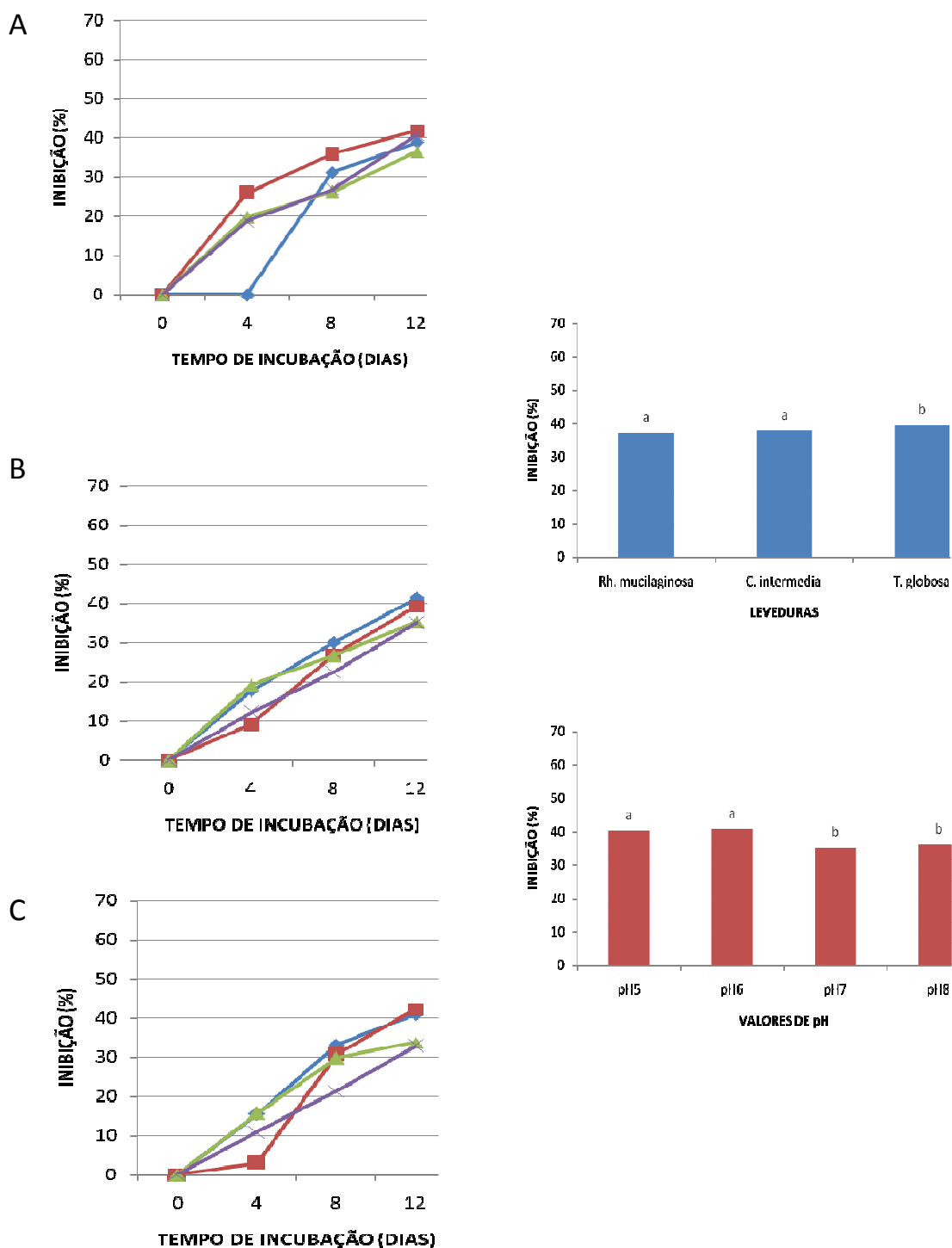


Figura 13. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. graminicola* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (—♦— pH 5, —■— pH 6, —▲— pH 7, —×— pH 8), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

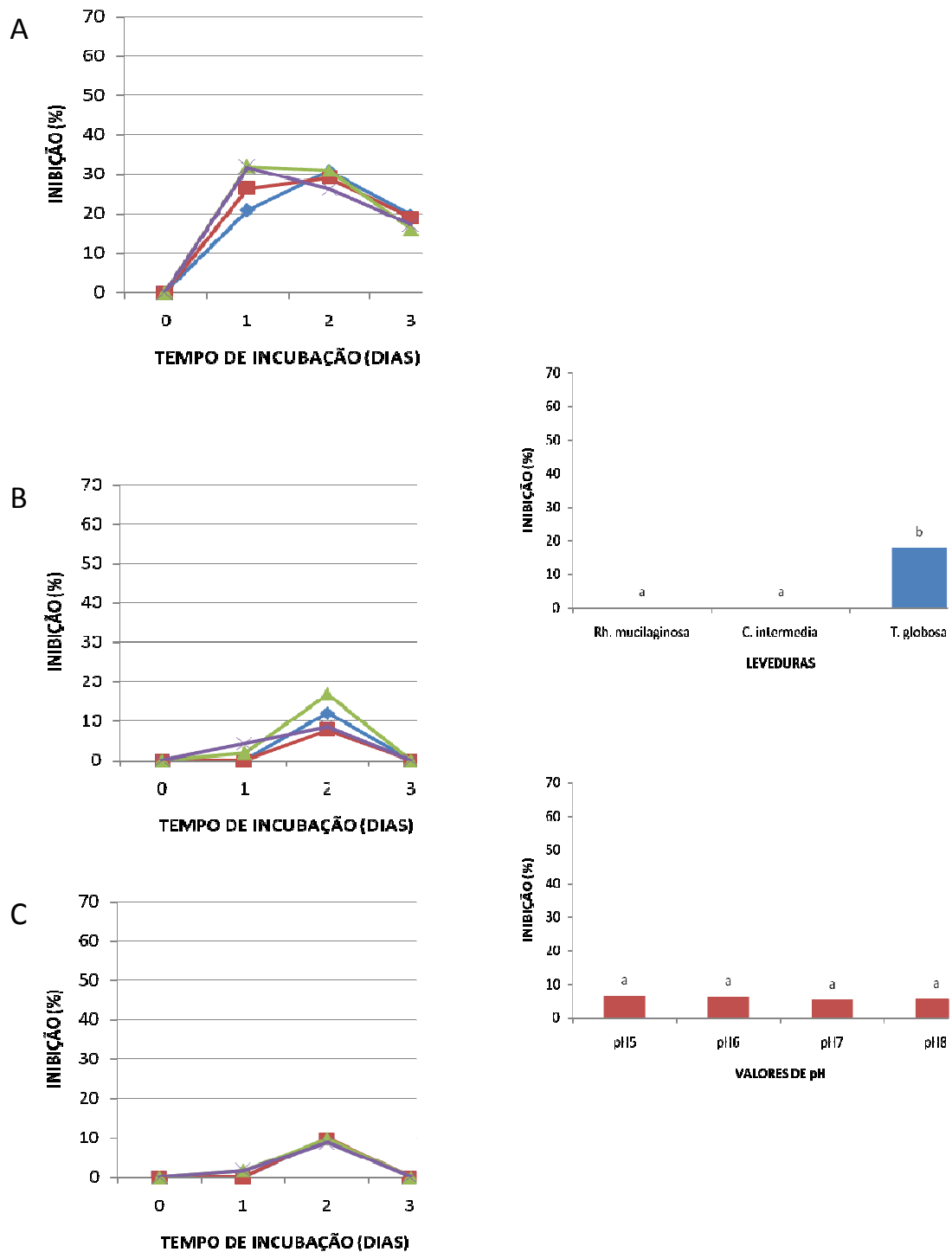


Figura 14. Inibição do crescimento micelial do fungo *T. paradoxa* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (—♦— pH 5, —■— pH 6, —▲— pH 7, —×— pH 8), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

Os resultados indicaram que para o fungo *C. sublineolum*, as leveduras testadas apresentaram antagonismo, impedindo seu crescimento, sendo que *T. globosa* apresentou-se mais efetiva, diferindo significativamente das demais leveduras. Os valores de pH 5 e 6 apresentaram os melhores resultados no controle (Figura 12). Resultado semelhante foi observado com o fungo *C. graminicola*, indicando que a levedura *T. globosa* é a mais eficiente no controle, e os menores valores de pH foram os mais adequados no processo de antagonismo (Figura 13). A levedura *T. globosa* foi a única capaz de controlar de forma significativa o crescimento micelial do fungo *T. paradoxa*. Os valores de pH não influenciaram de forma significativa o controle deste fungo (Figura 14).

O fato dos menores valores de pH apresentarem os melhores resultados de controle pode estar relacionado aos mecanismos utilizados pelas leveduras contra os fungos fitopatogênicos. A atividade da toxina *killer*, por exemplo, é maximizada em pH entre 4 e 5 (WOODS E BEVAN, 1968; MIDDELBEEK et al., 1979). O potencial redox de compostos sideróforos também pode ser influenciado pelo pH, sendo que o valor ideal é 4,5 (BENITE et al., 2002). Resultado diferente, porém, foi obtido por Narisawa et al. (2005), que avaliaram o efeito do pH do solo no controle do fungo fitopatogênico *Plasmodiophora brassicae* pelo fungo endofítico *Heteroconium chaetospora*, e observaram que os menores valores de pH aumentavam a incidência da doença em beterraba. O metabolismo fúngico, no geral, tende a ser mais tolerante a ambientes ácidos, apresentando ótimo de desenvolvimento em pH 5 (MADIGAN et al., 2004).

5.4.3. Avaliação de diferentes temperaturas de incubação no antagonismo *in vitro*

Outro fator avaliado no antagonismo das leveduras aos fungos fitopatógenos foi a temperatura de incubação. Este fator pode estar envolvido no metabolismo das leveduras quanto à produção de compostos antifúngicos e até mesmo influenciar possíveis mecanismos de defesa do fungo. Os resultados observados estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17.

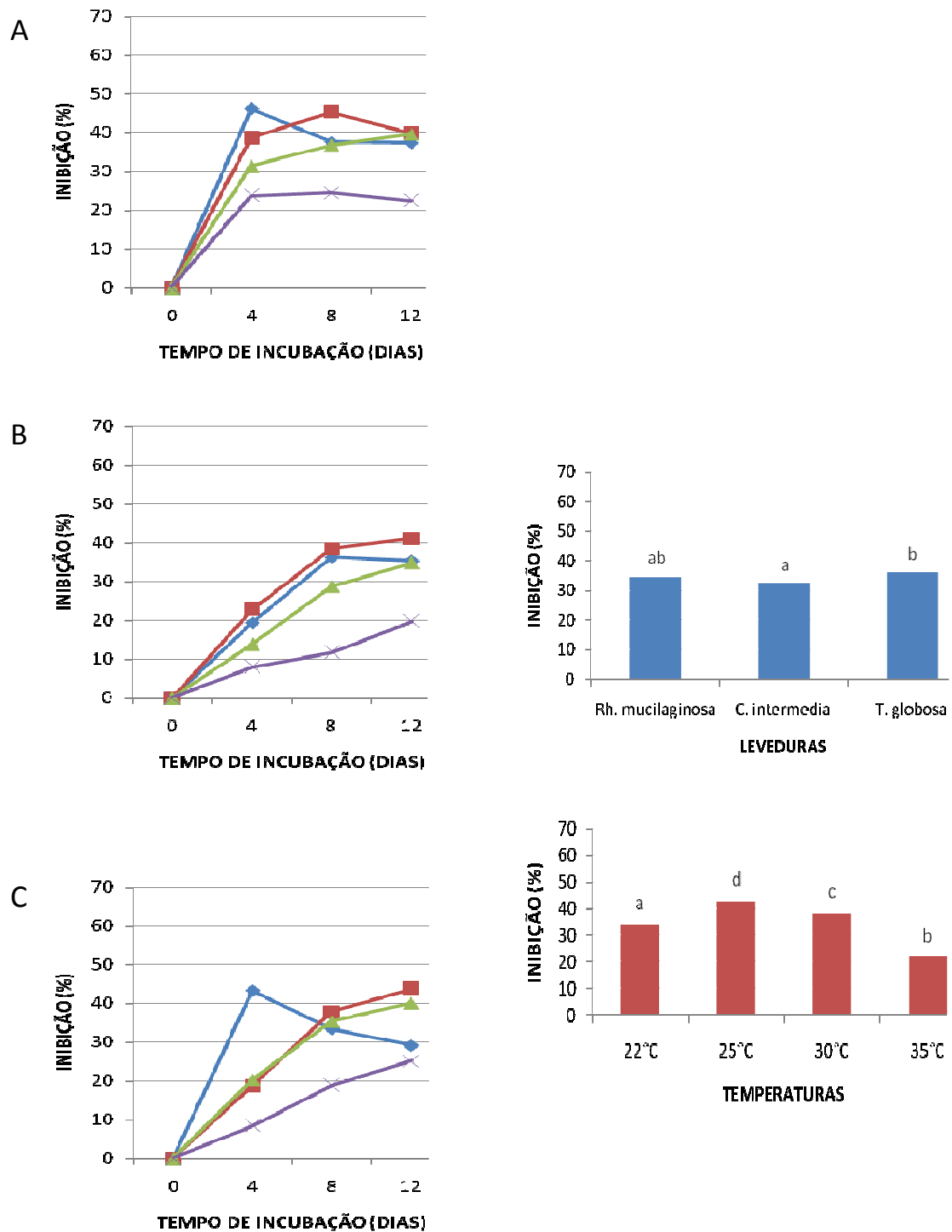


Figura 15. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. sublineolum* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (—♦— 22°C, —■— 25°C, —▲— 30°C, —×— 35°C), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

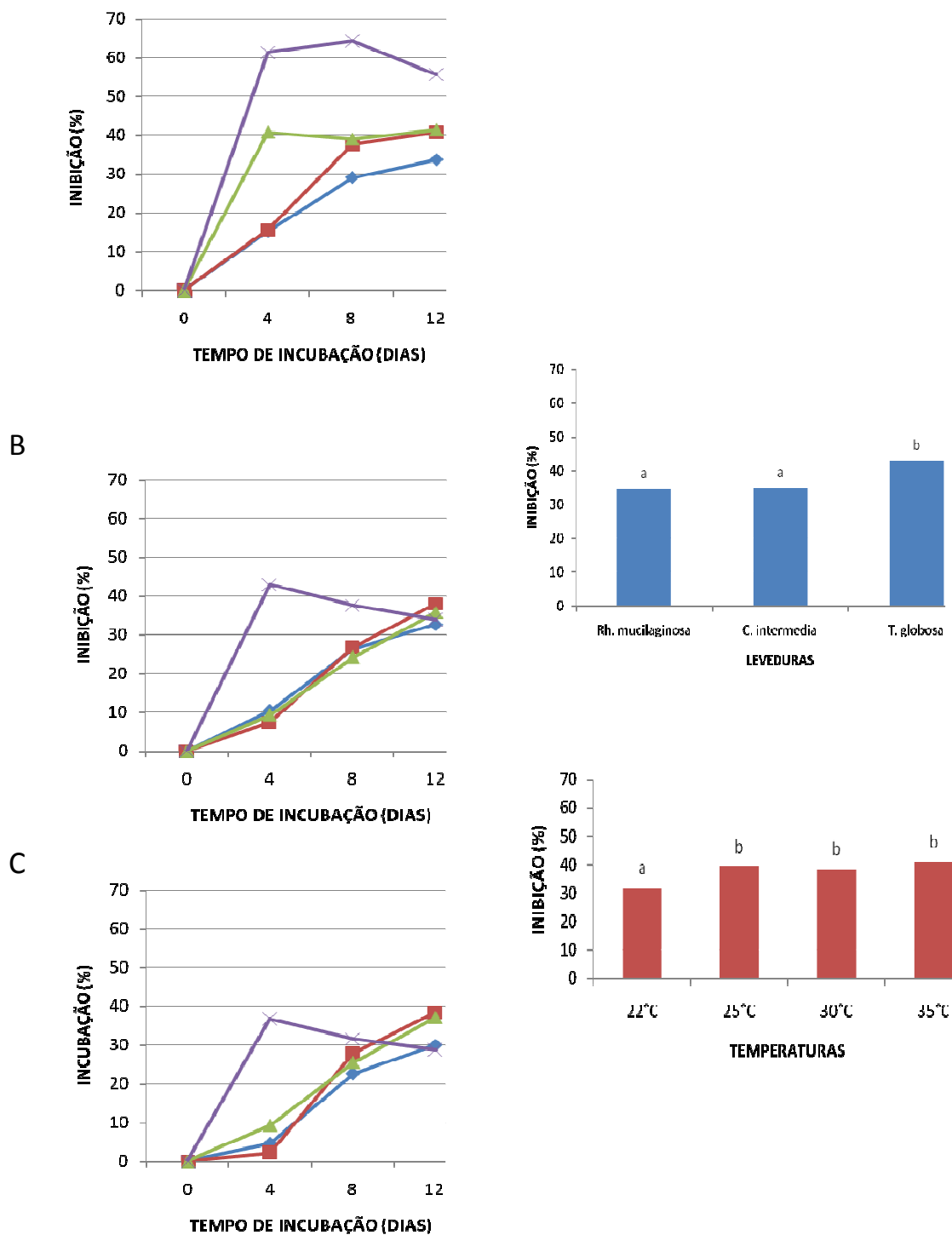


Figura 16. Inibição do crescimento micelial do fungo *C. graminicola* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (\blacktriangle 22°C, \blacksquare 25°C, \blacktriangleleft 30°C, \times 35°C), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

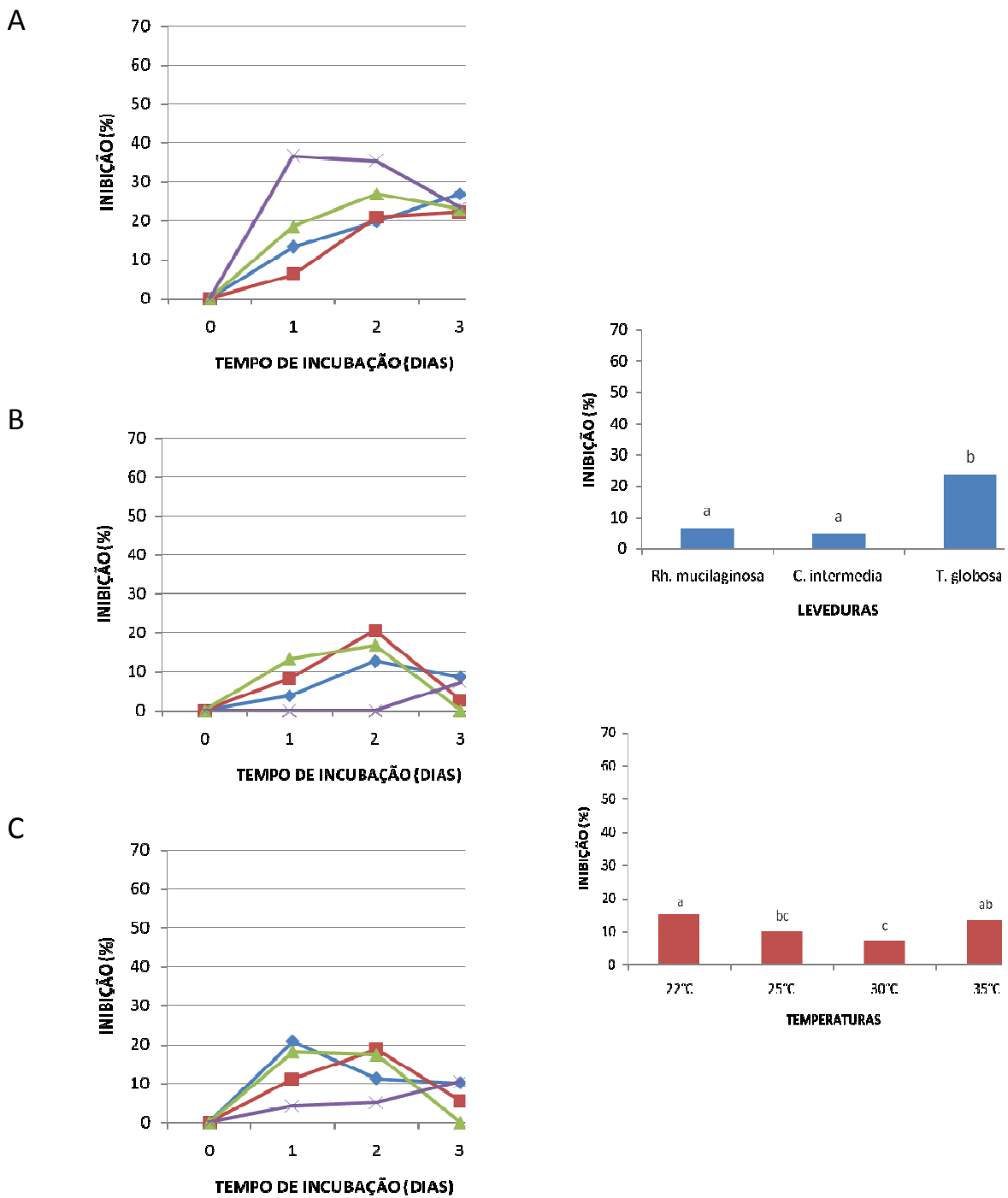


Figura 17. Inibição do crescimento micelial do fungo *T. paradoxa* com as leveduras (A) - *T. globosa*, (B) - *C. intermedia* e (C) - *Rh. mucilaginosa*, em diferentes valores de pH, (—♦— 22°C, —■— 25°C, —▲— 30°C, —×— 35°C), a 25°C, em meio BDA. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

Os resultados obtidos para o fungo *C. sublineolum* mostraram que as leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32) foram capazes de controlar o fungo de forma significativa, sendo que a temperatura de 25°C foi a melhor para a inibição, seguida de 30, 22°C. A temperatura de 35°C proporcionou a menor taxa de inibição (Figura 15). Para o fungo *C. graminicola*, a levedura *T. globosa* (1S112) apresentou os melhores resultados de controle, diferindo dos outros isolados. As temperaturas de 25, 30 e 35°C foram as que apresentaram as melhores taxas de inibição, não diferindo significativamente entre si (Figura 16).

Para o fungo fitopatogênico *T. paradoxa*, o controle foi significativamente maior quando utilizada a levedura *T. globosa* (1S112), seguida dos isolados *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32), que não diferiram entre si. A temperatura de 22°C apresentou-se como a melhor, não sendo significativamente superior à temperatura de 35°C, que por sua vez não diferiu de 25°C (Figura 17).

Para o desenvolvimento da antracnose em sorgo, temperaturas próximas a 25°C são mais favoráveis, enquanto abaixo de 15°C e acima de 30°C acabam por restringir seu desenvolvimento, segundo Pande et al. (1994). Isto deve estar relacionado às temperaturas ótimas para o crescimento do fungo, e para as leveduras aqui estudadas, estas parecem ser também as condições ideais de temperatura, o que favorece o controle biológico. É importante citar que a temperatura de 35°C, assim como o meio de cultura YEPD, não permitiu que o fungo filamentososo se desenvolvesse plenamente, impedindo seu crescimento até mesmo na placa controle (sem a presença da levedura).

Chanchaichaovivat et al. (2007) avaliaram o efeito da temperatura de estocagem da pimenta no controle biológico do fungo *C. capsici* por leveduras; os autores testaram as temperaturas de 18, 23, 28 e 33°C e observaram que o melhor controle foi obtido na menor temperatura (18°C), sendo que o controle foi diminuindo proporcionalmente ao aumento da temperatura de incubação. O aumento da temperatura pode ocasionar a diminuição da ação de compostos antifúngicos, como toxinas protéicas (toxinas *killer*), enzimas hidrolíticas, entre outros. O controle do fungo *Penicillium expansum* por leveduras saprófitas foi estudado por Chand-Goyal e Spotts (1996), que observaram serem as maiores temperaturas testadas as mais favoráveis ao desenvolvimento fúngico, prejudicando a ação antagônica da levedura. Soares e Sato (2000) relataram que a faixa de temperatura 22 a 25°C foi a melhor para a produção da toxina *killer* por *S. cerevisiae*.

5.5. Avaliação do antagonismo *in vitro* em meios de cultura líquidos

Com o objetivo de avaliar a ação de diferentes fatores sobre a capacidade antagônica das leveduras testadas, foi realizado um experimento em meio de cultura líquido, no qual se analisou os sobrenadantes dos cultivos puros e mistos (com o fitopatógeno) das leveduras, em meio tamponado ou não tamponado, após filtração ou autoclavagem dos sobrenadantes, sendo as amostragens realizadas durante três dias consecutivos a cada 24 horas de cultivo. Neste experimento foi avaliado se o controle do crescimento do fitopatógeno pode ser obtido sem a presença das células vivas da levedura.

Inicialmente foi feita uma análise estatística com os dados obtidos com as três leveduras em todos os tratamentos, sendo os efeitos principais representados na Figura 18. As três leveduras apresentaram antagonismo aos fungos utilizando-se os extratos (sobrenadantes) livres de células, indicando não haver necessidade da presença das células vivas para o controle, ou seja, a competição por espaço e nutrientes pode ser um dos mecanismos de antagonismo, mas não é o único.

O melhor controle foi realizado pela levedura *T. globosa* (linhagem 1S112), seguida pela levedura *C. intermedia* (2S02), que não diferiu do isolado anterior e da levedura *Rh. mucilaginoso* (2F32). A autoclavagem do sobrenadante de cultivo interferiu significativamente no controle do fungo filamentosos, sendo que o sobrenadante filtrado apresentou um controle significativamente maior da germinação dos esporos fúngicos, sugerindo a ação de compostos termolábeis no controle do fungo filamentosos. Resultado diferente foi obtido por Zhao et al. (2008), na avaliação da ação de *P. guilliermondii* no controle de *Rhizopus nigricans* em tomate, observando que o sobrenadante do cultivo da levedura filtrado ou autoclavado não inibiu o desenvolvimento do fungo filamentosos, sugerindo que para o controle é necessária a ação das células vivas da levedura, sendo o mecanismo de competição o responsável pelo antagonismo.

O cultivo da levedura sem a presença do fungo filamentosos (cultivo puro) resultou em um sobrenadante mais efetivo no controle da germinação fúngica, sendo significativamente superior ao tratamento no qual o sobrenadante obtido foi de um cultivo misto. Esse resultado também foi obtido por Coelho (2005), que avaliou o sobrenadante do cultivo da levedura e do cultivo misto levedura-fungo filamentosos no controle da germinação de *P. expansum*; o autor observou que o sobrenadante, obtido exclusivamente com cultivo da levedura, apresentou melhor resultado no controle. Levy (2003) não observou diferenças nas atividades para ambos

os sobrenadantes, confirmando que a produção de substâncias antagônicas pelas leveduras testadas não é estimulada pela presença do fungo teste. Coelho (2005) sugeriu que o sobrenadante do cultivo da interação levedura-fungo filamentososo poderia conter produtos do metabolismo do fungo teste, que dificultavam a atuação da substância antagônica sobre a germinação dos esporos.

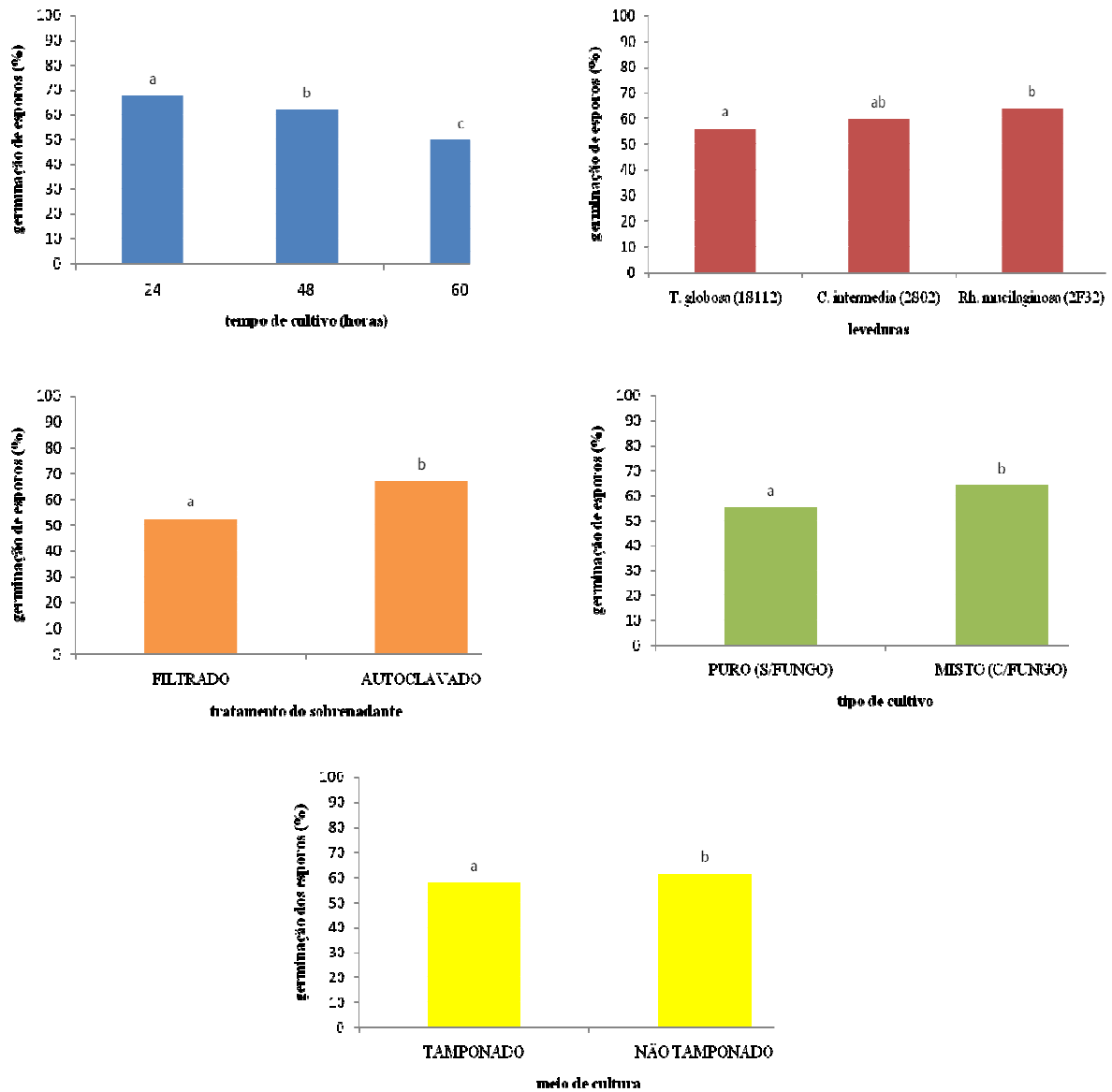


Figura 18. Avaliação dos efeitos dos diferentes sobrenadantes do cultivo das leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32) sobre a germinação de esporos. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

Os melhores resultados de controle foram alcançados com os sobrenadantes obtidos após 60 horas de cultivo com a levedura, seguido de 48 e 24 horas. Janisiewicz et al. (2000) avaliaram a ação de leveduras do gênero *Aureobasidium* spp. e observaram que após 24 horas de incubação foi possível obter o controle de 98% na germinação de esporos de *P. expansum*.

Coelho (2005) observou o melhor resultado de controle de germinação dos esporos com o sobrenadante do cultivo da levedura *Candida guilliermondii* após 72 horas de cultivo. Para a levedura *Pichia ohmeri*, porém, o sobrenadante que apresentou o melhor resultado foi o de 48 horas de cultivo, sendo este período, provavelmente, aquele em que a levedura produz o composto antifúngico, neste caso, a toxina *killer*.

O meio de cultura tamponado apresentou melhores resultados de controle em relação ao meio não tamponado, indicando que a manutenção do pH do meio favoreceu a inibição da germinação dos esporos. Este fato pode estar relacionado à estabilidade dos compostos antifúngicos produzidos pelas leveduras.

Para melhor discussão dos resultados, foram realizadas as análises estatísticas separadamente, para cada levedura estudada, com o objetivo de avaliar a influências dos diferentes fatores no comportamento antagônico em cada um dos isolados testados. Os resultados das análises estatísticas estão dispostos no Anexo IV.

Para a levedura *T. globosa* (1S112), o controle da germinação dos esporos do fungo filamentososo parece ser feito através da produção de substâncias termolábeis, já que o sobrenadante filtrado dos cultivos da levedura, independente do fungo ter sido cultivado junto com a levedura ou do tamponamento do meio, foi o que apresentou melhores resultados de antagonismo. Estes compostos termolábeis parecem ter se acumulado ao longo do tempo de cultivo, pois o sobrenadante de 60 horas de cultivo foi significativamente mais eficiente no controle (Figura 19).

Através da análise dos dados da levedura *C. intermedia* (2S02), verificou-se que compostos sensíveis à variação do pH do meio, produzidos na ausência do fitopatógeno e num período de 48 a 60 horas, foram provavelmente os responsáveis pelo controle (Figura 20). Os resultados obtidos para a levedura *Rh. mucilaginosa* (2F32) indicam que houve produção de compostos termolábeis, sensíveis à variação do pH, não estimulada pela presença do fitopatógeno e que se acumularam ao longo do tempo, conforme Figura 21.

Os resultados deste experimento mostraram que as três leveduras produzem compostos extracelulares que são inibidores da germinação de esporos do fungo fitopatógeno *C. sublineolum*, e que não há necessidade da presença das células vivas para o controle biológico. Além disso, a produção destes compostos não é estimulada pelo fitopatógeno e é dependente da temperatura e do pH do meio, dependendo da levedura. Nesta situação, podem estar enquadradas substâncias como enzimas e proteínas *killer*, sendo estas analisadas mais a frente.

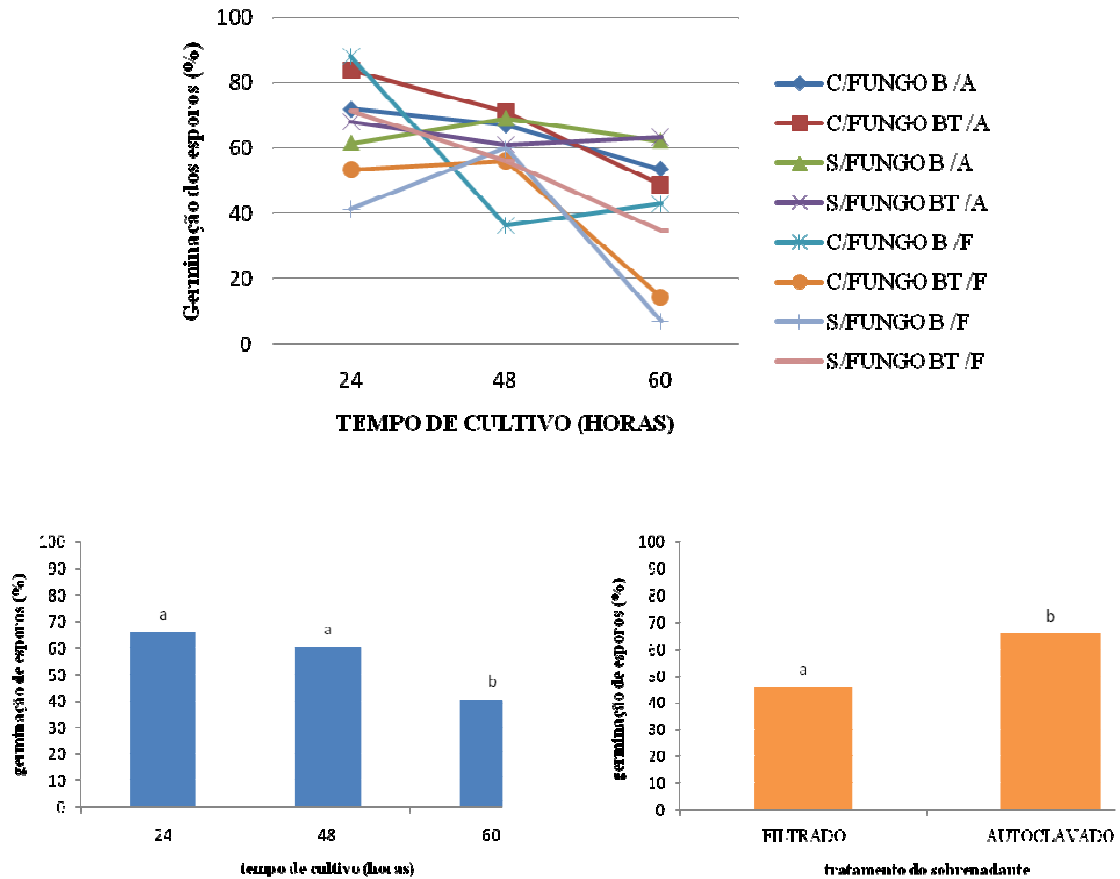


Figura 19. Avaliação do efeito dos diferentes sobrenadantes do cultivo de *T. globosa* (1S112) sobre a germinação (%) dos esporos do fungo *C. sublineolum*. C/FUNGO- sobrenadante do cultivo misto levedura-fungo filamentos; S/FUNGO – sobrenadante do cultivo da levedura sem o fungo; B – meio de cultivo BDA; BT – meio de cultivo BDA tamponado; A – sobrenadante autoclavado; F – sobrenadante filtrado. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

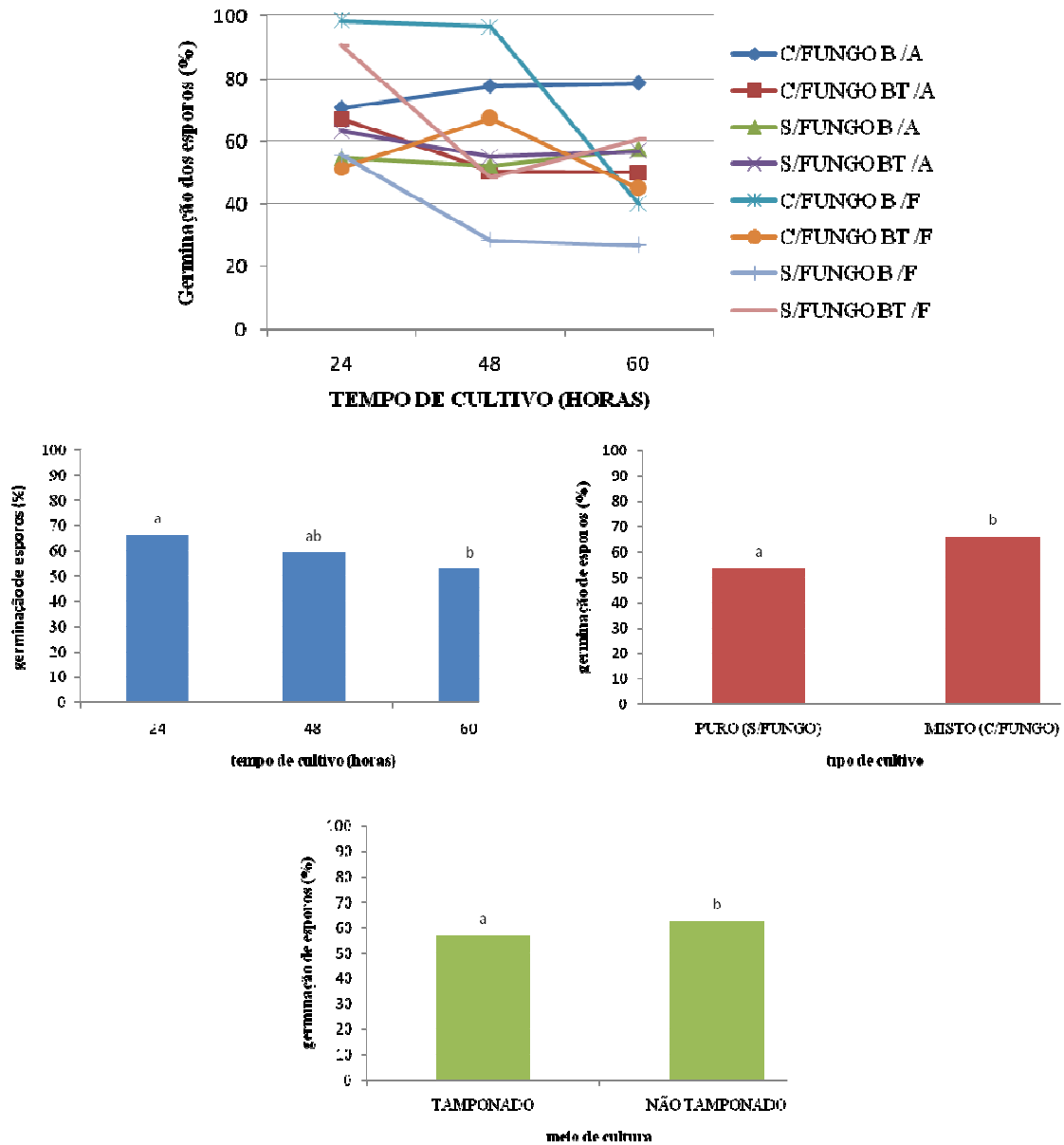


Figura 20. Avaliação do efeito dos diferentes sobrenadantes do cultivo de *C. intermedia* (2S02) sobre a germinação (%) dos esporos do fungo *C. sublineolum*. C/FUNGO- sobrenadante do cultivo misto levedura-fungo filamentososo; S/FUNGO – sobrenadante do cultivo da levedura sem o fungo; B – meio de cultivo BDA; BT – meio de cultivo BDA tamponado; A – sobrenadante autoclavado; F – sobrenadante filtrado. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

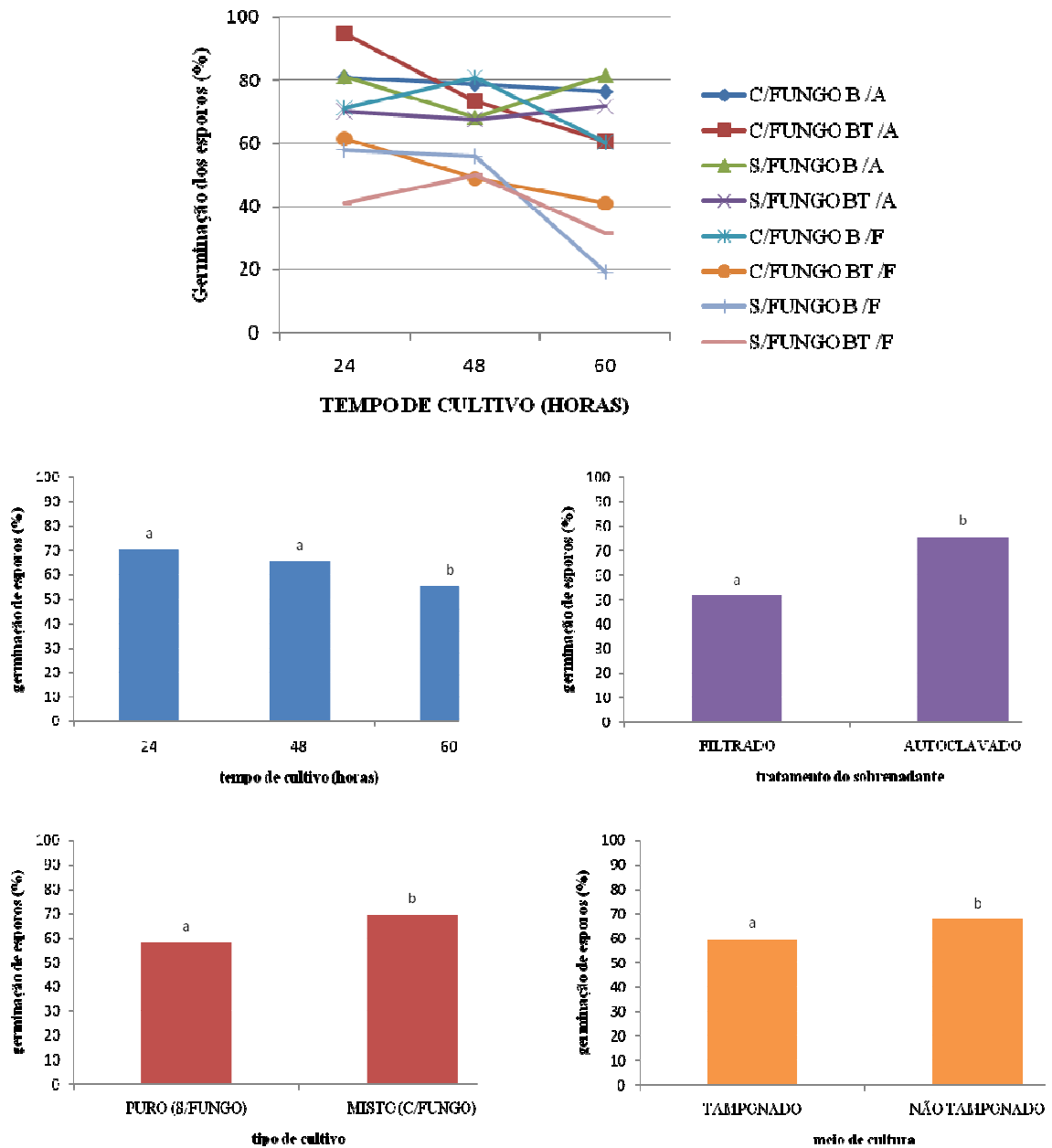


Figura 21. Avaliação do efeito dos diferentes sobrenadantes do cultivo de *Rh. mucilaginosa* (2F32) sobre a germinação (%) dos esporos do fungo *C. sublineolum*. C/FUNGO- sobrenadante do cultivo misto levedura-fungo filamentosos; S/FUNGO – sobrenadante do cultivo da levedura sem o fungo; B – meio de cultivo BDA; BT – meio de cultivo BDA tamponado; A – sobrenadante autoclavado; F – sobrenadante filtrado. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

5.6. Avaliação dos mecanismos de ação das leveduras selecionadas

5.6.1. Atividade killer

Foram testados todos os isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no controle dos fungos fitopatogênicos, conforme Tabela 1, quanto à atividade *killer*.

Somente os isolados 1S110, 1S111, 1S112, 2S01, 2S04 e 2F58, todos pertencentes à espécie *T. globosa*, mostraram resultado positivo, isto é, halo azul ao redor da colônia indicando a morte celular da levedura sensível (Figura 22).



Figura 22. Atividade *killer* da linhagem 1S112 de *T. globosa*, mostrando o halo azul (morte celular da levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006) em YEPD-azul de metileno, a 25°C, pH 4,5.

Destaca-se o fato de que não há na literatura trabalhos que relatam a espécie *Torulaspota globosa* como uma levedura *killer*. Esse dado importante indica que nem todas as espécies micocinogênicas são conhecidas, e que os fatores envolvidos na expressão da característica nesta levedura devem ser explorados com maiores detalhes.

Leveduras *killer* são apontadas na literatura como potenciais agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos. Walker et al. (1995) foram pioneiros em constatar a susceptibilidade de fitopatógenos às leveduras micocinogênicas, ampliando as perspectivas de aplicação deste grupo de leveduras. Weiler e Schimitt (2003) obtiveram resultados positivos no controle de *Fusarium oxysporum* com a levedura *killer* *Zygosaccharomyces bailii*. *Pichia membranifaciens*, através da ação da sua toxina *killer*, foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* (SANTOS et al., 2004). Coelho (2005), em seu estudo do controle de

Penicillium expansum em maçã, observou que as leveduras *Candida guilliermondii* e *Pichia ohmeri*, ambas *killer*, foram capazes de controlar o fungo em testes *in vitro*.

A levedura *T. globosa* (1S112) estudada neste trabalho apresenta-se como mais um exemplo da aplicação do mecanismo *killer* no controle biológico de fungos filamentosos. Entre as indicações desta ação está o fato da linhagem 1S112 apresentar os melhores resultados de controle dentre as outras leveduras (*C. intermedia* - 2S02 e *Rh. mucilaginoso* - 2F32) que não apresentam essa característica. Outro ponto importante é o resultado obtido no antagonismo em meio líquido, no qual o sobrenadante autoclavado inibiu menos a germinação dos conídios de *C. sublineolum*, indicando ser um composto protéico envolvido no controle, como por exemplo, a toxina *killer*. Nos experimentos de antagonismo em meio de cultura sólido, os valores de pH 5 e 6 mostraram os melhores resultados, sendo que a atividade *killer* apresenta melhor atividade sob condições ácidas (pH 3 a 6) com melhores resultados em pH 4 a 5 (WOODS e BEVAN, 1968; MIDDELBECK et al., 1979). A temperatura que proporcionou maior controle dos fungos fitopatogênicos foi 25°C, sendo que é de 22 a 25°C a melhor faixa de temperatura para a atividade *killer*, de acordo com Golubev (1998). Temperaturas superiores a 30°C podem inativar a ação das toxinas *killer*.

Os resultados obtidos indicam ser, portanto, a atividade *killer* um dos mecanismos de controle utilizados pela levedura *T. globosa* no controle dos fungos fitopatogênicos, porém a ação sinérgica de outros mecanismos não pode ser descartada, uma vez que os resultados indicam que houve o controle em todas as condições estudadas, até mesmo naquelas que não são as mais adequadas para a atividade micocinogênica da levedura, embora em menor extensão.

A Tabela 2 apresenta os resultados da avaliação da ação do pH e da temperatura na atividade *killer* de *T. globosa* (1S112). Dentre os valores de pH estudados, o pH 4,5 foi o que apresentou melhores resultados, indicando ser a condição mais favorável para a atividade. A temperatura de 25°C também se mostrou como a melhor para a levedura expressar essa característica. As leveduras sensíveis avaliadas também mostraram diferentes comportamentos em confronto com a levedura *killer T. globosa*; para a estirpe sensível de *S. cerevisiae* (NCYC 1006) houve a formação de halo azul ao redor da levedura *killer*, indicando morte da levedura sensível, sendo que para a estirpe sensível de *Torulopsis glabrata* (ATCC 15126) houve a formação de um halo de inibição de crescimento celular ao redor da levedura *killer*. Essa característica pode indicar diferentes modos de ação da toxina em diferentes

espécies de leveduras, podendo resultar na morte ou na inibição do crescimento do microrganismo sensível.

Tabela 2. Efeito da temperatura e do pH do meio de cultura YEPD-azul de metileno tamponado sobre a atividade *killer* de *T. globosa* (1S112). H = halo de inibição; ZA = zona azul (morte celular).

Temperatura	pH	Linhagem sensível	
		<i>S. cerevisiae</i> (NCYC 1006)	<i>T. glabrata</i> (ATCC 15126)
25°C	3,5	H/ZA	H
	4,5	ZA	H
	5,5	-	-
30°C	4,5	ZA	-
35°C	4,5	-	-

Apesar da presença da característica *killer* na levedura *T. globosa* (1S112) apresentar-se como um ponto positivo como mecanismo de controle biológico de fitopatógenos, é importante saber se a expressão desta proteína ocorre a partir de genes presentes nos cromossomos, ou se é expressa por plasmídios virais de dsRNA, o que ocorre em algumas leveduras *killer* (como *S. cerevisiae*, por exemplo). Neste caso a atividade *killer* pode ser perdida através de processo de cura (ação da temperatura ou actidione), o que não garantiria a estabilidade genética da característica. Os resultados para a detecção de plasmídios dsRNA estão dispostos na Figura 23, onde observa-se que a levedura *T. globosa* (1S112) não apresenta o plasmídio viral, indicando que os genes *killers* estão presentes no cromossomo, o que garante maior estabilidade desta característica. Para fins de comparação, a Figura 23 traz também os resultados para linhagens de *Kluyveromyces marxianus* (ausência de dsRNA), e de *S. cerevisiae* (presença de 1 ou 2 plasmídios, L e M).

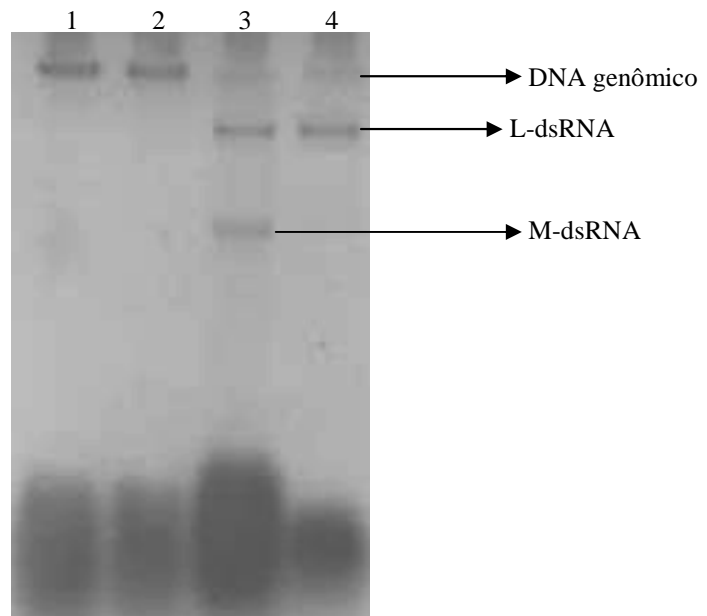


Figura 23. Gel de agarose (1,3%) dos produtos da extração dos plasmídios dsRNA. Legenda: 1- *T. globosa* (1S112); 2 – *Kluyveromyces marxianus* (CCA 510); 3 – *S. cerevisiae* (CCA 118); 4 - *S. cerevisiae* (CCA 015).

5.5.2. Produção de compostos antifúngicos voláteis

Outro mecanismo de ação estudado foi a produção de compostos voláteis antifúngicos pelas leveduras. Para este teste, placas com divisão foram utilizadas, no intuito de que as células ou substâncias extracelulares não-voláteis da levedura não entrassem em contato com o micélio dos fungos fitopatogênicos testados. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença no crescimento micelial entre os tratamentos com a inoculação da levedura e o controle (placa somente com o fungo) (Figura 24), indicando que a levedura não realiza o controle dos fungos filamentosos através de produção de substâncias voláteis.

A levedura *Rh. mucilaginosa* (2F32) também foi avaliada neste experimento, e apesar de não estar representada na Figura 24, o resultado foi semelhante ao das outras leveduras, isto é, não controlou os fungos fitopatogênicos através de compostos voláteis.

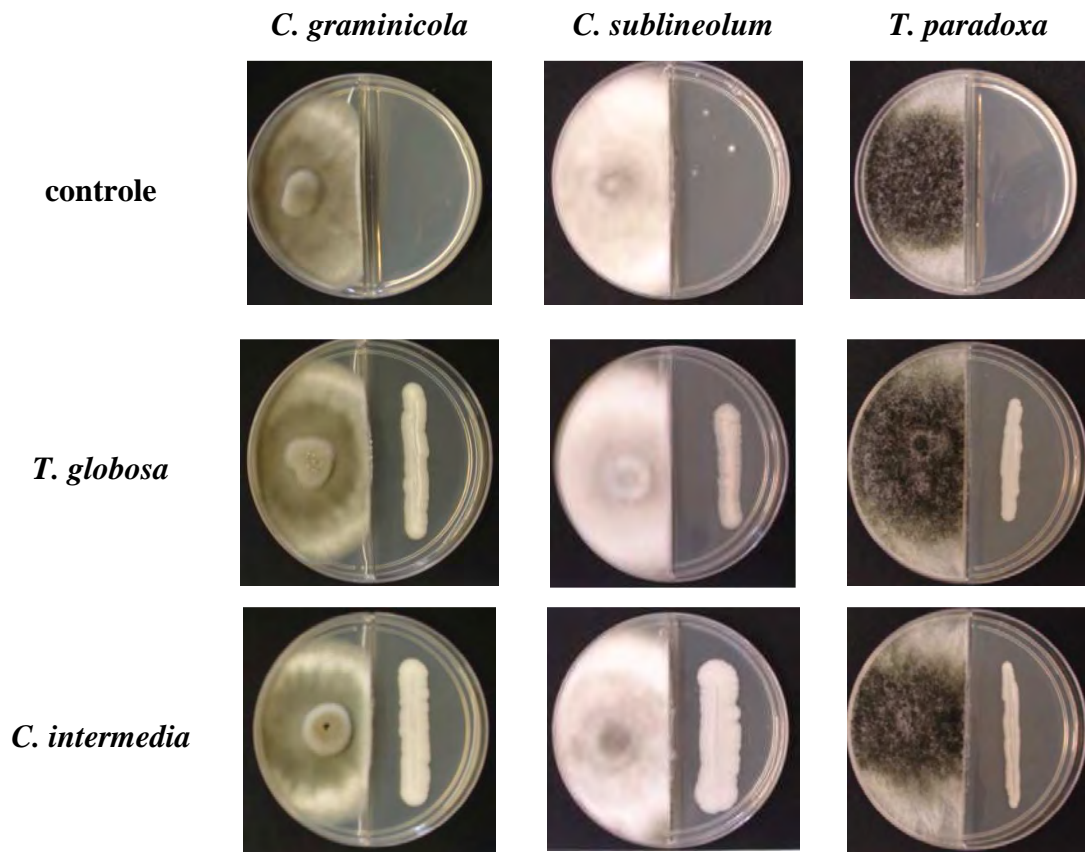


Figura 24. Avaliação da produção de compostos antifúngicos voláteis pelos isolados de leveduras contra os fungos fitopatogênicos *C. sublineolum*, *C. graminicola* e *T. paradoxa*, em meio BDA, a 25°C, após 7 dias de incubação.

É possível encontrar na literatura trabalhos com resultados positivos na produção de voláteis por leveduras no controle de fitopatógenos fúngicos. Bruce et al. (2003) observaram que no cultivo em meio triptona de soja, *S. cerevisiae* foi capaz de inibir cerca de 75% o crescimento de fungos causadores de podridões em madeira, como *Sclerophoma pithyophila*. Os mesmos autores afirmaram que esta produção pode ser fortemente influenciada pelo meio de cultivo, sendo que em meio pobre nutricionalmente, o controle obtido foi muito baixo ou nulo. Os principais produtos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* foram 2-pentanona, dimetil-sulfeto e trimetil-sulfeto.

Fialho (2004), estudando o controle biológico do fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta em citros pela levedura *S. cerevisiae*, observou controle do fitopatógeno de até 83%, através da produção de compostos voláteis. O autor atribuiu o controle do fungo à produção de dióxido de carbono pela levedura, que consome o açúcar presente no meio de cultura e, através da respiração, pode produzir uma atmosfera, na placa de Petri, com 8 a 12% de CO₂, a qual pode inibir o crescimento micelial de fungos como *Rhizopus stolonifer* e *Alternaria alternata* (CIA, 2005).

Resultados anteriores mostraram que o controle do fitopatógeno pelas leveduras estudadas pode se dar pela produção de compostos antifúngicos, porém não voláteis, como o presente experimento demonstrou.

5.6.3. Produção de enzimas hidrolíticas

Dentre os microrganismos antagonistas com potencial de aplicação no controle biológico de fitopatógenos, algumas espécies se destacam pela capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, as quais podem atuar na degradação da parede celular do fungo filamentoso, causando danos à suas hifas e prejudicando seu desenvolvimento. Neste estudo, foi avaliada a capacidade das leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32) em produzir as enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. Os resultados obtidos, porém, indicaram que esses isolados não apresentam a capacidade de produzir essas enzimas, não sendo detectada nenhuma atividade enzimática nas condições avaliadas.

5.6.4. Produção de sideróforos

Algumas espécies de microrganismos apresentam a capacidade de, além de competir por espaço e nutriente, produzir agentes quelantes com alta afinidade por íons ferro, chamados sideróforos. A partir de observações nas placas (Figura 25), foi possível notar que os três isolados de leveduras não apresentaram a capacidade de produção de sideróforos, pois não causaram a mudança de coloração do meio Cromo Azurol S, como ocorreu para a linhagem de *A. niger* utilizada como controle positivo, a qual modificou a coloração do meio de azul para vermelho. A produção de sideróforos, portanto, não se apresenta como o mecanismo de controle utilizado pelas leveduras no controle dos fungos fitopatógenos estudados.

É possível encontrar na literatura trabalhos que apresentam a levedura *Rh. mucilaginosa* como produtora de ácido rodotorúlico, um sideróforo do tipo hidroxamato, sob condições de falta de ferro no meio (ANDERSEN et al., 2003). Os resultados obtidos neste trabalho, porém, mostram que esta linhagem não foi capaz de produzir esta substância sob as condições avaliadas. As possíveis razões para este resultado podem estar na metodologia utilizada para a detecção, ou na linhagem, que pode apresentar essa característica e não expressá-la de forma significativa.

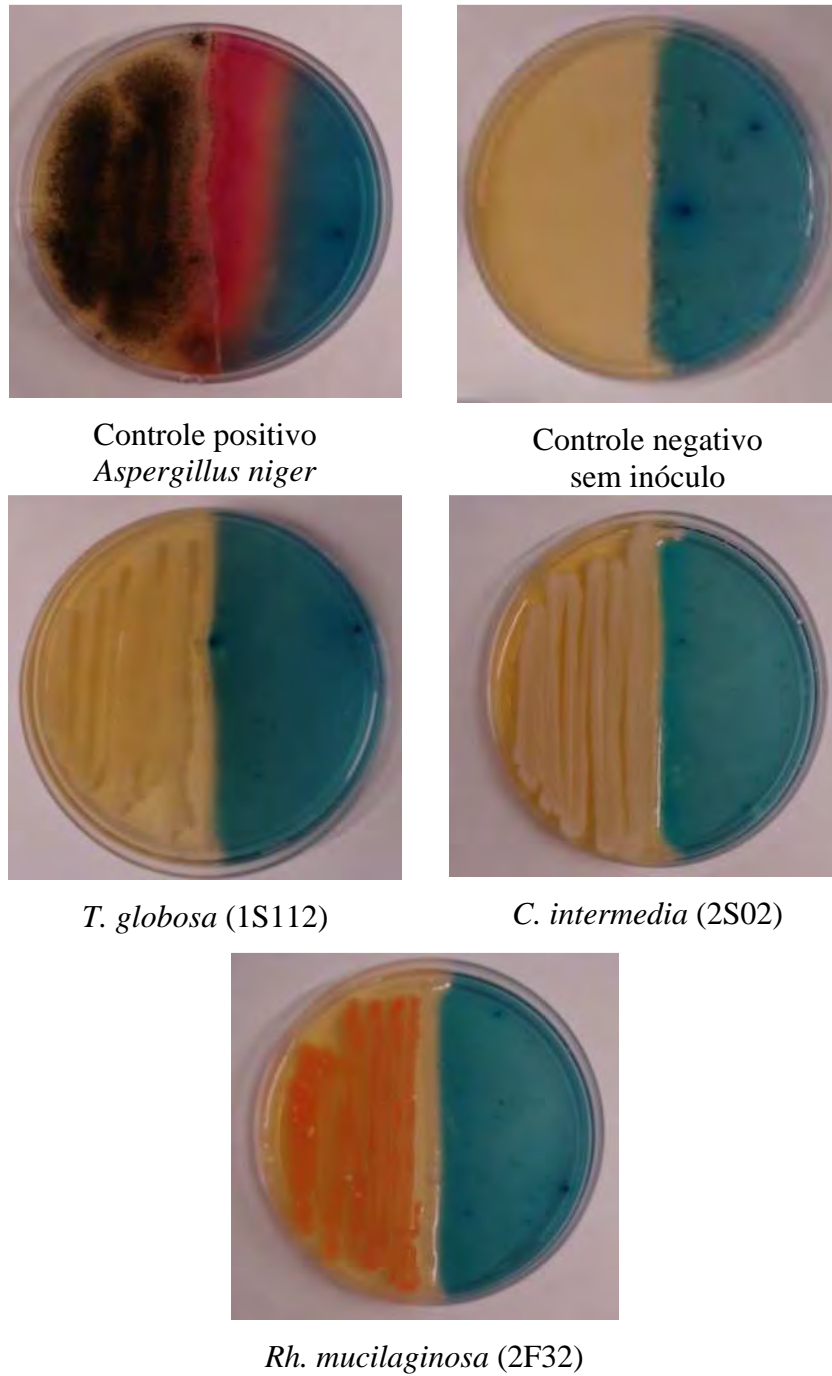


Figura 25. Avaliação da produção de sideróforos pelos isolados de levedura e pela linhagem de *A. niger* (CCT 4355), em meio extrato de malte 2%/CAS, a 25°C, após 7 dias de incubação.

Os compostos sideróforos apresentam grande capacidade de retirar o ferro presente no ambiente, levando o microrganismo à competição, quando a disponibilidade do elemento é o fator limitante. Linhagens de *Rhodotorula glutinis*, da mesma forma que *Rh. mucilaginosa*, apresentam a capacidade de produzir ácido rodotorúlico, e por meio deste mecanismo, a levedura foi capaz de controlar o fungo filamentososo *P. expansum*, causador de podridão em maçãs no pós-colheita (CALVENTE et al., 1999). Wang et al. (2009) isolou leveduras de ambientes marinhos e observou que a levedura *A. pullulans* foi capaz de produzir altas concentrações de sideróforo, o qual atuou no controle de bactérias causadoras de doenças em animais marinhos.

5.6.5. Competição por nutrientes

Uma das formas utilizadas pelas leveduras no controle do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos é a competição por espaço e nutrientes. Para avaliar se os isolados de leveduras são bons competidores por nutrientes e dessa forma inibir o desenvolvimento fúngico, foi realizado este experimento, no qual foram testadas cinco concentrações de glicose (0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5%) no cultivo misto de células de leveduras e esporos do fungo *C. sublineolum*, avaliando-se a porcentagem de germinação dos esporos fúngicos. Os resultados das análises estatísticas estão dispostos no Anexo V.

Os resultados mostraram que os isolados de leveduras apresentaram controle significativo da germinação dos esporos em todas as concentrações de glicose (Figura 26). As menores taxas de germinação dos esporos de *C. sublineolum* foram obtidas nas menores concentrações de glicose do meio de cultura, indicando o mecanismo de competição de nutrientes como responsável pelo controle. Os resultados também mostraram que a germinação dos esporos do fungo não foi influenciada pela concentração de glicose do meio, no cultivo puro do fitopatógeno (controle), apesar dos conídios necessitarem de energia externa para germinação, conforme descrito por Piccinin et al (2005). Na verdade, houve diferença significativa entre a concentração de 2,5% de glicose e as demais, com exceção de 2%, sugerindo um efeito benéfico da maior disponibilidade de carbono para a germinação dos esporos. Porém, a concentração de 2% não diferiu estatisticamente das concentrações inferiores quanto ao parâmetro avaliado. Apesar desta consideração, ocorreu um nítido efeito controlador da levedura sobre a germinação dos esporos.

Chanchaichaovivat et al. (2008), avaliaram possíveis mecanismos de ação da levedura *P. guilliermondii* no controle da doença antracnose em pimenta causada pelo fungo *C. capsici*. Os autores observaram que o aumento das concentrações de açúcar reduziu a supressão da germinação do esporo fúngico, sugerindo que a levedura compete pelos nutrientes do meio com o fungo, inibindo seu desenvolvimento. Saravanakumar et al. (2008), estudando uma nova linhagem de *Metschnikowia pulcherrima* no controle dos fungos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*, causadores de doenças em maçãs, observaram que a levedura foi capaz de controlar o fungo através da competição por ferro do meio, indicando ser a depleção por ferro o mecanismo de controle dos fungos testados.

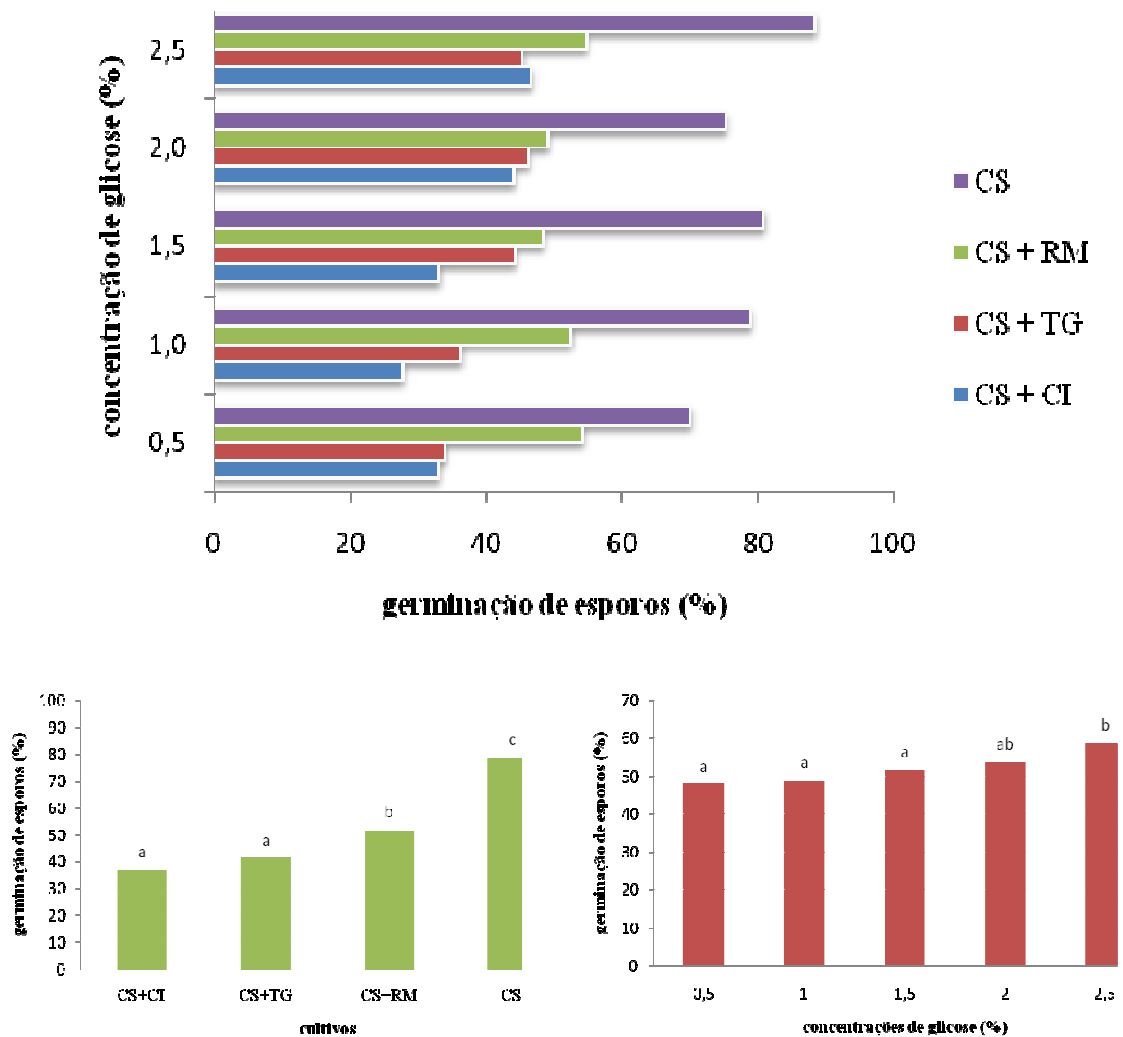


Figura 26. Germinação de esporos (%) do fungo *C. sublineolum* (CS) em cultivos puro e mistos com as leveduras *T. globosa* (TG), *C. intermedia* (CI) e *Rh. mucilaginosa* (RM), em meio caldo de batata, com diferentes concentrações de glicose, a 25°C, pH 6,5. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

Para o fitopatógeno *C. sublineolum*, o mecanismo de competição de nutrientes deveria ser mesmo relevante para o controle pela levedura, visto que este fungo é pouco eficiente na competição com outros microrganismos do solo, causando redução na sua sobrevivência quando em contato com o solo (LIPPS, 1985).

5.6.6. Observação microscópica da hifa dos fungos fitopatogênicos da zona de antagonismo

A partir dos resultados de antagonismo apresentados no item 5.2 para as três leveduras selecionadas, foi realizada a análise microscópica das hifas do fungo fitopatogênico para observação de algum tipo de deformação causada pela levedura antagônica. As hifas apresentaram morfologias distintas quando comparadas às do tratamento controle (micélio retirado de local longe da levedura), indicando possíveis modificações causadas pelas leveduras (Figuras 27, 28 e 29).

Observando-se as hifas do fungo *C. sublineolum* retiradas próximas à zona de inibição causada pela levedura *T. globosa* (1S112), foi possível notar que aquelas localizadas mais próximas às células de leveduras mostraram-se murchas como se tivessem perdido o conteúdo celular, com aparência de fita, dobradas e emaranhadas (Figura 27 – C); nas hifas localizadas na região mediana, próxima ao halo de inibição, foi observada a formação de bolhas ou granulação da hifa, como pode ser comprovado na Figura 27 - B.

Anormalidades também foram notadas nas hifas do fungo *C. sublineolum* quando próximas da zona de antagonismo com a levedura *C. intermedia* (2S02). Este fungo apresentou hifas com crescimento comprometido, retorcidas, indicando um desenvolvimento deficiente, além da presença de hifas granuladas (Figura 28 – B e C), se comparadas à região mais afastada da zona de antagonismo, onde as hifas mostraram-se normais (Figura 28 – A).

O aspecto da hifa retirada do fungo inibido pela levedura *Rh. mucilaginoso* (2F32) foi de inchaço e formação de bolhas (granulação) naquelas retiradas da região mediana, próxima ao halo de inibição (Figura 29 – C) e de perda do conteúdo celular nas hifas da zona de inibição (próxima às células de leveduras), apresentada na Figura 29 – C.

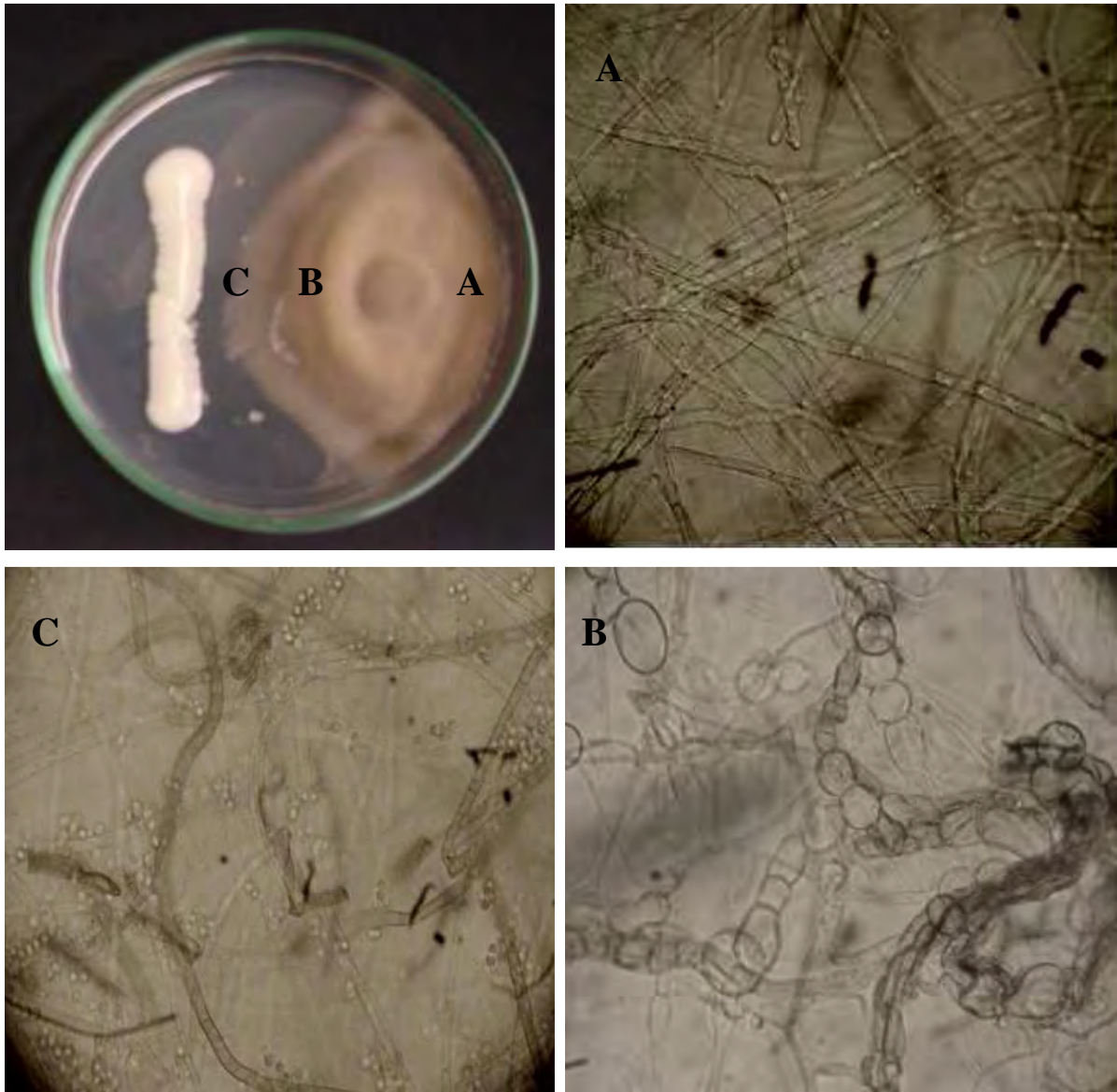


Figura 27. Detalhes da morfologia das hifas do fungo *C. sublineolum*, vistas em microscópio óptico, retiradas da placa onde o fungo foi inoculado junto com a levedura *T. globosa* (1S112) (aumento 400X, fotos das hifas). Legenda: A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo.

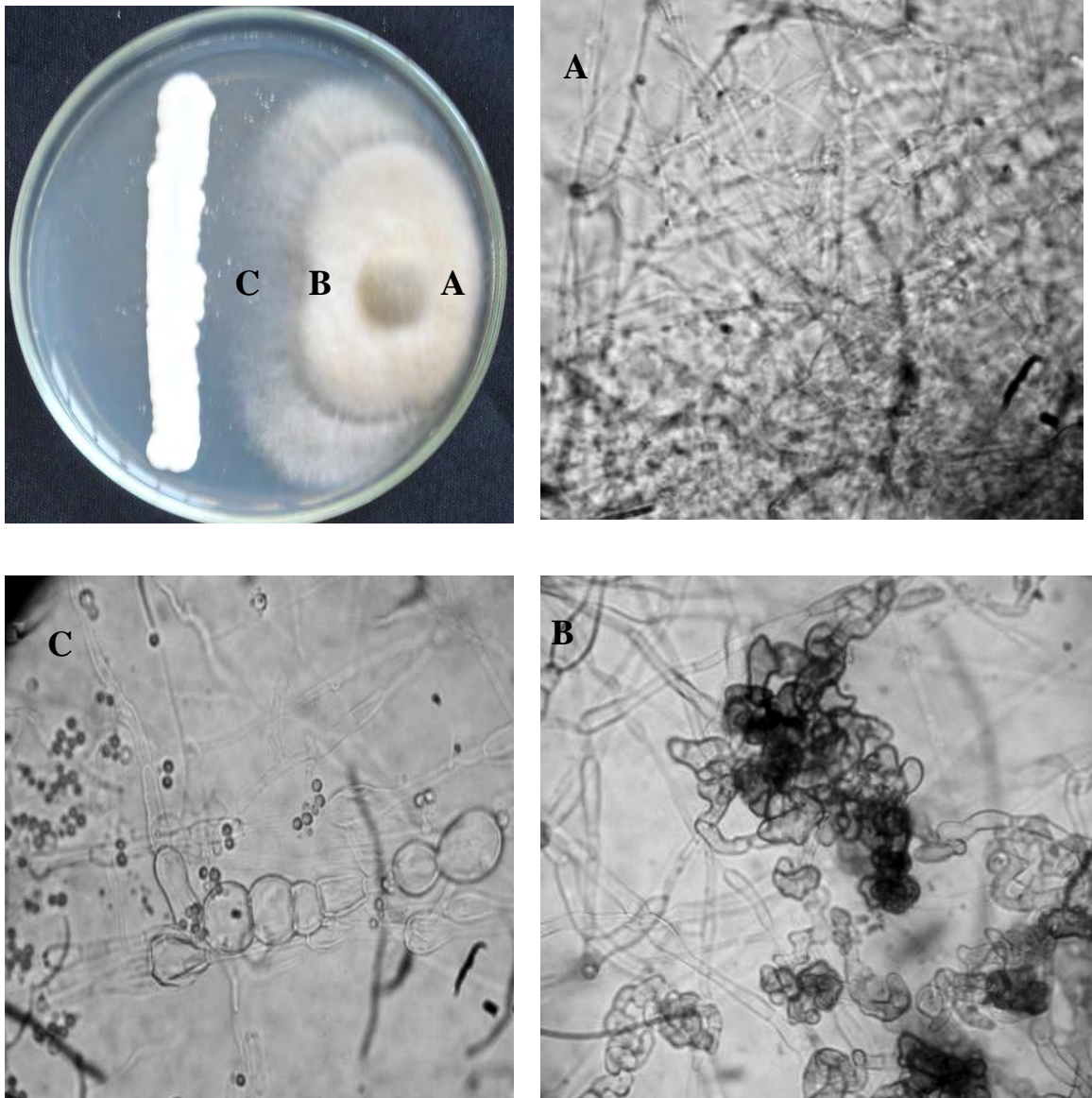


Figura 28. Detalhes da morfologia das hifas do fungo *C. sublineolum*, vistas em microscópio óptico, retiradas da placa onde o fungo foi inoculado junto com a levedura *C. intermedia* (2S02) (aumento 400X, fotos das hifas). A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo.

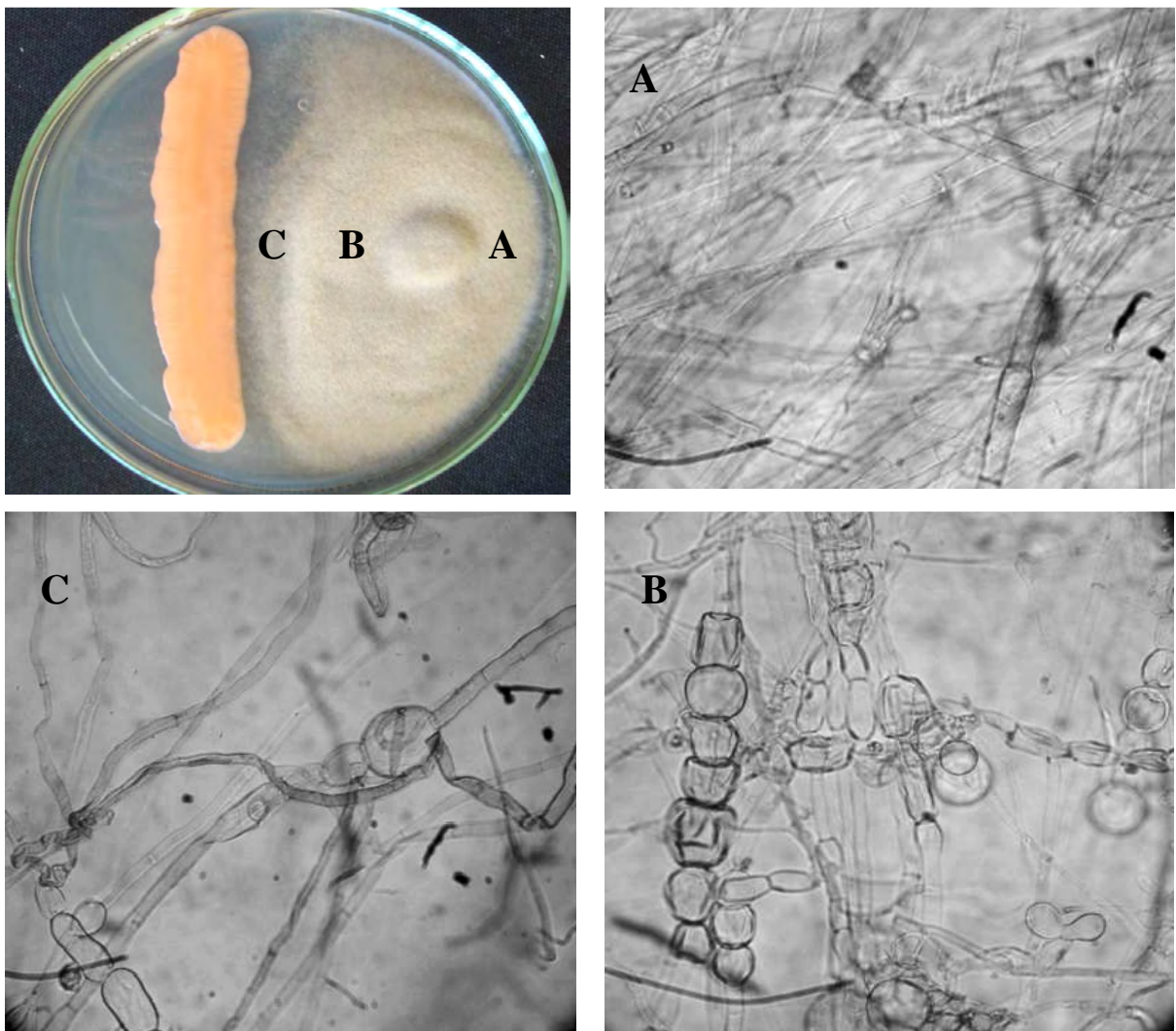


Figura 29. Detalhes da morfologia das hifas do fungo *C. sublineolum*, vistas em microscópio óptico, retiradas da placa onde o fungo foi inoculado junto com a levedura *Rh. mucilaginosa* (2F32) (aumento 400X, fotos das hifas). A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo.

Ferreira et al. (1991), avaliando a ação de *Bacillus subtilis* no controle do fungo *Eutypa lata* em uvas, observaram diferenças na morfologia da hifa, com afinamento das pontas e formação de bolhas no decorrer de toda a extensão da hifa. Chaurasia et al. (2005) estudaram o antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Fusarium oxysporum* e observaram anormalidades no desenvolvimento das hifas, com a lise da parede celular, vacuolização e granulação. Em ambos os trabalhos, creditou-se as irregularidades na morfologia da hifa à ação de substâncias antibióticas produzidas pela bactéria, porém não foram descritas quais seriam estas substâncias, nem mesmo seu modo de ação.

Apesar de, provavelmente, as leveduras avaliadas apresentarem diferentes mecanismos de ação na inibição do desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos, o aspecto das hifas nos locais de controle apresentam semelhanças, como a granulação, que pode ser observado em todos os casos. Possivelmente a ação de compostos que atuam na parede celular das hifas, perturbando o equilíbrio osmótico, seja a razão para a inibição do desenvolvimento do fungo filamentoso. Para o fungo controlado pela levedura *T. globosa* (1S112), estas alterações na morfologia das hifas podem ser devido à toxina *killer*. Não se conhece a natureza da toxina *killer* de *T. globosa*, nem seu modo de ação, porém os componentes da parede celular são os locais primários de reconhecimento das toxinas. Estas reconhecem diferentes receptores da parede celular, ligando-se à eles preliminarmente, antes dos receptores da membrana plasmática (GOODAY, 1995). Masih et al. (2000) estudaram a ação da levedura *P. anomala*, isolada da superfície de maçãs, no controle do fungo *B. cinerea*, e observou deformações na hifa fúngica, quando em contato com as células da levedura, como coagulação e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Os autores sugeriram que o resultado observado ocorreu devido à produção de enzimas hidrolíticas, principalmente β -1,3-glucanase.

Os resultados obtidos neste trabalho, no entanto, comprovam que o mecanismo de controle se dá pela produção de substâncias antifúngicas, sejam elas do tipo toxina *killer* ou outras ainda desconhecidas.

5.6.7. Avaliação do crescimento micelial do fungo fitopatógeno retirado da zona de antagonismo

As hifas retiradas da zona de antagonismo, embora estivessem deformadas, não perderam a viabilidade, pois cresceram na mesma velocidade que as hifas retiradas de locais longe da levedura. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 30.

As alterações morfológicas, em nível de parede celular, discutidas no item anterior, podem ter sido provocadas pelos compostos antifúngicos produzidos pelas leveduras, mas não em concentração suficiente para causar lise e extravasamento do conteúdo celular. Se esta situação ocorrer *in vivo*, no entanto, pode-se supor que estas modificações na parede celular dificultariam a penetração do fitopatógeno no hospedeiro, por causar enfraquecimento das hifas.

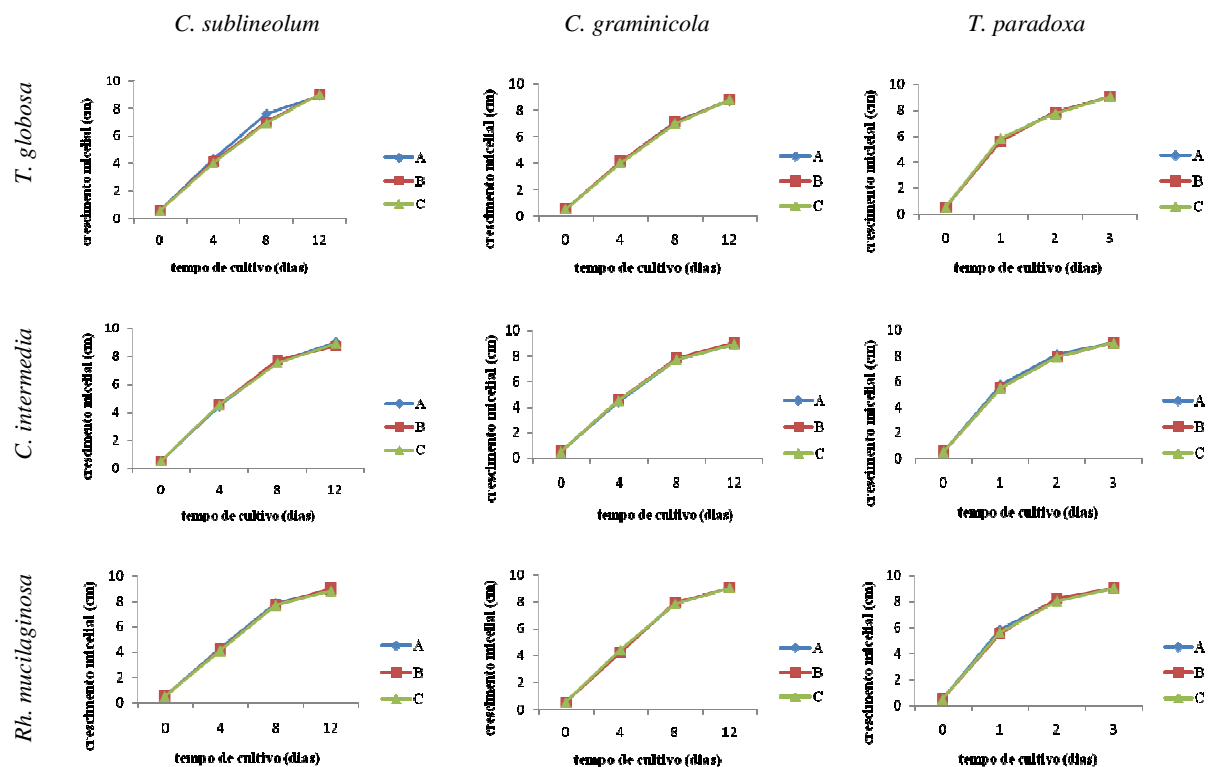


Figura 30. Avaliação do crescimento micelial dos fungos *C. sublineolum*, *C. graminicola* e *T. paradoxa*, cujas hifas foram retiradas de diferentes locais da placa onde foram cultivados com leveduras *T. globosa* (1S112), *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32). Legenda: A – hifa longe da zona de antagonismo; B – hifa próxima à colônia da levedura; C – hifa da zona de antagonismo.

5.7. Caracterização das leveduras como promotoras de crescimento vegetal

5.7.1. Produção de ácido indol-acético (AIA)

Para a detecção da produção de ácido indol-acético (AIA) pelos isolados de leveduras, foi utilizada a técnica descrita por Bric et al. (1991), porém algumas variações na constituição do meio de cultura e membranas foram feitas. Essa adequação foi necessária devido as técnicas normalmente utilizadas na detecção de AIA terem sido propostas para bactérias, que apresentam diferentes necessidades nutricionais. Os resultados aqui obtidos mostram que a levedura *T. globosa* (1S112) tem a capacidade de produção de AIA em meio BDA suplementado com triptofano, tornando o papel de filtro ou membrana de nitrocelulose, avermelhados depois de pipetado sobre eles o reagente de Salkowski (Figura 31).

Há vários relatos da ação do fitormônio AIA no controle biológico de fitopatógenos. Brown e Hamilton (1993) observaram que a ação do AIA sobre esporos fúngicos de diferentes patógenos inibiu a germinação e o crescimento micelial de forma significativa. Droog (1997) afirmou que a atuação do AIA no controle de fitopatógenos está relacionada à indução de resistência da planta hospedeira. Yu et al. (2008) avaliaram a ação da levedura *C. laurentii* e do AIA (20 µg/ml) no controle de *B. cinerea* causador da podridão em maçãs, e observaram que a levedura sozinha não foi capaz de controlar o fungo, sendo que em conjunto com o AIA a inibição do crescimento fúngico foi 50% maior.

Os dados obtidos neste trabalho indicam que *T. globosa* (linhagem 1S112) é capaz de produzir AIA, sendo, portanto uma levedura com potencial de agente de controle biológico e promotora de crescimento vegetal. Além da produção de toxina *killer* e a competição por nutrientes e espaço, a linhagem 1S112, produzindo o fitormônio AIA, pode contribuir para a inibição do desenvolvimento fúngico (diretamente ou pela promoção do crescimento vegetal), mostrando que diferentes mecanismos podem estar envolvidos no antagonismo.

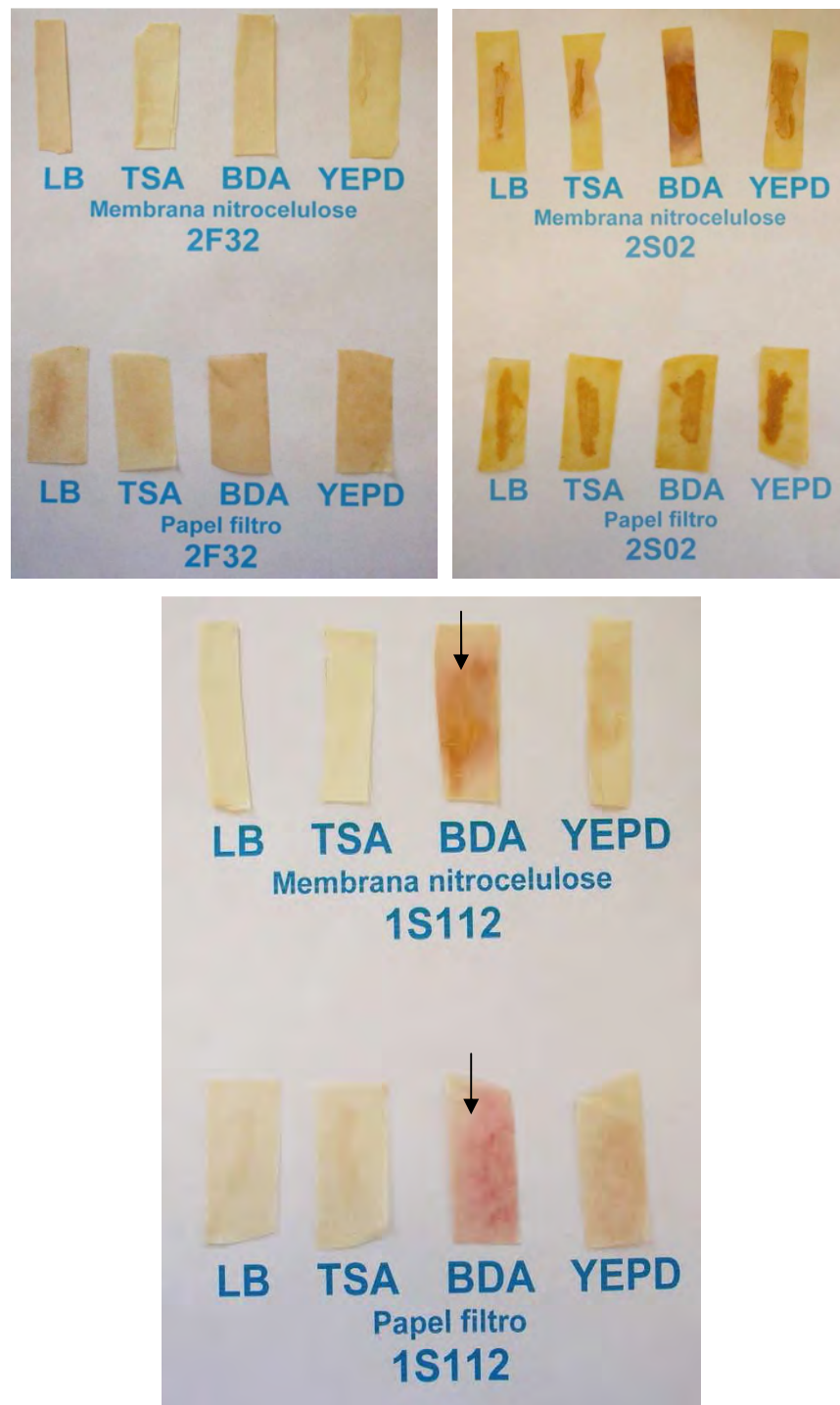


Figura 31. Membrana de nitrocelulose e papel de filtro indicando, através da coloração avermelhada (setas), a produção de AIA pela levedura *T. globosa* (1S112). Legenda: meios de cultura (LB – Luria Bertani; TSA – *Tryptic Soy Ágar*; BDA e YEPD); 2F32 – linhagem de *Rh. mucilaginoso*; 2S02 – linhagem de *C. intermedia*; 1S112 – linhagem de *T. globosa*.

5.7.2. Solubilização de fosfatos insolúveis

Este experimento objetivou a avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis pelas leveduras testadas. A levedura *T. globosa* (1S112) apresentou um halo translúcido ao redor da colônia indicando ser um microrganismo solubilizador de fosfato. O mesmo não foi observado para as leveduras *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32), Figura 32.

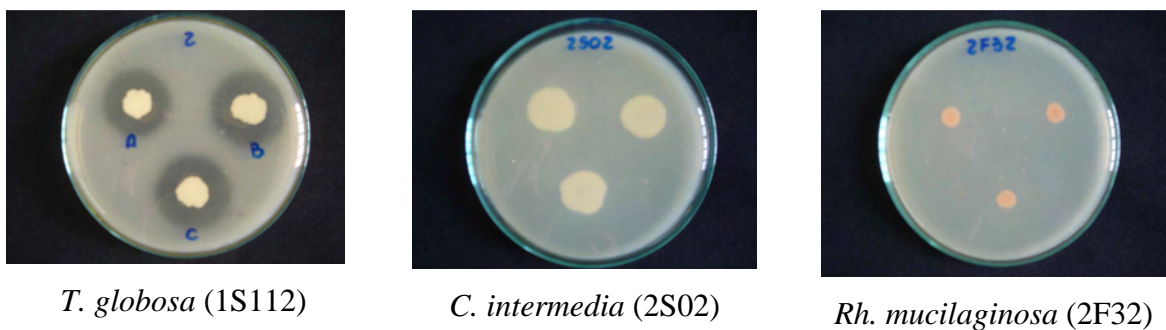


Figura 32. Avaliação da solubilização de fosfato insolúvel pelas leveduras *in vitro*, em meio PDYA, a 25°C, após 3 dias de cultivo.

A solubilização de fosfatos e outros minerais no solo geralmente ocorre através da produção de ácidos orgânicos, que podem vir acompanhados da produção de outros metabólitos que apresentam a capacidade de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos de solo. Estudos *in vitro* mostram o potencial destes organismos em simultaneamente solubilizar minerais e sintetizar compostos que suprimem patógenos como sideróforos, fitormônios e enzimas líticas (VASSILEV et al., 2006). É possível observar esse comportamento em bactérias, como *Pseudomonas* sp. (CATTELAN et al., 1999) e *Bacillus* sp. (DEY et al., 2004), além de fungos filamentosos como *Trichoderma harzianum* (ALTOMARE et al., 1999), *Penicillium variable* (FENICE et al., 2000), e fungos micorrízicos arbusculares (JOHANSSON et al., 2004). Vora e Shelat (1998) isolaram uma linhagem de *T. globosa* na Índia, e após processo de seleção de microrganismos solubilizadores de fosfato, observaram que essa espécie apresentou ótimos resultados, sendo o único microrganismo capaz de solubilizar fosfato tricálcico devido à sua habilidade em produzir ácido acético.

Esta característica – solubilização de fosfatos insolúveis – é de grande importância para a sustentabilidade do ambiente, pois os fosfatos naturais (insolúveis), que se dissolvem lentamente na solução do solo, apresentam menor eficiência que os fosfatos solúveis ou

industrializados em curto prazo, porém, em longo prazo, seu efeito residual é geralmente maior (KORNDORFER et al., 1999).

5.7.3. Solubilização de rochas potássicas

Além do fósforo, o potássio (K) é um nutriente essencial no desenvolvimento das plantas, e, por isso, é de extrema importância para a produtividade das principais culturas. É muito utilizado na agricultura brasileira, porém sua produção nacional representa apenas 10% de todo o potássio utilizado (MORAES, 2005). Com o intuito de reduzir os impactos negativos na balança comercial, no que se refere ao uso de adubos químicos e visando maior sustentabilidade ambiental e agrônômica, algumas tentativas têm sido feitas para se utilizar rochas diretamente no solo. Entretanto, o longo tempo necessário para alteração dos minerais contidos nas rochas e disponibilização de elementos importantes para a nutrição de plantas, pode inviabilizar esta alternativa.

A partir do resultado demonstrando que a levedura *T. globosa* (1S112) apresenta a capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis, houve o interesse em se avaliar a capacidade deste isolado em solubilizar o potássio a partir de pó-de-rocha ultramáfica alcalina, uma vez que há poucos trabalhos de biossolubilização de potássio por microrganismos, especialmente leveduras.

Os resultados (tabelas estatísticas constantes no Anexo VI) mostraram que a levedura apresentou solubilização significativa do pó-de-rocha com liberação de potássio (Figura 33). Houve aumento da acidez titulável e diminuição do pH nos tratamentos onde a levedura foi inoculada, indicando produção de ácidos, o qual deve ser o provável mecanismo de solubilização da rocha. Vora e Shelat (1998) já haviam verificado este mecanismo para a solubilização de fosfato tricálcico, mostrando também aumento significativo na produtividade das culturas inoculadas se comparadas às não-inoculadas, testando diferentes culturas no campo.

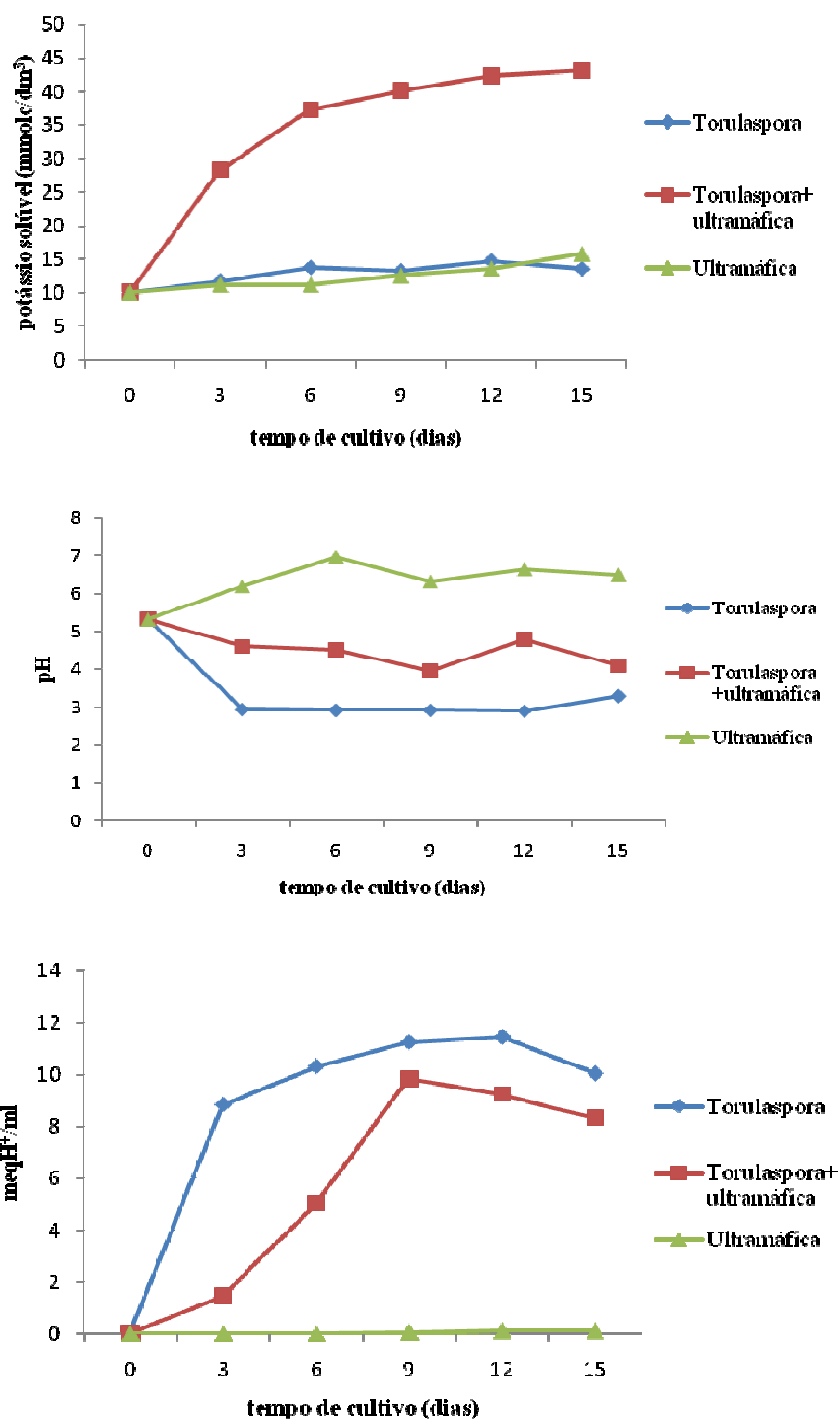


Figura 33. Potássio solúvel (mmol_c/dm³), pH e acidez titulável (meqH⁺/ml) do meio de cultura contendo pó-de-rocha ultramáfica alcalina, pH 5,3, inoculado com *T. globosa* (1S112).

Trabalhos anteriores empregando o mesmo pó de rocha, na mesma escala (200 mL de meio em frascos de 500 ml) e condições de cultivo, porém utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger*, apresentaram resultados inferiores de potássio solúvel liberado (Avansini et al., 2008). Com a levedura, houve a solubilização de mais de 1 mmol/dm³ após 15 dias de incubação, enquanto o fungo *A. niger* necessitou de 30 dias para alcançar o mesmo resultado.

Esta levedura pode oferecer grande potencial para aplicações biotecnológicas, principalmente na produção de ácidos orgânicos e solubilização de rochas para produção de biofertilizantes. O fato de esta levedura ser encontrada na rizosfera da cana-de-açúcar apresenta-se como um fator positivo, sendo que a aplicação de pós de rocha em solos agrícolas depende grandemente da presença destes microrganismos para transformar os nutrientes insolúveis em formas disponíveis para absorção das plantas, auxiliando na sua nutrição e desenvolvimento. Desta forma, a levedura pode contribuir para a promoção do crescimento vegetal, e desta forma auxiliar indiretamente no controle biológico de fitopatógenos.

5.8. Experimentos *in vivo*

5.8.1. Avaliação do controle biológico de *Colletotrichum sublineolum* em sorgo pelo isolado de levedura *T. globosa* (1S112).

Após a observação *in vitro* do controle do crescimento micelial do fungo fitopatogênico *C. sublineolum*, causador da antracnose em sorgo, pela levedura *T. globosa* (1S112), realizou-se um experimento *in vivo*, em casa-de-vegetação, para avaliação do controle biológico, sendo que os resultados se encontram na Figura 34.

O tratamento T6, no qual foi aplicado o controle químico com o fungicida Metiltiofan, apresentou os melhores resultados na inibição da doença. Os tratamentos T3 e T5, com a aplicação da levedura 24 horas antes ou após a inoculação do fungo, respectivamente, apresentaram controle da doença, não diferindo significativamente do tratamento controle (T1) sem nenhum tipo de inoculação, sendo, porém, estatisticamente diferente do tratamento T4, no qual foi inoculado somente o fungo, após 6 semanas de cultivo do sorgo.

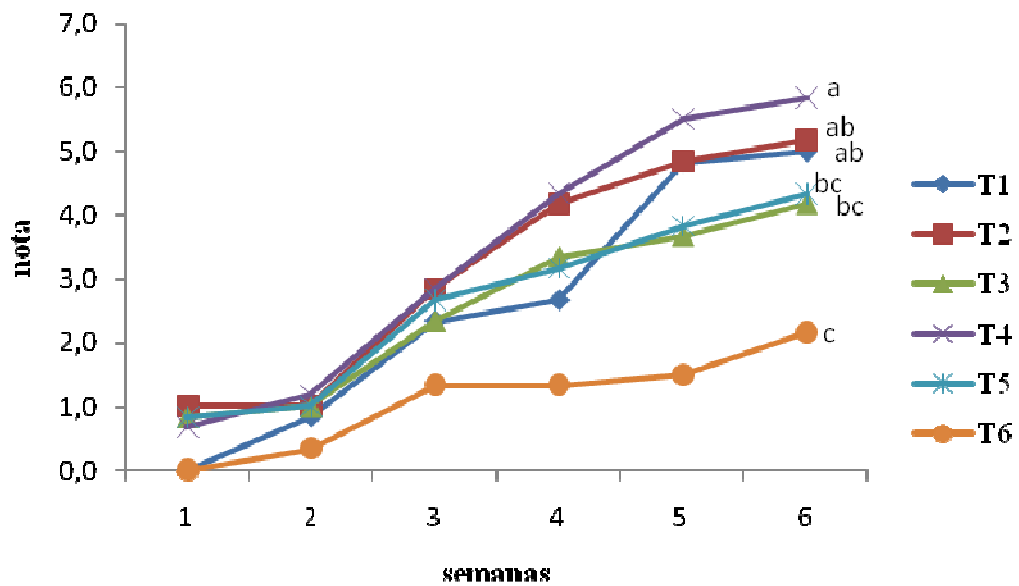


Figura 34. Avaliação do desenvolvimento da antracnose em sorgo, em casa-de-vegetação, por um período de 6 semanas, utilizando-se uma escala de 0 a 10 (0 a 100% dos sintomas em folhas). Legenda: T1 – controle (sem nenhum tratamento); T2 – levedura inoculada junto com o fungo; T3 – levedura inoculada 24 horas após o fungo; T4 – inoculação do fungo; T5 – levedura inoculada 24 horas após o fungo; T6 – aplicação do fungicida Metiltiofan e inoculação do fungo 48 horas depois. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% entre os tratamentos pelo teste de Tukey. A escala de notas está representada na Figura 35.

A inoculação da levedura antes ou após o fungo apresentou-se como a melhor forma de introdução da levedura na planta, graças provavelmente à capacidade da levedura em reproduzir e dominar o ambiente foliar de forma mais rápida, se comparado ao fungo fitopatogênico. Esse fato pode revelar um grande potencial de colonização das folhas por parte da levedura, se estabelecendo antes do fungo. Outros mecanismos possivelmente utilizados podem ser a produção de algum tipo de substância antagônica ou favorecimento das defesas naturais da planta (indução de resistência). No tratamento T5, embora inoculada num momento posterior à inoculação do fungo, a levedura pode apresentar rápido e eficiente crescimento, sendo capaz de colonizar a folha num tempo menor que o fungo diminuindo a infecção e colonização sobre as células do hospedeiro (sorgo). Dessa forma, provavelmente, ocorreu uma diminuição do progresso da doença. Os sintomas de antracnose nas folhas de sorgo e um esquema ilustrando os níveis de incidência da doença, com a escala de notas utilizada no experimento, estão dispostos na Figura 35.

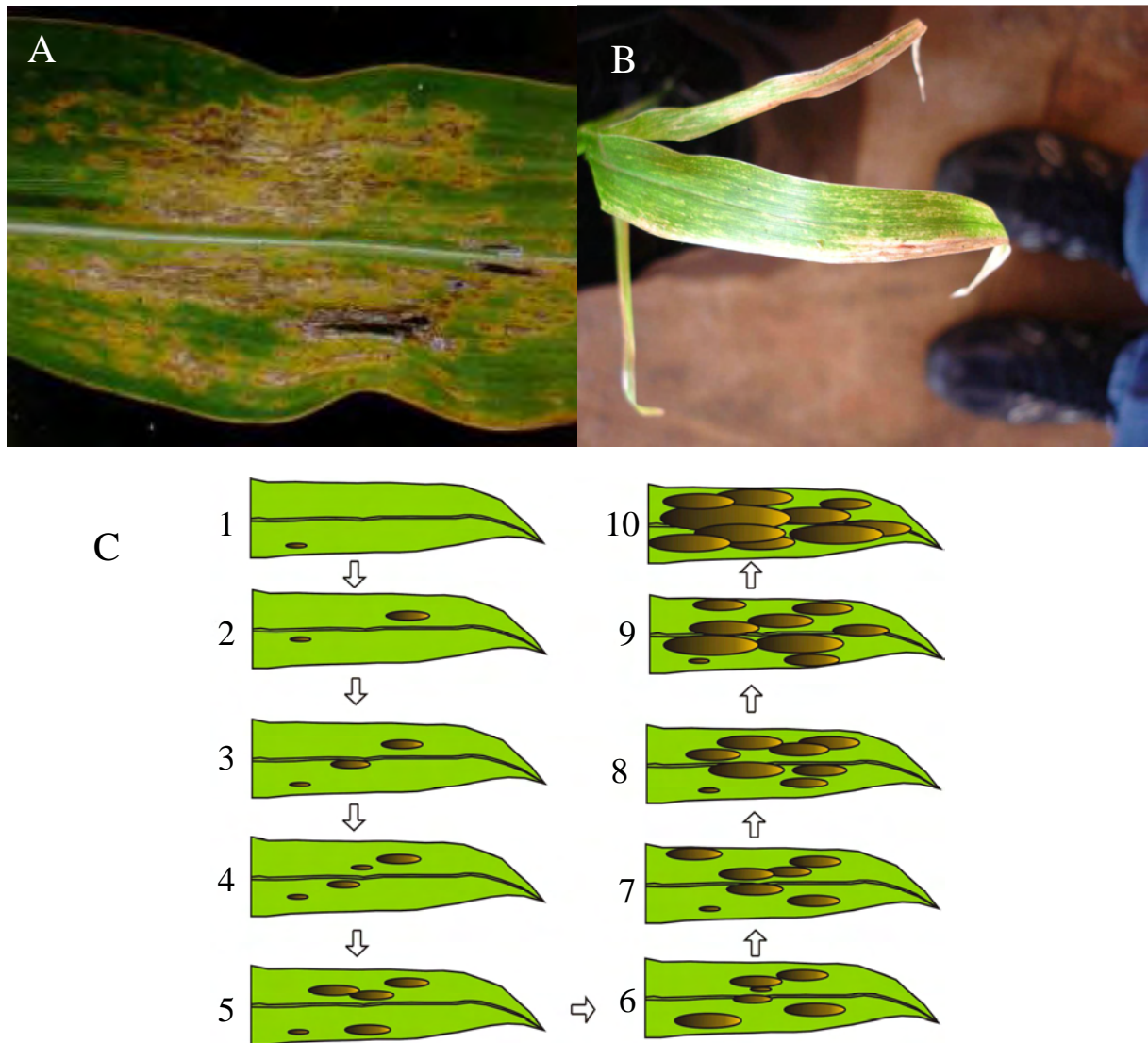


Figura 35. Destaque das folhas de sorgo com sintomas da doença antracnose foliar, causada pelo fungo fitopatogênico *C. sublineolum*. A – fonte: EMBRAPA Milho e Sorgo; B – foto do experimento em casa-de-vegetação (UFSCar); C – esquema ilustrando os níveis de incidência da doença nas folhas de sorgo, e a escala de notas utilizada no experimento.

O tratamento T2, porém, no qual a levedura e o fungo foram inoculados ao mesmo tempo, não diferiu significativamente do tratamento T4 (inoculado somente com o fungo). Esse resultado deve-se, provavelmente a algum tipo de erro no momento da aplicação do inoculo (esporos fúngicos e células de leveduras). A levedura foi borrifada primeiramente, e o fungo aplicado em cima, sendo que este pode ter “lavado” parte das células, ocorrendo uma diminuição do inóculo final da levedura. Este fato, porém, não coloca em dúvida a capacidade da levedura em inibir o desenvolvimento do fungo filamentosos e o estabelecimento da doença, devido os resultados obtidos pelos tratamentos T3 e T5.

Piccinin et al. (2005) realizaram estudo semelhante no controle de *C. sublineolum* em sorgo, porém utilizando como levedura antagônica a espécie *S. cerevisiae* (fermento biológico Fleischmann). Os autores observaram que a aplicação da levedura uma única vez nas plantas (24 horas antes ou após a inoculação do fungo) não foi capaz de controlar o fungo em campo, não apresentando diferença significativa com o tratamento somente com a inoculação do fungo; porém a inoculação semanal da levedura apresentou ótimos resultados no controle do fungo, semelhantes aos observados no tratamento com aplicação de fungicida (tratamento químico).

De acordo com Windels e Lindow (1985) e Tokeshi (1991) citados por Piccinin et al. (2005), as espécies fúngicas de *Colletotrichum* necessitam de fonte de energia externa ao conídio para germinarem, sendo que a competição por nutrientes com a levedura apresenta-se dispendiosa uma vez que esta é eficiente competidora por açúcar do filoplano.

Não foi possível observar diferenças significativas em altura e massa seca da parte aérea entre os tratamentos (Figura 36), o que indicaria que a levedura *T. globosa*, apesar de controlar o desenvolvimento da doença, não promoveu o crescimento vegetal.

Os experimentos *in vitro* demonstraram a capacidade deste isolado na produção de AIA e solubilização de P e K, no entanto, a aplicação nas plantas foi realizada por borrifadores nas folhas, não atingindo o solo e a rizosfera, locais onde a levedura poderia expressar características de promoção de crescimento.

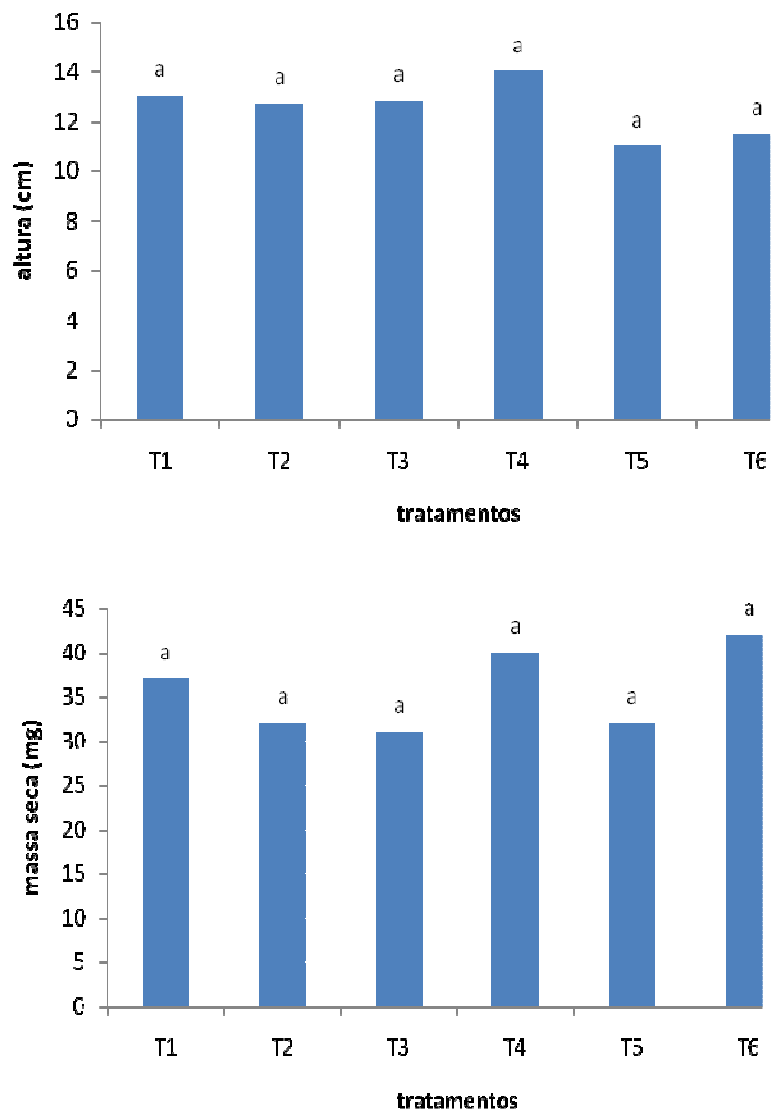


Figura 36. Altura (cm) e massa seca (mg) da parte aérea das plantas de sorgo no momento da colheita após o término do experimento em casa-de-vegetação (após 6 semanas).

Não há na literatura dados sobre *T. globosa* no controle de doenças, porém algumas empresas como as indianas Agriland Biotech Limited e Sundaram Overseas Operation, comercializam biofertilizantes que apresentam em sua composição alguns microrganismos, entre eles a levedura *T. globosa*, à qual são dadas as funções de solubilizadora de fosfatos de rocha e produtora de compostos promotores de crescimento vegetal. No entanto não há comprovação científica, fazendo-se necessário que esta espécie de levedura seja mais profundamente estudada para que suas qualidades, principalmente no controle fúngico, possam ser exploradas e contribuir para a sustentabilidade da produção agrícola brasileira.

5.8.2. Avaliação do controle do desenvolvimento de *Thielaviopsis paradoxa* em toletes de cana-de-açúcar pela levedura *T. globosa*

Foi também realizado um experimento *in vivo* para avaliar a ação da levedura *T. globosa* no controle do fungo fitopatogênico *T. paradoxa* na podridão de toletes de cana. Utilizou-se a variedade RB867515, desenvolvida pela Universidade Federal de Viçosa, que apresenta, entre outras características agrônômicas, alta velocidade de crescimento, porte alto, hábito de crescimento ereto, alta densidade de colmo, de cor verde arroxeado e de fácil despalha. É uma variedade de maturação média, suscetível à podridão abacaxi e estrias vermelhas, e intermediária à podridão de *Fusarium* (Hoffmann, 2008).

Os resultados indicaram que a levedura tem a capacidade de controlar o desenvolvimento de *T. paradoxa* de forma significativa em relação ao tratamento sem a inoculação da levedura (Figuras 37 e 38). A incidência da doença foi verificada pela extensão das lesões escuras no colmo, comparativamente ao tamanho do tolete.

Embora tenha ocorrido a contaminação do tolete de cana-de-açúcar pelo fungo *T. paradoxa* no tratamento controle (sem inóculo), verificou-se o efeito marcante da levedura *T. globosa* no controle da doença, pois no tratamento onde somente a levedura foi inoculada, a incidência da doença foi muito baixa, ou seja, significativamente diferente dos demais tratamentos.

Esse fungo fitopatogênico coloniza a planta através de ferimentos no colmo da cana, sendo um fungo habitante do solo (GAROFALO e McMILLAN, 2004). Durante o processo de plantio são realizados tratamentos químicos (fungicidas) e térmicos dos toletes de cana-de-açúcar para a inibição do crescimento do fitopatógeno. A partir dos resultados obtidos neste trabalho poderia se recomendar a imersão dos toletes em suspensão da levedura *T. globosa*, garantindo-se assim a inibição da colonização e desenvolvimento do fungo fitopatogênico.

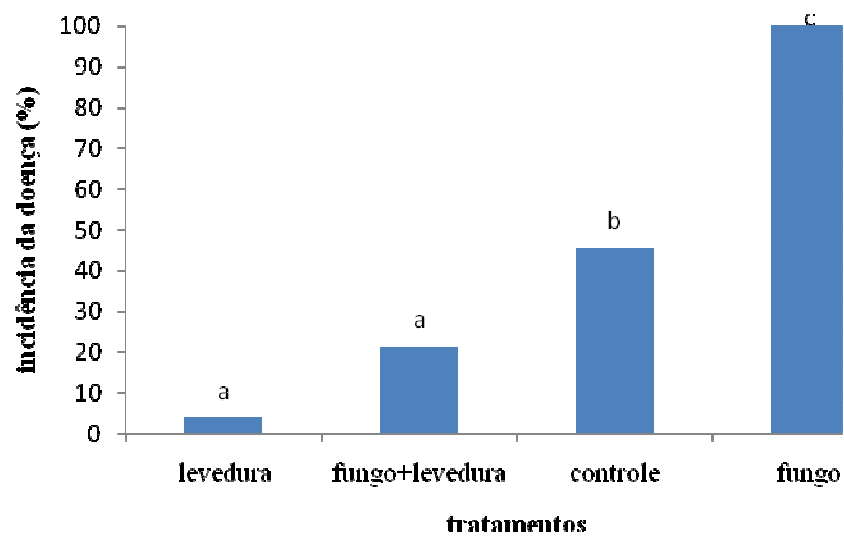


Figura 37. Incidência da doença podridão abacaxi (%) em toletes de cana-de-açúcar, variedade RB72454 causada pelo fungo *T. paradoxa*, após 30 dias de incubação, a 28°C. Legenda: controle – tolete não inoculado com *T. paradoxa* e *T. globosa*; levedura – tolete inoculado somente com *T. globosa*; fungo – tolete inoculado somente com *T. paradoxa*; fungo+levedura – tolete inoculado com *T. paradoxa*+*T. globosa*. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.



SEM INÓCULO



INOCULADO COM FUNGO



INOCULADO COM LEVEDURA



INOCULADO COM LEVEDURA E FUNGO

Figura 38. Aspectos dos toletes de cana-de-açúcar do experimento *in vivo* do controle da podridão abacaxi, causada pelo fungo *T. paradoxa*, pela levedura *T. globosa* (1S112), após 30 dias de incubação, a 28°C, nos diversos tratamentos.

6. CONCLUSÕES

- As leveduras 1S112, 2S02 e 2F32, identificadas como *T. globosa*, *C. intermedia* e *Rh. mucilaginosa*, respectivamente, isoladas da rizosfera e folhas da cana-de-açúcar, apresentaram capacidade de controlar o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos *C. graminicola*, *C. sublineolum* e *T. paradoxa* em testes *in vitro*;

- os mecanismos de ação utilizados pela levedura *T. globosa* (1S112) são a produção de toxina *killer* e a competição por nutrientes do meio;

- as leveduras *C. intermedia* (2S02) e *Rh. mucilaginosa* (2F32) apresentam a capacidade de controlar os fungos filamentosos através de competição por nutrientes do meio e produção de compostos antifúngicos, sendo estes não identificados nos estudos aqui realizados;

- a levedura *T. globosa* (1S112), além de controlar os fitopatógenos, apresenta potencial como promotora de crescimento vegetal, com capacidade de produção de AIA e solubilização de fosfatos e potássios insolúveis;

- os resultados significativos obtidos nos experimentos *in vivo* com a levedura *T. globosa* (1S112) no controle da antracnose em sorgo e da podridão abacaxi em cana-de-açúcar, indicam que esta linhagem constitui-se em uma levedura com potencial para ser utilizada no controle biológico, sendo necessárias análises mais aprofundadas dos compostos antifúngicos por ela produzidos, para isolamento, purificação e caracterização das substâncias.

7. REFERÊNCIAS

AGROBYTE, **Doenças da cana-de-açúcar** – Podridão Abacaxi. Acesso em: http://www.agrobyte.com.br/index.php?pag=cana&cana=podridao_cana, dia: 03/09/2009.

ANDERSEN, D.; RENSHAW, J.C.; WIEBE, M.G. Rhodotorulic acid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Mycology Research**, v.107, n.8, p.949-956, 2003.

ALFONSI, R.R.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, V. Condições climáticas para a cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, v.1, p.42-55, 1987.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.2926-2933, 1999.

ANDERSON, D.W.; R.L. NICHOLSON. Characterization of laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**, v.88, p. 996-1002, 1996.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.204, p.57-67, 1998.

ARRAS, G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. **Postharvest Biology and Technology**, v.8, p.191-198, 1996.

ARRAS, G.; DE CICCO, V.; ARRU, S.; LIMA, G. Biocontrol by yeast of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. **Journal of Horticulture Science and Biotechnology**, v.73, p.413-418, 1998.

ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E.A.A. Antagonism of yeast to *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* on cabbage phylloplane in field. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p.191-195, 1999.

AVANSINI, S.H.; ERLER, G.; LOPES-ASSAD, M.L.; SOARES, M.R.; CASAGRANDE, J.C.; CECCATO-ANTONINI, S.R. *Scale-up* do processo de biossolubilização de pó-de-rocha para liberação de potássio. **Anais do FertBio 2008**, Londrina, 2008.

AVIS, T.J.; BÉLANGER, R.R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.956-960, 2001.

AZEREDO, L.A.I.; GOMES, E.A.T.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, v.1, p.205-208, 1998.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, W.A. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 811p.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, C.P.; MACHADO B.C. Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. **Química nova**, v.25, p.1155-1164, 2002.

BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. Microhumidity chamber for quantitative inoculation of attached corn leaves with fungal pathogens. **Phytopathology**, v.73, p.1040-1042, 1983.

BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v.83, p.596-608, 1999.

BLEVE, G.; GRIECO, F.; COZZI, G.; LOGRIECO, A.; VISCONTI, A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.204-209, 2006.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.535-538, 1991.

BROWN, A.E.; HAMILTON, J.T.G. Indole-3-ethanol produced by *Zygorrhynchus moelleri*, and indole-3-acetic acid analogue with antifungal activity. **Mycological Research**, Houston, v.96, p.71-74, 1993.

BRUCE, A.; DOUGLAS, S.; SUSAN, V.; RON, E.W.; Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p.101-108, 2003.

CABRAL, A.S.; CARVALHO, P.M.B.; PINOTTI, T.; HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; MACRAE, A. Killer yeast inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, p.108-110, 2009.

CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; SANZ DE TOSETTI, M.I. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the post-harvest pathogen *Penicillium expansum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.43, p. 167–172, 1999.

CALVO, J.; CALVENTE, V.; DE ORELLANO, M.E.; BENUZZI, D.; DE TOSETTI, M.I.S. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. **BioControl**, v.48, p.579-593, 2003.

CAPDEVILLE, G.; SOUZA JÚNIOR, M.T.; SANTOS, J.R.P.; MIRANDA, S.P.; CAETANO, A.R.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M. Scanning electron microscopy of the interaction between *Cryptococcus magnus* and *Colletotrichum gloeosporioides* on papaya fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.42, n.11, p.1537-1544, 2007.

CASAGRANDE, S.A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, p.157, 1991.

CASELA, C.R. **Investigations on the variability of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola***. 1992. Tese de Doutorado - Texas A & M University, 1992.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, F.G. Associação de virulência de *Colletotrichum graminicola* à resistência genética em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.143-146, 1998.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, F.G. Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixtures. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.217-219, 2001.

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

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACÍFICO, S.; DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Biotechnology**, v.22, p.7-17, 2001.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, Palo Alto, v.63, p.1670-1680, 1999.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SANINO, A.; ARAÚJO, J.C.; TOSTA, C.D. The killer yeast and the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. esp., p.40-46, 2005.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; TOSTA, C.D.; SILVA, A.C. Determination of yeast killer activity in fermentating sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, p.13-23, 2004.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M.P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Plant Soil**, The Hague, v. 184, p. 311-321, 1996.

CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; BHINYO, P. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control**, v.47, p.326-335, 2007.

CHANCHAICHAOVIVAT, A.; BHINYO, P.; RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. **Biological Control**, v.47, p.207-215, 2008.

CHAND-GOYAL, T.; SPOTTS, R.A. Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. **Biological Control**, v.6, p.253-259, 1996.

CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L.M.S.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research**, v.160, p.75-81, 2005.

CHOUDHURY, S.R.; TRAQUAIR, J.A.; JARVIS, W.R. 4-metil-7,11-heptadecadinenal and 4-metil-7,11-heptadecadienoic acids: new antibiotics from *Sporothrix flocculosa* and *Sporothrix rugulosa*. **Journal of Natural Products**, v.57, p.700-704, 1994.

CIA, P. 2005. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 2005. 197p. Tese de doutorado - Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

COELHO, A.R. **Controle de *Penicillium expansum* / Biodegradação de Patulina: Perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita**. 2005. 130p. Tese de doutorado - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathology Society, 1983. 539p.

COSTA, R.V.; CASELA, C.R.; ZAMBOLIM, L.; FERREIRA, A.S. A antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.4, p.345-354, 2003.

CRUZ, J.C., MONTEIRO, J.A., SANTANA, D.P., GARCIA, J.C., BAHIA, F.G.F.T.C., SANS, L.M.A. & PEREIRA FILHO, I.A. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Serviço de produção de informação. 2ª edição. 1996.

DAVE, B.P.; DUBE, H. Detection and chemical characterization of siderophores of rhizobacterial fluorescent pseudomonads. **Indian Phytopathology**, v.53, p.97-98, 2000.

DEY, R.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promotion rhizobacteria. **Microbiological Research**, v.159, p.371-394, 2004.

DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. (Eds.) **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables –theory and practice**. CRC Press, 1994, p.63-75.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p.794-800, 1989.

DROBY, S.; COHEN, L.; DAUS, A.; WEISS, B.; HOREV, B.; CHALUTZ, E.; KATZ, H.; KEREN-TZUR, M.; SHACHNAI, A. Commercial testing of Aspire: A yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. **Biological Control**, v.12, p.97-101, 1998.

DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHAND-GOYAL, T.; ECKERT, J. W.; MANULIS, S. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. **Biological Control**, v.16, p.27-34, 1999.

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*. **Phytopatology**, v.92, p.393-399, 2002.

DROOG, F. Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.16, p.95-107, 1997.

DRUVEFORS, U.A.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J. Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.1865-1869, 2005.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p.501-38, 2003.

EL-DASH, A.A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N.M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: FTPT, 1980. 349p.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopatology**, v.88, p.282-291, 1998.

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

EL-MEHALAWY, A.A.; HASSANEIN, N.M.; KHATER, H.M.; KARAM EL-DIN, E.A.; YOUSSEF, Y.A. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.6, p.599-605, 2004.

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

EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Biomedical and Life Sciences**, v.47, n.1, p.25-35, 2006.

FENICE, M.; SELBMANN, L.; FEDERICI, F.; VASSILEV, N. Application of encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. **Bioresource Technology**, v.73, p.157-162, 2000.

FERRARI, J.T. Podridão negra do abacaxi. **Comunicados Técnicos – Instituto Biológico**, disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=75, acesso em: 08/09/2009.

FERREIRA, J.H.S.; MATTHEE, F.N.; THOMAS, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, v.81, v.3, p.283-287, 1991.

FERREIRA, M.C.; WERNECK, C.F.; FURUHASHI, S.; LEITE, G.J. Tratamento de toletes de cana-de-açúcar para o controle da podridão-abacaxi em pulverização conjugada ao plantio mecanizado. **Engenharia Agrícola**, v.28, n.2, p.263-273, 2008.

FIALHO, M.B. Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. 2004. 60p. Dissertação de mestrado - Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FILONOW, A.B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p.243-256, 1998.

FOKKEMA, N.J. Competition for endogenous and exogenous nutrients between *Sporobolomyces roseus* and *Cochliobolus sativus*. **Canadian Journal of Botany**, v.62, p.2463-2468, 1984.

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

FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.358-364, 1997.

FRENGOVA, G.I.; BESHKOVA, D.M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia* : yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n.2, p.163-180, 2008.

FUENTEFRÍA, A.M.; PEREZ, L.R.R.; AZEVEDO, P.A.; PAZZINI, F.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.; VALENTE, P. Typing of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains by a selected panel of Brazilian killer yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, v.48, n.1, p.25-30, 2008.

GAMAGAE, S.U.; SIVAKUMAR, D.; WIJESUNDERA, R.L.C. Evaluation of post-harvest application of sodium bicarbonate-incorporated wax formulation and *Candida oleophila* for the control of anthracnose of papaya. **Crop Protection**, v.23, p.575-579, 2004.

GARAVAGLIA, J.; FLÔRES, S.H.; PIZZOLATO, T.M.; PERALBA, M.C.; AYUB, M.A.Z. Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.23, p.1273-1279, 2007.

GAROFALO, J.F.; McMILLAN, R.T. *Thielaviopsis* disease of palms. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.117, p.324-325, 2004.

GOLUBEV, W.I. Mycocins (killer toxins). In: KURTTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds.) **The yeasts, a taxonomic study**. London:Academic Press, 1998, p. 55-62.

GOODAY, G.W. Cell walls. In: GOW, N.A.R.; GADD, G.M. (eds.) **The growing fungus**. London:Chapman and Hall, 1995, p.41-62.

GOTO, K.; MORIKAWA, S.; SATO, H.H.; PARK, Y.K. Characteristics of the killer yeast n.337 isolated from alcohol fermentation mash in Brazil. **Journal of the Brewing Society of Japan**, v.85, p.895-899, 1990.

GUIMARÃES, F.B.; CASELA, C.R.; SANTOS, F.G.; FERREIRA, A.S. Controle da antracnose do sorgo através da utilização de mistura de cultivares. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.24, p.131-135, 1998.

HAJLAOUI, M.R.; TRAQUAIR, J.A.; JARVIS, W.R.; BÈLANGER, R.R. Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. **Biocontrol Science Technology**, v.4, p.229-237, 1994.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v.55, n.2, p.77-84, 1999.

HELBIG, J. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. **BioControl**, v.47, p.89-99, 2002.

HOFFMANN, H.P.; SANTOS, E.G.D.; BASSINELLO, A.I.; SANCHES, M.A. **Variedades RB de Cana-de-açúcar**: Informativo Técnico (1ªed), Araras:CCA-UFSCar, 2008, p.30.

HOFTE M.; POPPE, L.; DRUVEFORS, U.; SCHNURER, J.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P.; STÈPIEN, V.; JIJAKLI, M.H. Modes of action of *Candida sake* CPA-1, *Pantoea agglomerans* CPA-2, *Epicoccum nigrum* 282 and *Pichia anomala* J121, effective antagonists of postharvest pathogens. In: **International Workshop Disease Biocontrol in Food Production: development of biocontrol agents of fungal diseases for commercial applications in food production systems**, Seville, Spain, March 24-27, p.27, 2004.

HUANG, C. Jr.; LEE, S.L.; CHOU, C.C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. **Food Research International**, v.34, p.277-282, 2001.

HUSSEIN, H.S.; MACKIE, R.I.; MERCHEN, N.R.; BAKER, D.H.; PARSONS, C.M. Effects of oleaginous yeast in growth performance, fatty acid composition of muscles, and energy utilization by poultry. **Bioresource Technology**, v.55, p.125-130, 1996.

INNOCENTI, G.; ROBERTI, R.; MONTANARI, M.; ZAKRISSON, E. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. **Mycological Research**, Houston, v.107, n.4, p.421-427, 2003.

IZGU, F.; ALTINBAY, D. Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on Gram-positive pathogenic bacteria. **Microbios**, v.89, p.15-22, 1997.

JAMIL, F.F.; NICHOLSON, R.L. Susceptibility of corn to isolates of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to other grasses. **Plant Disease**, v.71, p.809-810, 1987.

JANISIEWICZ, W.J.; TWORKOSKI, T.J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopatology**, v.90, p-1196-1200, 2000.

JJAKLI, M.H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an α -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, v.88, p.335-343, 1998.

JOHANSSON, J.; PAUL, L.R.; FINLAY, R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, v.1, p.1-13, 2004.

KANDEL, J.; KOLTIN, Y. Killer phenomenon in *Ustilago maydis*: comparison of killer proteins. **Experimental Mycology**, v.2, p.270-278, 1978.

KAZANTSEVA, D.I.; ZIMINA, M.S. Yeast killer strains with a broad spectrum of activity: search of collection strains and preliminary identification. **Microbiologiya**, v.58, p.230-235, 1989.

KORNDÖRFER, G.H.; LARA-CABEZAS, W.A.; HOROWITZ, N. Eficiência agronômica de fosfatos naturais reativos na cultura do milho. **Scientia Agricola**, v.25, p.1-10, 1999.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and Yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a Taxonomy Study**, 4th Edition. Amsterdam: Elsevier, 1998, p. 21-30.

LASSOIS, L.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; JJAKLI, M.H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. **Biological Control**, v.45, p.410-418, 2008.

LEITE, B.; RONCATO, L.D.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: LUZ, C.W.; FERNANDES, J.M.S.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, v.5, p.235-280, 1997.

LEVY, R.M. **Aplicação de leveduras no controle de *Penicillium expansum***. 2003. Tese de doutorado (Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Controle Biológico**. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p.263-304, 2000.

LORITO, M.; WOO, S.L.; D'AMBROSIO, M.; HARMAN, G.E.; HAYES, C.K. KUBICEK, C.P.; SCALA, F. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affection compounds. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.9, p.206-213, 1996.

LIPPS, P.E. Influence of inoculum from buried and surface corn residues on the incidence of corn anthracnose. **Phytopathology**, v.75, p.1212-1216, 1985.

LUCHESE, R.H.; HARRIGAN, W.F. Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutrition factors. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v.74, p.5-14, 1993.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ªed., Pearson Education do Brasil, 2004.

MAKOWER, M.; BEVAN, E.A. The physiological basis of the killer character in yeast. In: **Genetics Today, XI International Congress of Genetic**, v.1, p.202-203, 1963.

MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, J.F.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.2, 2005.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.1, 1998.

MARTINEZ NOEL, G.M.A.; MADRID, E.A.; BOTIN, R.; LAMATTINA, L. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the

patogen growth in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.815-823, 2001.

MASIH, E.I.; ALIE, I.; PAUL, B. Can the grey mold disease of grape-vine be controlled by yeast? **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p.233-237, 2000.

MASIH, E.I.; PAUL, B. Secretion of beta-1,3-glucanase by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing mold disease of the grapevine. **Current Microbiology**, New York, v.44, p.391-395, 2002.

MASIH, E.I.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; MARMARAS, I.; AIT-BARKA, E.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.202, n.2, p.227-232, 2001.

McCORMACK, P.J.; WILDMAN, H.G.; JEFFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.3, p.927-931, 1994.

MEDINA, A.; VASSILEVA, M.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Chemosphere**, Oxford, v.56, p.449-456, 2004.

MENEGHIN, M.C.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentations by killer yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, 2009, no prelo.

MENEGHIN, S.P. **Efeito da aplicação de fitorreguladores em rizobactérias isoladas de diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) no município de Araras/SP.** 2008, 95p. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2008.

MIDDELBEEK, E.J.; HERMANS, J.M.H.; STUMM, C. Production, purification and properties of *Pichia kluyveri*, killer toxin. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.45, n.3, p.437-450, 1979.

MILAGRES, A.M.F.; MACHUCA, A.; NAPOLEÃO, D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p.1-6, 1999.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p.426-429, 1959.

MILLER, M.W. Yeasts in food spoilage: an update. **Food Technology**, v.33, p.76-80, 1979.

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

MORACE, G.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system. **Mycopathology**, v.84, p.81-85, 1984.

MORAES, V. (2005), **Pó de rocha será nova fonte de potássio para a agricultura**. disponível em: <<http://www.floraefauna.com/artigostecnicos/artigo16.htm>. acesso em: 03/10/2005.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.33, p.603-612, 2001.

NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKI, F.; FUKUHARA, S.; HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**, v. 89, n.3, p.285-290, 2005.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology Fertilization Soils**, v.42, p.97-108, 2005.

NAYLOR, V.D.; LEONARD, K.J. Survival of *Colletotrichum graminicola* in infected corn stalks in North Carolina. **Plant Disease Reporter**, v.61, p.382-383, 1977.

NICHOLSON, R.L.; MORAES, W.B.C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v.70, p.255-261, 1980.

PANDE, S.; THAKUR, R.P.; KARUNAKAR, R.I.; BANDYOPADHYAY, R.; REDDY, B.V.S. Development of screening methods and identification of stable resistance to anthracnose in sorghum. **Field Crops Research**, v.38, p.157-166, 1994.

PASCHOLATTI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R.L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.42, p.37-51, 1993.

PASCHOLATTI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3ªed., Agronômica Ceres, v.1, cap.22, p.417- 453, 1995.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soils. **The Yeasts**, London:Academic Press, 1987, 508p., p.123-180.

PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T.W. The occurrence of killer character in yeast of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.41, p.147-151, 1975.

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

PINTO, N.F.J.A. Controle químico da antracnose (*Colletotrichum graminicola*) do sorgo.

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.2, n.3, p.148-152, 2003.

PONTES, M.F.C. **Características fisiológicas e morfológicas de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. e avaliação de fontes de resistência em milho (*Zea mays* L.)**. 1987, Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1987.

PRABHU, V.; BIOLCHINI, P.F.; BOYER, G.L. Detection and identification of ferricrocin produced by ectendomycorrhizal fungi in the genus *Wilcoxina*. **BioMetals**, v.9, p.229-234, 1996.

PUNJA, Z.K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.216-235, 2001.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.21, n.9, p.400-407, 2003.

RABOSTO, X.; CARRAU, M.; PAZ, A.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E; CARRAU, F.M. Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.57, n.3, p.332-338, 2006.

RADLER, F.; HERZBERGER, S.; SCHONIG, I.; SCHWARZ, P. Investigation of killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. **Journal of Genetic Microbiology**, v.139, n.3, p.495-500, 1993.

RADLER, F.; PFEIFFER, P.; DENNART, M. Killer toxins in new isolates of the yeast *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v.19, p.269-272, 1985.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-20, 2001.

REDDY, B.P.; REDDY, K.R.N.; SUBBA RAO, M.; RAO, K.S. Efficacy of antimicrobial metabolites of *Pseudomonas fluorescens* against rice fungal pathogens. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.1, n.2 p.178-182, 2008.

REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.28, n.1, 2004.

REYES, M.E.Q.; ROHRBACH, K.G.; PAULL, R.E. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.33, p.193-203, 2004.

ROGERS, D.; BEVAN, E.A. Group classification of killer yeast based on cross reactions between strains of different species and origin. **Journal of General Microbiology**, v.100, p.199-202, 1978.

RONCATTO, M.C.; PASCHOLATTI, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.3, 1998.

SANCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R.M.; CARDENAS, E.; CORDOVA, J. GONZALES, O.; SAMUELS, G.J. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, v.163, p.49-58, 2007.

SANSONE, G.; REZZA, I.; CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M.I.S. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Postharvest Biology and Technology**, v.35, p.245-251, 2005.

SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, v.159, p.331-338, 2004.

SARAVANAKUMAR, D.; CIAVORELLA, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. **Postharvest Biology and Technology**, v.49, n.1, p.121-128, 2008.

SCHALL, R.A.; NICHOLSON, R.L.; WARREN, H.L. Influence of light on maize anthracnose in the greenhouse. **Phytopatology**, v.70, p.1023-1026, 1980.

SCHIRMBOCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.L.; HAYES, C.K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma hanzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.4364-4370, 1994.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.46-56, 1997.

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

SHERIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; BAILEY, J.A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, Houston, v.99, p.475-478, 1995.

SHIMIZU, K.; ADACHI, T.; KITANO, K.; SHIMAZAKI, T.; TOTSUKA, A.; HARA, S.; DITTRICH, H. H. Killer properties of wine yeast and characterization of killer wine yeasts. **Journal of Fermentation and Technology**, v.63, p.421-429, 1985.

SHURTLEFF, M.C. A compendium of corn diseases. Sta. Paul, Minnesota. **American Phytopathological Society**, 1980.

SILVA, S.R.; PASCHOLATTI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under

greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.99, n.2, p.159-167, 1992.

SILVA-FILHO, E.A.; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; MORAIS, J.O.F.; MORAIS JUNIOR, M.A.; SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.88, p.13–23, 2005.

SOARES, G.A.M.; SATO, H.H. Killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischmann and Itaiquara commercial brands of yeast. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, n.3, p.253-257, 1999.

SOARES, G.A.M.; SATO, H.H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.291-297, 2000.

SOBRAL, L.F.; FONTES JÚNIOR, R.C.; VIANA, R.D. e MARTINS, E.S. Liberação de potássio pelo flogopitito, ultramáfica e brecha em um latossolo amarelo dos tabuleiros costeiros. **Espaço & Geografia**, v.9, p.117-133, 2006.

SOUCHIE, E.L.; ABBOUD, A.C.S.; CAPRONI, A.L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v.23, n.2, p.53-60, 2007.

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.30, n.2, 2006.

SPADARO, D.; VOLA, R.; PIANO, S.; GULLINO, M.L. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, p123-143, 2002.

STUMM, C.; HERMANS, J.M.H.; MIDDELBEEK, E.J.; CROES, A.F.; DE VRIES, G.J.M. Killer sensitive relationships in yeasts from natural habitats. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.43, p.125-128, 1977.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TIPPER, D.J.; BOSTIAN, K.A. dsRNA killer systems in yeast. **Journal of Microbiology Review**, v.48, p.125-156, 1984.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.207-25, 2005.

UNICA, **União da Indústria de Cana-de-açúcar**, Produção Brasil – Álcool etílico, disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>, acesso em: 02/09/2009.

URQUHART, E.J.; MENZIES, J.G.; PUNJA, Z.K. Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Shaerotheca fuliginea*) on greenhouse cucumbers. **Phytopathology**, v.84, p.341-351, 1994.

URQUHART, E.J.; PUNJA, Z.K. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.219-229, 2002.

VANCETTO, G.T.; ROSA, M.M.; CECCATO- ANTONINI, S.R. Thermal shock replacing glass beads for cell lysis in yeast genomic DNA extraction. In: **Genetics and Molecular Biology Meeting**, Princeton, EUA, p.213, 2006.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.71, p.137-144, 2006.

VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J. M.; VASSILEV, N. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.35, p. 693–697, 2000.

VORA, M.S.; SHELAT, H.N. *Torulospora globosa*: a unique strain solubilizing tricalcium phosphate. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.68, n.9, p.630-631, 1998.

WALKER, G.M.; MCLEOD, A.H.; HODGSON, V.J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v.127, p.213-222, 1995.

WANG, W.L.; CHI, Z.M.; LI, J.; WANG, X.H. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. **Bioresource Technology**, v.100, p.2639-2641, 2009.

WANG, X.; LI, G.; JIANG, D.; HUANG, H.C. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. **Biological Control**, v.50, n.2, p.164-171, 2009.

WARREN, H.L. Leaf anthracnose. In: FREDERIKSEN, R.A. (Ed.). **Compendium of Sorghum Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society. 1986. pp.10-11.

WEILER, F.; SCHMITT, M.J. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.69-76, 2003.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND; D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1994. p. 315-321.

WICKNER, R.B. The killer double-stranded RNA plasmids of yeast. **Plasmids**, v.2, p.303-322, 1979.

WILSON, C.L.; GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J.Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, v.78, p.837-844, 1994.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.425-441, 1989.

WINKELMANN, G. Importance of siderophores in fungal growth, sporulation and spore germination. In: HAWKSWORTH, D.L. (ed) **Frontiers in Mycology**. CAB International, p.49-65, 1991.

WISNIEWSKI, M. E.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C. L.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.39, p.245-258, 1991.

WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.51, n.1, p.115-126, 1968.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A.K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants, **Plant and Soil**, The Hague, v.235, n.2, p.235-242, 2001.

YOUNG, T.W. The properties of brewing performance of brewing yeast possessing killer character. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.42, p.1-4, 1982.

YOUNG, T.W.; YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeast and its classification. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.44, p.59-77, 1978.

YOUNG, T.W. The properties of brewing performance of brewing yeasts possessing killer character. **Journal of American Society of Brewing Chemistry**, v.42, p.1-4, 1982.

YU, T.; ZHANG, H.; LI, X.; ZHENG, X. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in apple fruit by *Cryptococcus laurentii* and indole-3-acetic acid. **Biological Control**, v.46, p.171–177, 2008.

ZHANG, H.; FU, C.; ZHENG, X.; XI, Y.; JIANG, W.; WANG, Y. Control of postharvest *Rhizopus* rot of peach by microwave treatment and yeast antagonist. **European Food Research Technology**, v.218, p.568-572, 2004.

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, n.1, p.113-120, 2008.

ANEXO I

Meios e soluções utilizados nos cultivos e ensaios

Todos os meios de cultura e soluções utilizados foram, quando necessário, autoclavados por 120°C e 1 atm por 20 minutos.

Agarose 0,8% - 0,8 g de agarose dissolvido em 100 ml de água milli-Q. Para dissolução total da agarose, esta sofreu aquecimento em microondas.

CIA - clorofórmio e álcool isoamílico (24:1).

Clorofane - fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1).

Etanol 60% - 60 ml de etanol absoluto misturado à 40 ml de água destilada.

Etanol 70% - 70 ml de etanol absoluto misturado à 30 ml de água milli-Q. A solução foi mantida em freezer (-20°C).

Isopropanol 65% - 65 ml de isopropanol puro misturado à 35 ml de água destilada.

Lugol - iodo 0,33 % (p/v) e iodeto de potássio 0,66 %, dissolvidos em água destilada.

Meio de cultura Acetato – 0,4 % de acetato de sódio, 1,5 % de ágar, dissolvidos em água destilada e pH ajustado para 6,5.

Meio de cultura Batata Dextrose (BD) – foi preparado da mesma forma que o meio caldo de batata, porém com o acréscimo de 20 g de glicose para cada 1000 ml de meio.

Meio de cultura Caldo de Batata – para o preparo de 1000 ml de meio, 1 kg de batata foi cozido com volume de água destilada inicial de 1000 ml. Após as batatas cozinharem até quase desmanchar, estas foram descartadas e a água restante (caldo de cozimento) foi completada para 1000 ml.

Meio de cultura *Corn Meal Ágar (CMA)* – 1,7 g do meio *Corn Meal Agar* (Difco) dissolvidos em 80 ml de água destilada aquecida, completando-se o volume para 100 ml.

Meio de cultura *Cromo Azurol S (CAS)* – 60,5 mg de *Cromo Azurol S (CAS)* dissolvido em 50 ml de água destilada, e misturada a 10 ml de solução de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e HCl 10 mM). Sob agitação essa solução foi adicionada lentamente a 72,9 g de HDTMA dissolvido em 40 g de água.

Meio de cultura *BDA* – 39 g do meio *BDA (Himedia®)* foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada.

Meio de cultura *GYMP* - 2% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1% extrato de malte e 0,2% fosfato de potássio, dissolvidos em água destilada.

Meio de cultura *Luria Bertani (LB)* – 10 g/L de triptona; 5 g/L de NaCl; 5 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de Agar, dissolvidos em água destilada.

Meio de cultura *PDYA (para solubilização)* - 80 g/L de glicose; 0,7 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g/L de extrato de levedura, dissolvidos em água destilada.

Meio de cultura *WLN* - 80 g do meio *WL Nutrient (Acumedia®)* dissolvidos em 1 litro de meio. Adicionou-se 0,01% ampicilina e 0,01% ácido nalidíxico.

Meio de cultura *YEPD* - 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose, 2% agar, 0,01% ampicilina e 0,01% ácido nalidíxico, dissolvidos em água destilada.

Meio de cultura *YM* - 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1% glicose; 2% agar; 0,01% ampicilina e 0,01% ácido nalidíxico, dissolvidos em água destilada.

Meio de cultura *Tryptic Soy Ágar (TSA)* – meio comercial *TSA* 40 g dissolvidos em 1 litro de água destilada.

Meio de cultura Extrato de Folha de Cana (EC) –10 g de folha de cana-de-açúcar triturada e 20 g de glicose misturados e dissolvidos em 1 litro de água destilada.

Meio de cultura Extrato de Folha de Milho (EM) - 10 g de folha de milho triturada e 20 g de glicose misturados e dissolvidos em 1 litro de água destilada.

Meio de cultura Extrato de Malte 2 % - 20 g de extrato de malte dissolvido em 1 litro de água destilada.

Meio de cultura Solo + Glicose (SG) –10 g de solo e 20 g de glicose misturados e dissolvidos em 1 litro de água destilada.

Meio de cultura Gorodkova – 0,1 % de glicose, 1% de peptona, 0,5 % de cloreto de sódio, 2 % de ágar, dissolvidos em água destilada.

Meio de cultura Yeast Carbon Base – 11,7 g de Yeast Carbon Base (YCB) (Difco) dissolvidos em 100 ml de água destilada. Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm de porosidade.

Meio de cultura Yeast Nitrogen Base –6,7 g de Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco) dissolvidos em 100 ml de água destilada. Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm de porosidade.

Meio de cultura YM – 0,3 % de extrato de malte, 0,3 % de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1 % de glicose, 2 % de ágar, dissolvidos em água destilada.

Reagente ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) – Pesar 4,0 g de hidróxido de sódio e dissolver em 50 mL de água destilada. Pesar 2,5 g de DNS e adicionar à solução de NaOH recém preparada. Pesar 75,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolver, sob agitação constante, em 125 mL de água destilada. Adicionar à solução de DNS a solução de tartarato, sob aquecimento, até dissolver completamente.

Reagente de Salkowski – 2 ml de FeCl 0,5 M, 98 ml de ácido perclórico 35 %. A solução de FeCl 0,5 M deve ser armazenada em frasco escuro.

Solução de brometo de etídeo – 30 µl de brometo de etídeo misturado à 100 ml de tampão TBE 1X.

Solução de safranina – 0,5 g de safranina dissolvido em 100 ml de água destilada.

Solução de verde-malaquita 5% - 5 g de corante verde-malaquita dissolvidos em 100 ml de água destilada.

Solução estéril de lavagem - 0,85% NaCl, 0,1% Tween 40, dissolvidos em água destilada.

Solução salina 0,85% - 0,85% de NaCl, dissolvidos em de água destilada.

Tampão Acetato de Sódio 0,1 M pH 5,0 – 148 ml da solução de ácido acético 0,2 M com 352 ml da solução de acetato de sódio 0,2 M, misturados com água destilada até completar o volume para 1 litro.

Tampão de extração - Triton 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, dissolvidos em água milli-Q.

Tampão McIlvaine - ácido cítrico 50 mM, fosfato de sódio 100 mM, ajustando-se o pH para 6,0.

Tampão SM –2,5 µl de cloreto de magnésio 2 M, 200 µl de Tris-HCl 1 M pH 9, dissolvidos em água milliQ estéril para volume final de 1 ml.

Tampão TBE 10X –108 g de Tris base e 55 g de ácido bórico em 400 ml de EDTA 0,5 M pH 8. O volume foi completado para 1000 ml com água milli-Q.

Tampão TE 1X - 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, dissolvidos em água milli-Q.

ANEXO II

RESULTADO DO BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS SELECIONADOS PARA OS TESTES DE ANTAGONISMO

ISOLADO 1S112 - Query ID - lcl|21647

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY046184.1	Torulaspota globosa internal transcribed spacer 1, partial sequence	348	348	100%	7e-93	98%
AJ229074.1	Torulaspota globosa 5.8S gene and ITS1 and ITS2 (strain CBS 764)	348	348	100%	7e-93	98%
FJ873436.1	Torulaspota sp. EN11S09 internal transcribed spacer 1, partial sequ	335	335	100%	5e-89	97%
AB304160.1	Torulaspota sp. NBRC 103204 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRN	335	335	100%	5e-89	97%
AB304159.1	Torulaspota sp. NBRC 103203 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRN	335	335	100%	5e-89	97%
AB304158.1	Torulaspota sp. NBRC 103202 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRN	335	335	100%	5e-89	97%
AB304157.1	Torulaspota sp. NBRC 103201 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRN	335	335	100%	5e-89	97%
AB304156.1	Torulaspota sp. NBRC 103200 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRN	335	335	100%	5e-89	97%
AB304155.1	Torulaspota sp. NBRC 103199 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRN	331	331	98%	7e-88	97%
AB304154.1	Torulaspota sp. NBRC 103198 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRN	331	331	98%	7e-88	97%
AB304153.1	Torulaspota sp. NBRC 11062 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA	331	331	98%	7e-88	97%
AB304152.1	Torulaspota sp. NBRC 11061 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA	331	331	98%	7e-88	97%
FJ888525.1	Torulaspota sp. XZ-46A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	316	316	100%	2e-83	96%
AY046155.1	Kluyveromyces africanus internal transcribed spacer 1, partial sequ	316	316	100%	2e-83	96%
FJ888524.1	Torulaspota sp. AS 2.3768 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	313	313	98%	2e-82	96%
FJ491947.1	Torulaspota delbrueckii isolate ZY8 18S ribosomal RNA gene, partia	313	313	98%	2e-82	96%
FM177675.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN	313	313	98%	2e-82	96%
AB469378.1	Torulaspota delbrueckii genes for 5.8S rRNA, ITS1, partial sequen	313	313	98%	2e-82	96%
EU798699.1	Torulaspota delbrueckii isolate NK2324 18S ribosomal RNA gene, p	313	313	98%	2e-82	96%
FJ153222.1	Torulaspota francisciae strain NRRL Y-6686 18S ribosomal RNA gene	313	313	98%	2e-82	96%
FJ153205.1	Torulaspota sp. SG5S08 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	313	313	98%	2e-82	96%
EF568083.1	Torulaspota delbrueckii strain WM 821 18S ribosomal RNA gene, pa	313	313	98%	2e-82	96%
EU555308.1	Torulaspota delbrueckii isolate P-T0-32 internal transcribed spacer :	313	313	98%	2e-82	96%
AY796128.1	Saccharomycete sp. ibra626 internal transcribed spacer 1, partial s	313	313	98%	2e-82	96%
AY796127.1	Saccharomycete sp. ibra527 internal transcribed spacer 1, partial s	313	313	98%	2e-82	96%
AY046188.1	Torulaspota pretoriensis internal transcribed spacer 1, partial sequ	313	313	98%	2e-82	96%
AY046187.1	Torulaspota delbrueckii internal transcribed spacer 1, partial sequer	313	313	98%	2e-82	96%

gb|AY046184.1|- *Torulaspota globosa* internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence
Length=729

Score = 348 bits (188), Expect (e-value)= 7e-93

Identities = 192/194 (98%), Gaps = 0/194 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
CTAGTCAAAAACCGATTTTCGTTTTAGAAATTAATAAATATTCAAACCTTTCAACAACGGA 63
|||||
CTAGTCAAAAACCAATTTTCGTTTTAGAAATTAATAAATATTCAAACCTTTCAACAACGGA 330
```

```
TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA 123
|||||
TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA 390
```

```
GAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGC 183
|||||
GAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGC 450
```

```
GTGCCTGTTTGAGC 197
```

```
|||||
```

```
ATGCCTGTTTGAGC 464
```


ISOLADO 2S02 - Query ID - lcl|37891

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF568011.1	Candida intermedia strain WM 811 18S ribosomal RNA gene, partial	558	558	100%	5e-156	99%
EF192222.1	Candida intermedia strain zhuan202 1 18S ribosomal RNA gene, pa	558	558	100%	5e-156	99%
AY500373.1	Candida intermedia 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inte	558	558	100%	5e-156	99%
EF060776.1	Saccharomycetales sp. LM475 18S ribosomal RNA gene, partial seq	497	497	100%	1e-137	95%
EF060775.1	Saccharomycetales sp. LM473 18S ribosomal RNA gene, partial seq	497	497	100%	1e-137	95%
DQ680837.1	Candida intermedia strain YA01a 18S ribosomal RNA gene, partial s	497	497	100%	1e-137	95%
DQ657830.1	Candida intermedia strain ylx-11 18S ribosomal RNA gene, partial s	492	492	100%	5e-136	95%
FM177681.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA	490	490	98%	2e-135	95%
DQ665263.1	Candida intermedia strain HN7.3 18S ribosomal RNA gene, partial s	481	481	100%	1e-132	94%
DQ646683.1	Candida intermedia internal transcribed spacer 1, partial sequence;	481	481	99%	1e-132	95%
FJ515166.1	Candida intermedia strain SA17 18S ribosomal RNA gene, partial se	479	479	99%	4e-132	94%
EF060590.1	Saccharomycetales sp. LM260 18S ribosomal RNA gene, partial seq	479	479	100%	4e-132	94%
EF565862.1	Candida sp. 1A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S	457	457	88%	2e-125	96%
AF218968.1	Candida intermedia strain ATCC 14439T 5.8S ribosomal RNA gene,	392	392	69%	5e-106	99%
EU486151.1	Uncultured fungus clone H-Ti-57 5.8S ribosomal RNA gene, partial s	350	350	63%	3e-93	98%
EU486108.1	Uncultured fungus clone D-D-16Dc2 5.8S ribosomal RNA gene, part	350	350	63%	3e-93	98%
EF137918.1	Candida flosculosorum strain JL13 internal transcribed spacer 1, parti	331	331	87%	1e-87	89%
FJ623624.1	Candida dosseyi strain ATCC MYA-4359 18S ribosomal RNA gene, r	327	327	100%	1e-86	86%
EU100744.1	Candida akabanensis strain CBS 5039 internal transcribed spacer 1	322	322	100%	7e-85	85%
FJ623625.1	Candida blattae strain ATCC MYA-4360 18S ribosomal RNA gene, p-	316	316	98%	3e-83	86%
FJ873594.1	Candida sp. GA5M02 internal transcribed spacer 1, partial sequence	311	311	83%	1e-81	88%
FJ873592.1	Candida sp. GA3M06 internal transcribed spacer 1, partial sequence	311	311	83%	1e-81	88%
FJ873590.1	Candida sp. GA2M03 internal transcribed spacer 1, partial sequence	311	311	83%	1e-81	88%
FJ873407.1	Candida sp. EN1S10 internal transcribed spacer 1, partial sequence	309	309	60%	5e-81	96%
FJ873595.1	Candida sp. GA7M01 internal transcribed spacer 1, partial sequence	300	300	59%	3e-78	96%
AY450921.1	Candida asparaqi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; interr	298	298	60%	1e-77	95%
EF060724.1	Saccharomycetales sp. LM412 18S ribosomal RNA gene, partial seq	296	296	80%	4e-77	88%
AB480227.1	Clavispora lusitaniae genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, p	291	291	81%	2e-75	88%
EF568047.1	Clavispora lusitaniae strain WM 02.466 18S ribosomal RNA gene, p-	291	291	81%	2e-75	88%
EF568024.1	Clavispora lusitaniae strain WM 18 18S ribosomal RNA gene, partial	291	291	81%	2e-75	88%
EU568923.1	Clavispora lusitaniae isolate CNRMA 200501223 18S ribosomal RNA	291	291	70%	2e-75	91%

EF568011.1 - *Candida intermedia* strain WM 811 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=356

Score = 558 bits (302), Expect (e-value) = 5e-156
Identities = 307/309 (99%), Gaps = 1/309 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

TTATTACATTGTTTTTTGAAGCAAACCTTACTAATATATATTATTTTTTCAATTTCTTTTAAAAA 60
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
TTATTACACTGTTTTTTGAAGCAAACCTTACTAATATATATTATTTTTTCAATTTCTTTTAAAAA 76

TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGC 120
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGC 136

GATACGTATCATGACTTGCAGACGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTGA 180
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GATACGTATCATGACTTGCAGACGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTGA 196

GGTATTCTCAAGGCATGCCTGTTTGTGAGCGTCGGCTCCCTTCAAACCCCGGGTTTGGTG 240
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GGTATTCTCAAGGCATGCCTGTTTGTGAGCGTCGGCTCCCTTCAAACCCCGGGTTTGGTG 256

TTGCCTTCCGAAATATCACAGTTGTGCGCAATACGTTACTTCAACTTTATTCTTTTCGCCCT 300
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
TTGCCTTCCGAAATATCACAGTTGTGCGCAATACGTTACTTCAACTTTATTCTTTTCGCCCT 316

CAAAATGCAG 309
||||| |||
CAAAAT-CAG 324

```

ISOLADO 2F32 - Query ID - lcl|10131

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FM875856.1	Uncultured fungus ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2 region, clone f1f	593	593	100%	2e-166	96%
FM875844.1	Uncultured fungus ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2 region, clone f6	593	593	100%	2e-166	96%
FM875840.1	Uncultured fungus ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2 region, clone f2	593	593	100%	2e-166	96%
FJ515212.1	Rhodotorula mucilaginosa strain UN131 18S ribosomal RNA gene, p-	593	593	100%	2e-166	96%
FJ515192.1	Rhodotorula mucilaginosa strain SN27 18S ribosomal RNA gene, pai	593	593	100%	2e-166	96%
EU871493.1	Rhodotorula mucilaginosa isolate S22834 internal transcribed space	593	593	100%	2e-166	96%
EU871492.1	Rhodotorula mucilaginosa isolate S22830 internal transcribed space	593	593	100%	2e-166	96%
EU871491.1	Rhodotorula mucilaginosa isolate S22828 internal transcribed space	593	593	100%	2e-166	96%
EU871490.1	Rhodotorula mucilaginosa isolate S22827 internal transcribed space	593	593	100%	2e-166	96%
EU149812.1	Rhodotorula mucilaginosa strain CBS 10752 18S ribosomal RNA qer	593	593	100%	2e-166	96%
EU781664.1	Rhodotorula mucilaginosa isolate A7 18S ribosomal RNA gene, parti	593	593	100%	2e-166	96%
EF174511.1	Rhodotorula mucilaginosa strain CRUB 1055 18S ribosomal RNA qer	593	593	100%	2e-166	96%
EF174507.1	Rhodotorula mucilaginosa strain CRUB 0029 18S ribosomal RNA qer	593	593	100%	2e-166	96%
AM901909.1	Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS:	593	593	100%	2e-166	96%
EU177580.1	Rhodotorula mucilaginosa strain SO 18S ribosomal RNA gene, parti	593	593	100%	2e-166	96%
EU177577.1	Rhodotorula mucilaginosa strain WW 18S ribosomal RNA gene, part	593	593	100%	2e-166	96%
EF495177.1	Rhodotorula mucilaginosa 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
EF190221.1	Rhodotorula mucilaginosa strain WC53-2 18S ribosomal RNA gene,	593	593	100%	2e-166	96%
EF192223.1	Rhodotorula mucilaginosa strain qaoyan1wei2 18S ribosomal RNA q	593	593	100%	2e-166	96%
EF060745.1	Sporidiobolales sp. LM439 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
EF060732.1	Sporidiobolales sp. LM423 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
EF060730.1	Sporidiobolales sp. LM420 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
EF060723.1	Sporidiobolales sp. LM411 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
EF060603.1	Sporidiobolales sp. LM274 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
EF060587.1	Sporidiobolales sp. LM256 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
DQ681372.2	Rhodotorula mucilaginosa strain L10-2 18S ribosomal RNA gene, pa	593	593	100%	2e-166	96%
DQ681365.2	Rhodotorula mucilaginosa strain HN4.1 18S ribosomal RNA gene, pe	593	593	100%	2e-166	96%
DQ402533.1	Rhodotorula mucilaginosa 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	593	593	100%	2e-166	96%
AF444614.1	Rhodotorula mucilaginosa strain Y 17501 18S ribosomal RNA gene,	593	593	100%	2e-166	96%
AF444613.1	Rhodotorula mucilaginosa strain Y 17500 18S ribosomal RNA gene,	593	593	100%	2e-166	96%



gb|FJ515212.1 - *Rhodotorula mucilaginosa* strain UN131 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=617

Score = 593 bits (321), Expect (e-value) = 2e-166
Identities = 355/369 (96%), Gaps = 12/369 (3%)
Strand=Plus/Minus

```

CTCTTCACTCNCNTTAAAGAAAGAGGAGGGTCTCGACAGTCATTCATGACACTCACACAG 60
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CTCTTCA-A-TC-ATTAAGAAAGAGGAGGGT-T-GA-AGT-ATTCATGACACTCA-A-A- 327

CCCCGCATGCTCCAGCGGAATACCATGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTC 120
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
-CAGGCATGCTCCA-CGGAATACCATGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTC 269

ACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGA 180
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
ACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGA 209

GCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATTTTGTATATAAAATTTAATACATTCATAGACT 240
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATTTTGTATATAAAATTTAATACATTCATAGACT 149

TTGTGTTTATAAGTGAATAGGAGTTCGCTCTCTTGCGAGAGTTACTATCCCAAACAAGTG 300
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TTGTGTTTATAAGTGAATAGGAGTTCGCTCTCTTGCGAGAGTTACTATCCCAAACAAGTG 89

CACAGGGTTAGAAAGTGAGAGTTCGACTCCAAGTTAAGTTGGACGTCTATATTCACTA 360
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CACAGGGTTAGAAAGTGAGAGTTCGACTCCAAGTTAAGTTGGACGTCTATATTCACTA 29

ATGATCCTT 369
| | | | | | | |
ATGATCCTT 20
    
```

ANEXO III

5.4. Avaliação do antagonismo in vitro em meios de cultura sólidos

5.4.1. Efeito de diferentes meios de cultura no antagonismo in vitro

C. sublineolum X leveduras X meios de cultura

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	309,81	2	154,90	25,64	0,000000
Meios	1199,26	4	299,81	49,63	0,000000
Leveduras*Meios	360,20	8	45,02	7,45	0,000001
Resíduo	362,46	60	6,04		

leveduras	meios	Inibição							
2S02	YEPD	22,01489	****						
2F32	YEPD	23,12590	****	****					
2F32	SOLO	27,91544		****	****				
1S112	YEPD	28,91028			****				
2S02	CANA	29,21889			****	****			
2F32	BDA	29,33333			****	****			
1S112	SOLO	30,72040			****	****	****		
2S02	SOLO	30,94735			****	****	****		
2F32	CANA	31,08228			****	****	****		
1S112	CANA	32,24246			****	****	****	****	
2S02	BDA	33,33333			****	****	****	****	
2S02	MILHO	34,44444				****	****	****	
1S112	MILHO	36,00000					****	****	
2F32	MILHO	36,66667						****	
1S112	BDA	42,66667							****

C. sublineolum X leveduras

leveduras	inibição		
2F32	29,62472	****	
2S02	29,99178	****	
1S112	34,10796		****

C. sublineolum X meios

meios	inibição			
YEPD	24,68369			****
SOLO	29,86106	****		
CANA	30,84788	****		
BDA	35,11111		****	
MILHO	35,70370		****	

C. graminicola X leveduras X meios de cultura

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	16,82	2	8,41	1,07	0,349702
Meios	924,57	4	231,14	29,39	0,000000
Leveduras*meios	642,05	8	80,26	10,20	0,000000
resíduo	471,89	60	7,86		

leveduras	meios	inibição						
2F32	YEPD	22,46183	****					
2S02	YEPD	27,78424	****	****				
1S112	CANA	28,52000	****	****				
1S112	MILHO	29,24000		****	****			
1S112	YEPD	30,12000		****	****			
1S112	SOLO	30,72000		****	****	****		
2S02	MILHO	32,08295		****	****	****		
2F32	SOLO	32,69153		****	****	****	****	
2S02	SOLO	33,12083		****	****	****	****	
2S02	CANA	33,75741		****	****	****	****	
2F32	BDA	35,33333			****	****	****	****
2S02	BDA	36,66667				****	****	****
2F32	MILHO	36,80062				****	****	****
2F32	CANA	38,38914					****	****
1S112	BDA	41,32000						****

C. graminicola X leveduras

leveduras	inibição	
1S112	31,98400	****
2S02	32,68242	****
2F32	33,13529	****

C. graminicola X meios de cultura

meios	inibição			
YEPD	26,78869		****	
SOLO	32,17745	****		
MILHO	32,70786	****		
CANA	33,55552	****		
BDA	37,77333			****

T. paradoxa X levedura X meios de cultura

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	2754,959	2	1377,480	192,3784	0,000000
Meios	176,731	4	44,183	6,1705	0,000316
Leveduras*meios	1568,866	8	196,108	27,3884	0,000000
resíduo	429,616	60	7,160		

leveduras	meios	inibição						
2F32	CANA	1,77778	****					
2F32	BDA	2,22222	****					
2F32	MILHO	2,66667	****					
2S02	BDA	3,11111	****					
2S02	SOLO	3,33333	****					
2S02	MILHO	3,77778	****	****				
2F32	SOLO	6,00000	****	****				
2S02	CANA	6,22222	****	****				
1S112	YEPD	7,27493	****	****				
2F32	YEPD	9,40699		****	****			
2S02	YEPD	14,07670			****	****		
1S112	MILHO	14,88889			****	****		
1S112	CANA	18,22222				****	****	
1S112	BDA	24,00000					****	****
1S112	SOLO	25,77778						****

T. paradoxa X leveduras

leveduras	inibição		
2F32	4,41473	****	
2S02	6,10423	****	
1S112	18,03276		****

T. paradoxa X meios

meios	inibição			
MILHO	7,11111	****		
CANA	8,74074	****	****	
BDA	9,77778	****	****	****
YEPD	10,25287		****	****
SOLO	11,70370			****

5.4.2. Efeito de diferentes valores de pH no antagonismo in vitro

C. sublineolum X levedura X pH

Efeitos	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	24,16	2	12,08	5,51	0,006983
pH	213,69	3	71,23	32,51	0,000000
Leveduras*pH	89,58	6	14,93	6,82	0,000029
resíduo	105,15	48	2,19		

leveduras	pH	inibição					
2F32	pH8	33,08000					****
2S02	pH8	33,74000				****	****
2F32	pH7	36,22000	****			****	****
2S02	pH7	36,68000	****			****	
1S112	pH7	36,90000	****			****	
1S112	pH8	37,56000	****	****			
2S02	pH6	37,58000	****	****			
2F32	pH5	37,80000	****	****	****		
1S112	pH6	38,02000	****	****	****		
2S02	pH5	40,22000		****	****		
2F32	pH6	40,66000		****	****		
1S112	pH5	40,88000			****		

C. sublineolum X leveduras

leveduras	inibição		
2F32	36,94000	****	
2S02	37,05500	****	
1S112	38,34000		****

C. sublineolum X pH

pH	inibição		
pH8	34,79333	****	
pH7	36,60000		****
pH6	38,75333	****	
pH5	39,63333	****	

C. graminicola X leveduras X pH

Efeitos	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	55,91	2	27,95	9,65	0,000299
pH	363,77	3	121,26	41,88	0,000000
Leveduras*pH	167,02	6	27,84	9,61	0,000001
resíduo	138,99	48	2,90		

leveduras	pH	inibição					
2F32	pH8	32,64000		****			
2F32	pH7	33,74000		****	****		
2S02	pH8	35,08000		****	****	****	
2S02	pH7	35,30000		****	****	****	
1S112	pH7	36,44000			****	****	****
1S112	pH5	38,68000	****			****	****
2S02	pH6	39,34000	****				****
1S112	pH8	40,66000	****				
2F32	pH5	40,86000	****				
2F32	pH6	41,10000	****				
2S02	pH5	41,32000	****				
1S112	pH6	41,76000	****				

C. graminicola X leveduras

leveduras	inibição		
2F32	37,08500	****	
2S02	37,76000	****	
1S112	39,38500		****

C. graminicola X pH

pH	inibição		
pH7	35,16000	****	
pH8	36,12667	****	
pH5	40,28667		****
pH6	40,73333		****

T.paradoxa X leveduras X pH

Efeitos	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	4248,300	2	2124,150	1087,588	0,000000
pH	13,581	3	4,527	2,318	0,087326
Leveduras*pH	27,161	6	4,527	2,318	0,047985
resíduo	93,748	48	1,953		

leveduras	pH	inibição			
2S02	pH5	0,00000	****		
2S02	pH6	0,00000	****		
2S02	pH7	0,00000	****		
2S02	pH8	0,00000	****		
2F32	pH5	0,00000	****		
2F32	pH6	0,00000	****		
2F32	pH7	0,00000	****		
2F32	pH8	0,00000	****		
1S112	pH7	15,94000		****	
1S112	pH8	17,06000		****	****
1S112	pH6	18,86000		****	****
1S112	pH5	19,54000			****

T. paradoxa X leveduras

leveduras	inibição		
2F32	0,00000	****	
2S02	0,00000	****	
1S112	17,85000		****

T.paradoxa X pH

pH	inibição	
pH7	5,313333	****
pH8	5,686667	****
pH6	6,286667	****
pH5	6,513333	****

5.4.3. Avaliação de diferentes temperaturas de incubação no antagonismo in vitro

C. sublineolum X leveduras X temperaturas

Efeitos	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	99,93	2	49,97	4,217	0,020543
temperaturas	3487,73	3	1162,58	98,130	0,000000
Leveduras*temperaturas	267,95	6	44,66	3,769	0,003734
resíduo	568,67	48	11,85		

leveduras	temperaturas	inibição					
2S02	35°C	19,60000			****		
1S112	35°C	22,24000			****	****	
2F32	35°C	25,12000			****	****	
2F32	22°C	29,02000				****	****
2S02	30°C	34,62000	****				****
2S02	22°C	35,12000	****				****
1S112	22°C	37,08000	****	****			
1S112	30°C	39,54000	****	****			
2F32	30°C	39,98000	****	****			
2S02	25°C	41,10000	****	****			
2F32	25°C	43,54000		****			
1S112	25°C	44,18000		****			

C. sublineolum X leveduras

levedura	inibição		
2S02	32,61000	****	
2F32	34,41500	****	****
1S112	35,76000		****

C. sublineolum X temperaturas

temperaturas	inibição				
35°C	22,32000	****			
22°C	33,74000		****		
30°C	38,04667			****	
25°C	42,94000				****

C. graminicola X leveduras X temperaturas

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	867,59	2	433,79	22,639	0,000000
temperatura	689,77	3	229,92	11,999	0,000006
Leveduras*temperatura	982,76	6	163,79	8,548	0,000002
resíduo	919,75	48	19,16		

levedura	temperatura	inibição			
2F32	22°C	29,78000		****	
2S02	22°C	32,26000	****	****	
2F32	35°C	32,96000	****	****	
1S112	22°C	33,28000	****	****	
2S02	35°C	33,42000	****	****	
2S02	30°C	35,76000	****	****	
2F32	30°C	37,10000	****	****	
2S02	25°C	38,02000	****	****	
2F32	25°C	38,44000	****	****	
1S112	25°C	40,66000	****		
1S112	30°C	41,32000	****		
1S112	35°C	55,86000			****

C. graminicola X leveduras

leveduras	inibição		
2F32	34,57000	****	
2S02	34,86500	****	
1S112	42,78000		****

C. graminicola X temperaturas

temperaturas	inibição		
22°C	31,77333		****
30°C	38,06000	****	
25°C	39,04000	****	
35°C	40,74667	****	

T. paradoxa X leveduras X temperaturas

Efeitos	SQ	GL	QM	F	p
Leveduras	4373,297	2	2186,649	143,4385	0,000000
Temperaturas	549,194	3	183,065	12,0086	0,000006
Leveduras*temperaturas	111,655	6	18,609	1,2207	0,312298
resíduo	731,736	48	15,245		

leveduras	temperaturas	inibição			
2S02	30°C	0,00000	****		
2F32	30°C	0,00000	****		
2S02	25°C	2,64000	****	****	
2F32	25°C	5,52000	****	****	
2S02	35°C	7,10000	****	****	
2S02	22°C	8,48000	****	****	
2F32	22°C	10,08000		****	
2F32	35°C	10,26000		****	
1S112	30°C	21,98000			****
1S112	25°C	22,20000			****
1S112	35°C	23,10000			****
1S112	22°C	26,90000			****

T. paradoxa X leveduras

leveduras	inibição		
2S02	4,55500	****	
2F32	6,46500	****	
1S112	23,54500		****

T. paradoxa X temperaturas

temperaturas	inibição			
30°C	7,32667	****		
25°C	10,12000	****	****	
35°C	13,48667		****	****
22°C	15,15333			****

ANEXO IV

5.5. Avaliação do antagonismo *in vitro* em meios de cultura líquidos

T. globosa (1S112)

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
tempo - 1	8489,9	2	4244,9	34,665	0,000000
autocl/filtr - 2	7092,4	1	7092,4	57,917	0,000000
c/s/fungo - 3	155,4	1	155,4	1,269	0,265567
tamponado/não - 4	184,0	1	184,0	1,503	0,226245
1*2	1499,8	2	749,9	6,124	0,004278
1*3	1680,8	2	840,4	6,863	0,002391
2*3	97,1	1	97,1	0,793	0,377760
1*4	188,0	2	94,0	0,768	0,469655
2*4	0,9	1	0,9	0,007	0,931421
3*4	1357,4	1	1357,4	11,084	0,001679
1*2*3	758,3	2	379,2	3,096	0,054350
1*2*4	120,2	2	60,1	0,491	0,615290
1*3*4	2293,3	2	1146,7	9,364	0,000369
2*3*4	1591,7	1	1591,7	12,998	0,000740
1*2*3*4	1949,2	2	974,6	7,959	0,001035
resíduo	5878,0	48	122,5		
total		71			

tempo	autocl/filtr	c/s/fungo	tamponado	germinação (%)									
3	FILTRAD	S/FUNGO	B	6,97587	****								
3	FILTRAD	C/FUNGO	BT	14,06486	****	****							
1	FILTRAD	S/FUNGO	B	30,46809	****	****	****						
3	FILTRAD	S/FUNGO	BT	34,53997	****	****	****	****					
2	FILTRAD	C/FUNGO	B	36,34992	****	****	****	****	****				
3	FILTRAD	C/FUNGO	B	42,94872		****	****	****	****	****			
3	AUTOCL	C/FUNGO	BT	48,49170		****	****	****	****	****			
1	FILTRAD	C/FUNGO	BT	53,27488			****	****	****	****	****		****
3	AUTOCL	C/FUNGO	B	53,54449			****	****	****	****	****		****
2	FILTRAD	S/FUNGO	BT	55,92006			****	****	****	****	****		****
2	FILTRAD	C/FUNGO	BT	56,07089			****	****	****	****	****		****
2	FILTRAD	S/FUNGO	B	59,91704			****	****	****	****	****		****
1	AUTOCL	S/FUNGO	B	61,46761			****	****	****	****	****		****
3	AUTOCL	S/FUNGO	B	62,14178			****	****	****	****	****		****
3	AUTOCL	S/FUNGO	BT	63,34842			****	****	****	****	****		****
2	AUTOCL	C/FUNGO	B	66,96833				****	****	****	****		****
2	AUTOCL	S/FUNGO	BT	68,06184				****	****	****	****		****
1	AUTOCL	S/FUNGO	BT	68,11036				****	****	****	****		****
2	AUTOCL	S/FUNGO	B	69,15535				****	****	****	****		****
2	AUTOCL	C/FUNGO	BT	71,11614					****	****	****		****
1	FILTRAD	S/FUNGO	BT	71,43173							****	****	
1	AUTOCL	C/FUNGO	B	71,94101							****	****	
1	AUTOCL	C/FUNGO	BT	83,92011								****	****
1	FILTRAD	C/FUNGO	B	88,10504									****

tempo	germinação (%)		
3	40,75698		****
2	60,44495	****	
1	66,08985	****	

autocl/filtr	germinação (%)		
FILTRADO	45,83892	****	
AUTOCLAVADO	65,68893		****

c/s/fungo	germinação (%)	
S/FUNGO	54,29484	****
C/FUNGO	57,23301	****

tamponado/não	germinação (%)	
B	54,16527	****
BT	57,36258	****

tempo	autocl/filtr	germinação (%)				
3	FILTRAD	24,63235				****
2	FILTRAD	52,06448	****			
3	AUTOCL	56,88160	****	****		
1	FILTRAD	60,81994	****	****	****	
2	AUTOCL	68,82541		****	****	
1	AUTOCL	71,35977			****	

tempo	c/s/fungo	germinação (%)			
3	C/FUNGO	39,76244		****	
3	S/FUNGO	41,75151		****	
2	C/FUNGO	57,62632	****		
1	S/FUNGO	57,86945	****		
2	S/FUNGO	63,26357	****		****
1	C/FUNGO	74,31026			****

autocl/filtr	c/s/fungo	germinação (%)		
FILTRAD	S/FUNGO	43,20879	****	
FILTRAD	C/FUNGO	48,46905	****	
AUTOCL	S/FUNGO	65,38089		****
AUTOCL	C/FUNGO	65,99696		****

tempo	tamponado/não	germinação (%)		
3	BT	40,11124		****
3	B	41,40271		****
2	B	58,09766	****	
2	BT	62,79223	****	
1	B	62,99544	****	
1	BT	69,18427	****	

autocl/filtr	tamponado/não	germinação (%)		
FILTRAD	B	44,12745	****	
FILTRAD	BT	47,55040	****	
AUTOCL	B	64,20310		****
AUTOCL	BT	67,17476		****

c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)		
S/FUNGO	B	48,35429		****
C/FUNGO	BT	54,48976	****	****
C/FUNGO	B	59,97625	****	
S/FUNGO	BT	60,23540	****	

tempo	autocl/filtr	c/s/fungo	germinação (%)					
3	FILTRAD	S/FUNGO	20,75792				****	
3	FILTRAD	C/FUNGO	28,50679				****	****
2	FILTRAD	C/FUNGO	46,21041			****		****
1	FILTRAD	S/FUNGO	50,94991	****		****		
3	AUTOCL	C/FUNGO	51,01810	****		****		
2	FILTRAD	S/FUNGO	57,91855	****	****	****		
3	AUTOCL	S/FUNGO	62,74510	****	****	****		
1	AUTOCL	S/FUNGO	64,78898	****	****	****		
2	AUTOCL	S/FUNGO	68,60860	****	****			
2	AUTOCL	C/FUNGO	69,04223	****	****			
1	FILTRAD	C/FUNGO	70,68996	****	****			
1	AUTOCL	C/FUNGO	77,93056		****			

tempo	autocl/filtr	tamponado /não	germinação (%)					
3	FILTRAD	BT	24,30241				****	
3	FILTRAD	B	24,96229				****	
2	FILTRAD	B	48,13348	****				
3	AUTOCL	BT	55,92006	****	****			
2	FILTRAD	BT	55,99548	****	****			
3	AUTOCL	B	57,84314	****	****			
1	FILTRAD	B	59,28657	****	****			
1	FILTRAD	BT	62,35331	****	****			
1	AUTOCL	B	66,70431	****	****			
2	AUTOCL	B	68,06184	****	****			
2	AUTOCL	BT	69,58899	****	****			
1	AUTOCL	BT	76,01523		****			

tempo	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)					
3	C/FUNGO	BT	31,27828				****	
3	S/FUNGO	B	34,55882				****	
1	S/FUNGO	B	45,96785		****	****		
3	C/FUNGO	B	48,24661	****	****	****		
3	S/FUNGO	BT	48,94419	****	****	****		
2	C/FUNGO	B	51,65913	****	****	****		
2	S/FUNGO	BT	61,99095	****	****		****	
2	C/FUNGO	BT	63,59351	****	****		****	
2	S/FUNGO	B	64,53620	****	****		****	
1	C/FUNGO	BT	68,59749	****	****		****	
1	S/FUNGO	BT	69,77105	****			****	
1	C/FUNGO	B	80,02303				****	

autocl/filtr	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)					
FILTRAD	S/FUNGO	B	32,45367				****	
FILTRAD	C/FUNGO	BT	41,13687		****	****		
FILTRAD	S/FUNGO	BT	53,96392	****	****			
FILTRAD	C/FUNGO	B	55,80123	****	****			
AUTOCL	C/FUNGO	B	64,15128	****				
AUTOCL	S/FUNGO	B	64,25491	****				
AUTOCL	S/FUNGO	BT	66,50687	****				
AUTOCL	C/FUNGO	BT	67,84265	****				

C. intermedia (2S02)

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
tempo - 1	2210,9	2	1105,4	10,820	0,000132
autocl/filtr - 2	1,4	1	1,4	0,014	0,906419
c/s/fungo - 3	2880,7	1	2880,7	28,197	0,000003
tamponado/não - 4	577,8	1	577,8	5,656	0,021424
1*2	2900,0	2	1450,0	14,193	0,000014
1*3	1852,5	2	926,3	9,067	0,000457
2*3	197,4	1	197,4	1,932	0,170900
1*4	340,4	2	170,2	1,666	0,199739
2*4	967,3	1	967,3	9,468	0,003449
3*4	8137,2	1	8137,2	79,649	0,000000
1*2*3	1586,5	2	793,3	7,765	0,001198
1*2*4	544,9	2	272,5	2,667	0,079739
1*3*4	447,7	2	223,9	2,191	0,122839
2*3*4	797,6	1	797,6	7,807	0,007457
1*2*3*4	377,5	2	188,7	1,847	0,168694
resíduo	4903,8	48	102,2		
total		71			

tempo	autocl/filtr	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)					
3	FILTRAD	S/FUNGO	B	26,69683	****				
2	FILTRAD	S/FUNGO	B	28,39367	****				
3	FILTRAD	C/FUNGO	BT	44,87179	****	****			
3	FILTRAD	C/FUNGO	B	47,51131	****	****	****		
2	FILTRAD	S/FUNGO	BT	48,41629	****	****	****		
3	AUTOCL	C/FUNGO	BT	50,03771	****	****	****		
1	AUTOCL	C/FUNGO	BT	50,37707	****	****	****		
2	AUTOCL	C/FUNGO	BT	50,37707	****	****	****		
1	FILTRAD	C/FUNGO	BT	51,41491	****	****	****		
2	AUTOCL	S/FUNGO	B	52,11161	****	****	****		
1	AUTOCL	S/FUNGO	B	52,11161	****	****	****		
1	AUTOCL	S/FUNGO	BT	54,93967	****	****	****		
2	AUTOCL	S/FUNGO	BT	54,93967	****	****	****		
1	FILTRAD	S/FUNGO	B	55,62198	****	****	****		
3	AUTOCL	S/FUNGO	BT	56,71192	****	****	****		
3	AUTOCL	S/FUNGO	B	57,54148	****	****	****		
3	FILTRAD	S/FUNGO	BT	60,48265		****	****	****	
2	FILTRAD	C/FUNGO	BT	67,30769		****	****	****	****
2	AUTOCL	C/FUNGO	B	77,56410			****	****	****
1	AUTOCL	C/FUNGO	B	77,56410			****	****	****
3	AUTOCL	C/FUNGO	B	78,46908			****	****	****
1	FILTRAD	S/FUNGO	BT	90,56286				****	****
2	FILTRAD	C/FUNGO	B	96,53092					****
1	FILTRAD	C/FUNGO	B	98,31274					****

tempo	germinação (%)		
3	52,79035	****	
2	59,45513	****	****
1	66,36312		****

autocl/filtr	germinação (%)	
AUTOCL	59,39542	****
FILTRAD	59,67697	****

c/s/fungo	germinação (%)		
S/FUNGO	53,21085	****	
C/FUNGO	65,86154		****

tamponado/não	germinação (%)		
BT	56,70328	****	
B	62,36912		****

tempo	autocl/filtr	germinação (%)			
3	FILTRAD	44,89065		****	
2	AUTOCL	58,74811	****		
1	AUTOCL	58,74811	****		
2	FILTRAD	60,16214	****		
3	AUTOCL	60,69005	****		
1	FILTRAD	73,97812			****

tempo	c/s/fungo	germinação (%)			
2	S/FUNGO	45,96531	****		
3	S/FUNGO	50,35822	****		
3	C/FUNGO	55,22247	****		****
1	S/FUNGO	63,30903		****	****
1	C/FUNGO	69,41721		****	
2	C/FUNGO	72,94495		****	

autocl/filtr	c/s/fungo	germinação (%)		
FILTRAD	S/FUNGO	51,69571	****	
AUTOCL	S/FUNGO	54,72599	****	
AUTOCL	C/FUNGO	64,06486		****
FILTRAD	C/FUNGO	67,65823		****

tempo	tamponado/não	germinação (%)		
3	B	52,55468	****	
3	BT	53,02602	****	
2	BT	55,26018	****	
1	BT	61,82363	****	****
2	B	63,65008	****	****
1	B	70,90261		****

autocl/filtr	tamponado/não	germinação (%)		
AUTOCL	BT	52,89718	****	
FILTRAD	B	58,84458	****	****
FILTRAD	BT	60,50937	****	****
AUTOCL	B	65,89367		****

c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)			
S/FUNGO	B	45,41286	****		
C/FUNGO	BT	52,39771	****	****	
S/FUNGO	BT	61,00884		****	
C/FUNGO	B	79,32538			****

tempo	autocl/filtr	c/s/fungo	germinação (%)					
2	FILTRAD	S/FUNGO	38,40498			****		
3	FILTRAD	S/FUNGO	43,58974			****		
3	FILTRAD	C/FUNGO	46,19155	****		****		
2	AUTOCL	S/FUNGO	53,52564	****	****	****		
1	AUTOCL	S/FUNGO	53,52564	****	****	****		
3	AUTOCL	S/FUNGO	57,12670	****	****	****	****	
1	AUTOCL	C/FUNGO	63,97059	****	****		****	****
2	AUTOCL	C/FUNGO	63,97059	****	****		****	****
3	AUTOCL	C/FUNGO	64,25339	****	****		****	****
1	FILTRAD	S/FUNGO	73,09242		****		****	****
1	FILTRAD	C/FUNGO	74,86382				****	****
2	FILTRAD	C/FUNGO	81,91931					****

tempo	autocl/filtr	tamponado/não	germinação (%)				
3	FILTRAD	B	37,10407			****	
1	AUTOCL	BT	52,65837	****		****	
2	AUTOCL	BT	52,65837	****		****	
3	FILTRAD	BT	52,67722	****		****	
3	AUTOCL	BT	53,37481	****		****	
2	FILTRAD	BT	57,86199	****	****		
2	FILTRAD	B	62,46229	****	****		
1	AUTOCL	B	64,83786	****	****		
2	AUTOCL	B	64,83786	****	****		
3	AUTOCL	B	68,00528	****	****		
1	FILTRAD	BT	70,98888	****	****		
1	FILTRAD	B	76,96736			****	

tempo	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)				
2	S/FUNGO	B	40,25264	****			
3	S/FUNGO	B	42,11916	****			
3	C/FUNGO	BT	47,45475	****	****		
1	C/FUNGO	BT	50,89599	****	****		
2	S/FUNGO	BT	51,67798	****	****		
1	S/FUNGO	B	53,86680	****	****	****	
3	S/FUNGO	BT	58,59729	****	****	****	
2	C/FUNGO	BT	58,84238	****	****	****	
3	C/FUNGO	B	62,99020		****	****	
1	S/FUNGO	BT	72,75127			****	****
2	C/FUNGO	B	87,04751				****
1	C/FUNGO	B	87,93842				****

autocl/filtr	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)				
FILTRAD	S/FUNGO	B	36,90416				****
AUTOCL	C/FUNGO	BT	50,26395	****			****
AUTOCL	S/FUNGO	B	53,92157	****	****		
FILTRAD	C/FUNGO	BT	54,53146	****	****		
AUTOCL	S/FUNGO	BT	55,53042	****	****		
FILTRAD	S/FUNGO	BT	66,48727		****	****	
AUTOCL	C/FUNGO	B	77,86576			****	
FILTRAD	C/FUNGO	B	80,78499			****	

Rh. mucilaginosa (2F32)

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
tempo - 1	2811,2	2	1405,6	8,842	0,000538
autocl/filtr - 2	10386,7	1	10386,7	65,337	0,000000
c/s/fungo - 3	2296,3	1	2296,3	14,445	0,000407
tamponado/não - 4	1163,7	1	1163,7	7,320	0,009410
1*2	1392,1	2	696,0	4,378	0,017922
1*3	157,4	2	78,7	0,495	0,612706
2*3	809,9	1	809,9	5,095	0,028589
1*4	107,9	2	54,0	0,339	0,713823
2*4	270,9	1	270,9	1,704	0,198017
3*4	143,2	1	143,2	0,901	0,347387
1*2*3	905,3	2	452,6	2,847	0,067836
1*2*4	663,2	2	331,6	2,086	0,135320
1*3*4	1222,3	2	611,2	3,844	0,028271
2*3*4	591,4	1	591,4	3,720	0,059692
1*2*3*4	5,0	2	2,5	0,016	0,984419
resíduo	7630,6	48	159,0		
total		71			

tempo	autocl/filtr	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)					
3	FILTRAD	S/FUNGO	B	19,07994	****				
3	FILTRAD	S/FUNGO	BT	31,63650	****	****			
3	FILTRAD	C/FUNGO	BT	40,91252	****	****	****		
1	FILTRAD	S/FUNGO	BT	41,09650	****	****	****		
2	FILTRAD	C/FUNGO	BT	48,71795	****	****	****	****	
2	FILTRAD	S/FUNGO	BT	49,92459	****	****	****	****	
2	FILTRAD	S/FUNGO	B	55,84465	****	****	****	****	
1	FILTRAD	S/FUNGO	B	57,83623	****	****	****	****	
3	FILTRAD	C/FUNGO	B	60,29412		****	****	****	****
3	AUTOCL	C/FUNGO	BT	60,40724		****	****	****	****
1	FILTRAD	C/FUNGO	BT	61,37904		****	****	****	****
2	AUTOCL	S/FUNGO	BT	67,49623		****	****	****	****
2	AUTOCL	S/FUNGO	B	68,06184		****	****	****	****
1	AUTOCL	S/FUNGO	BT	70,14747		****	****	****	****
1	FILTRAD	C/FUNGO	B	71,21031		****	****	****	****
3	AUTOCL	S/FUNGO	BT	71,64404			****	****	****
2	AUTOCL	C/FUNGO	BT	73,15234			****	****	****
3	AUTOCL	C/FUNGO	B	76,24434			****	****	****
2	AUTOCL	C/FUNGO	B	78,46908			****	****	****
1	AUTOCL	C/FUNGO	B	80,82016				****	****
2	FILTRAD	C/FUNGO	B	80,92006				****	****
1	AUTOCL	S/FUNGO	B	80,99730				****	****
3	AUTOCL	S/FUNGO	B	81,44796				****	****
1	AUTOCL	C/FUNGO	BT	98,22417					****

tempo	germinação (%)		
3	55,20833		****
2	65,32334	****	
1	70,21390	****	

autocl/filtr	germinação (%)		
FILTRAD	51,57103	****	
AUTOCL	75,59268		****

c/s/fungo	germinação (%)		
S/FUNGO	57,93444	****	
C/FUNGO	69,22928		****

tamponado/não	germinação (%)		
BT	59,56155	****	
B	67,60217		****

tempo	autocl/filtr	germinação (%)			
3	FILTRAD	37,98077			****
1	FILTRAD	57,88052	****		
2	FILTRAD	58,85181	****		
2	AUTOCL	71,79487	****	****	
3	AUTOCL	72,43590	****	****	
1	AUTOCL	82,54727		****	

tempo	c/s/fungo	germinação (%)			
3	S/FUNGO	50,95211	****		
3	C/FUNGO	59,46456	****	****	
2	S/FUNGO	60,33183	****	****	
1	S/FUNGO	62,51937	****	****	
2	C/FUNGO	70,31486		****	****
1	C/FUNGO	77,90842			****

autocl/filtr	c/s/fungo	germinação (%)			
FILTRAD	S/FUNGO	42,56973		****	
FILTRAD	C/FUNGO	60,57233			****
AUTOCL	S/FUNGO	73,29914	****		
AUTOCL	C/FUNGO	77,88622	****		

tempo	tamponado/não	germinação (%)		
3	BT	51,15008		****
3	B	59,26659	****	****
2	BT	59,82278	****	****
1	BT	67,71179	****	
2	B	70,82391	****	
1	B	72,71600	****	

autocl/filtr	tamponado/não	germinação (%)			
FILTRAD	BT	45,61118		****	
FILTRAD	B	57,53088			****
AUTOCL	BT	73,51191	****		
AUTOCL	B	77,67345	****		

c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)		
S/FUNGO	BT	55,32422	****	
S/FUNGO	B	60,54465	****	
C/FUNGO	BT	63,79888	****	****
C/FUNGO	B	74,65968		****

tempo	autocl/filtr	c/s/fungo	germinação (%)					
3	FILTRAD	S/FUNGO	25,35822					****
1	FILTRAD	S/FUNGO	49,46637			****		****
3	FILTRAD	C/FUNGO	50,60332			****	****	
2	FILTRAD	S/FUNGO	52,88462	****		****	****	
2	FILTRAD	C/FUNGO	64,81900	****	****	****	****	
1	FILTRAD	C/FUNGO	66,29467	****	****	****	****	
2	AUTOCL	S/FUNGO	67,77903	****	****	****	****	
3	AUTOCL	C/FUNGO	68,32579	****	****	****	****	
1	AUTOCL	S/FUNGO	75,57238	****	****		****	
2	AUTOCL	C/FUNGO	75,81071	****	****			
3	AUTOCL	S/FUNGO	76,54600	****	****			
1	AUTOCL	C/FUNGO	89,52216		****			

tempo	autocl/filtr	tamponado/não	germinação (%)					
3	FILTRAD	BT	36,27451			****		
3	FILTRAD	B	39,68703			****	****	
2	FILTRAD	BT	49,32127		****	****	****	
1	FILTRAD	BT	51,23777		****	****	****	****
1	FILTRAD	B	64,52327	****	****		****	
3	AUTOCL	BT	66,02564	****	****			
2	FILTRAD	B	68,38235	****	****			
2	AUTOCL	BT	70,32428	****	****			
2	AUTOCL	B	73,26546	****	****			
3	AUTOCL	B	78,84615	****				
1	AUTOCL	B	80,90873	****				
1	AUTOCL	BT	84,18582	****				

tempo	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)					
3	S/FUNGO	B	50,26395	****				
3	C/FUNGO	BT	50,65988	****				
3	S/FUNGO	BT	51,64027	****		****		
1	S/FUNGO	BT	55,62198	****	****	****		
2	S/FUNGO	BT	58,71041	****	****	****		
2	C/FUNGO	BT	60,93514	****	****	****		
2	S/FUNGO	B	61,95324	****	****	****		
3	C/FUNGO	B	68,26923	****	****	****		
1	S/FUNGO	B	69,41677	****	****	****		
1	C/FUNGO	B	76,01523		****	****		
2	C/FUNGO	B	79,69457		****			
1	C/FUNGO	BT	79,80160		****			

autocl/filtr	c/s/fungo	tamponado/não	germinação (%)					
FILTRAD	S/FUNGO	BT	40,88586			****		
FILTRAD	S/FUNGO	B	44,25361			****		
FILTRAD	C/FUNGO	BT	50,33650			****		
AUTOCL	S/FUNGO	BT	69,76258	****				
FILTRAD	C/FUNGO	B	70,80816	****				
AUTOCL	S/FUNGO	B	76,83570	****				
AUTOCL	C/FUNGO	BT	77,26125	****				
AUTOCL	C/FUNGO	B	78,51119	****				

ANEXO V

5.6. Avaliação dos mecanismos de ação das leveduras selecionadas

5.6.5. Competição por nutrientes

efeitos	SQ	GL	QM	F	p
Levedura	15824,0	3	5274,7	176,991	0,000000
Glicose	913,9	4	228,5	7,666	0,000110
Levedura*glicose	903,6	12	75,3	2,527	0,013979
Resíduo	1192,1	40	29,8		
total		59			

C. *sublineolum* X leveduras X concentrações de glicose

leveduras	concentração glicose (%)	germinação (%)							
2S02	2	27,80000	****						
2S02	1	33,06667	****	****					
2S02	3	33,13333	****	****					
1S112	1	33,96667	****	****					
1S112	2	36,33333	****	****	****				
2S02	4	44,10000	****	****	****	****			
1S112	3	44,26667	****	****	****	****			
1S112	5	45,36667		****	****	****			
1S112	4	46,23333		****	****	****			
2S02	5	46,70000		****	****	****			
2F32	3	48,43333		****	****	****			
2F32	4	49,10000		****	****	****			
2F32	2	52,50000			****	****			
2F32	1	54,21667				****	****		
2F32	5	54,76667				****	****		
C	1	70,10000					****	****	
C	4	75,26667						****	****
C	2	78,90000						****	****
C	3	80,83333						****	****
C	5	88,40000							****

C. *sublineolum* X leveduras

leveduras	germinação (%)			
2S02	36,96000	****		
1S112	41,23333	****		
2F32	51,80333		****	
C	78,70000			****

C. *sublineolum* X concentrações de glicose

concentração de glicose (%)	germinação (%)		
0,5	47,83750	****	
1	48,88333	****	
1,5	51,66667	****	
2	53,67500	****	****
2,5	58,80833		****

ANEXO VI

5.7. Caracterização das leveduras como promotoras de crescimento vegetal

5.7.4. Solubilização de rochas potássicas

Solubilização de potássio

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Tempo	281,63	4	70,41	85,88	0,000000
Tratamento	6300,61	2	3150,31	3842,88	0,000000
Tempo*tratamento	204,39	8	25,55	31,17	0,000000
resíduo	24,59	30	0,82		
total		44			

tempo	tratamentos*	solubilização K							
3	P	11,16667	****						
6	P	11,16667	****						
3	L	11,66667	****						
9	P	12,46667	****	****					
9	L	13,16667	****	****	****				
15	L	13,50000	****	****	****				
12	P	13,50000	****	****	****				
6	L	13,70000	****	****	****				
12	L	14,66667		****	****				
15	P	15,70000			****				
3	LP	28,26667				****			
6	LP	37,23333					****		
9	LP	40,03333						****	
12	LP	42,23333						****	****
15	LP	43,06667							****

*P – somente pó-de-rocha; L – somente a levedura; LP – levedura+pó-de-rocha

tempo	solubilização K			
3	17,03333			****
6	20,70000	****		
9	21,88889	****	****	
12	23,46667	****	****	
15	24,08889		****	

tratamentos*	solubilização K		
P	12,80000	****	
L	13,34000	****	
LP	38,16667		****

*P – somente pó-de-rocha; L – somente a levedura; LP – levedura+pó-de-rocha

Valores de pH

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Tempo	0,9459	4	0,2365	0,607	0,661018
Tratamentos	95,3395	2	47,6697	122,267	0,000000
Tempo*tratamentos	1,8653	8	0,2332	0,598	0,771773
resíduo	11,6965	30	0,3899		
total		44			

tempo	tratamentos*	pH					
12	L	2,880000	****				
9	L	2,900000	****	****			
6	L	2,903333	****	****			
3	L	2,920000	****	****			
15	L	3,270000	****	****			
9	LP	3,953333	****	****			
15	LP	4,103333	****	****			
6	LP	4,513333	****	****	****		
3	LP	4,593333	****	****	****		
12	LP	4,773333		****	****	****	
3	P	6,186667			****	****	****
9	P	6,313333			****	****	****
15	P	6,493333				****	****
12	P	6,640000				****	****
6	P	6,946667					****

*P – somente pó-de-rocha; L – somente a levedura; LP – levedura+pó-de-rocha

tempo	pH	
9	4,388889	****
3	4,566667	****
15	4,622222	****
12	4,764444	****
6	4,787778	****

tratamentos*	pH			
L	2,974667	****		
LP	4,387333		****	
P	6,516000			****

*P – somente pó-de-rocha; L – somente a levedura; LP – levedura+pó-de-rocha

Acidez titulável

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Tempo	99,687	4	24,922	12,5716	0,000004
Tratamentos	755,038	2	377,519	190,4364	0,000000
Tempo*tratamentos	99,008	8	12,376	6,2430	0,000092
resíduo	59,472	30	1,982		
total		44			

tempo	tratamentos*	acidez			
3	P	0,00000	****		
6	P	0,00000	****		
9	P	0,05000	****		
12	P	0,10000	****		
15	P	0,10000	****		
6	LP	1,45000	****		
3	LP	1,45000	****		
12	LP	6,23333		****	
15	LP	8,30000		****	****
6	L	8,83333		****	****
3	L	8,83333		****	****
9	LP	9,83333		****	****
15	L	10,03333		****	****
9	L	11,23333			****
12	L	11,43333			****

*P – somente pó-de-rocha; L – somente a levedura; LP – levedura+pó-de-rocha

tempo	acidez		
6	3,427778		****
3	3,427778		****
12	5,922222	****	
15	6,144444	****	
9	7,038889	****	

tratamentos*	acidez			
P	0,05000	****		
LP	5,45333		****	
L	10,07333			****

*P – somente pó-de-rocha; L – somente a levedura; LP – levedura+pó-de-rocha

ANEXO VII

5.8. Experimentos *in vivo*

5.8.2. Avaliação do controle do desenvolvimento de *Thielaviopsis paradoxa* em toletes de cana-de-açúcar pela levedura *T. globosa* (1S112)

Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Tratamentos	26232,49	3	8744,16	24,7332	0,000003
resíduo	5656,64	16	353,54		
total		19			

tratamentos	controle (%)			
fungo	0,00000			****
s/inóculo	54,62000	****		
fungo+levedura	78,60000	****	****	
levedura	96,06000		****	