



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Dissertação de Mestrado

**SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NO
CONTROLE DA MURCHA-DE-FUSÁRIO EM *Vigna unguiculata* (L.)
Walp**

Tiago Bezerra Torres

Recife – PE

2019

TIAGO BEZERRA TORRES

**SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NO CONTROLE
DA MURCHA- DE-FUSÁRIO EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara

Coorientador: Dr. Antonio Felix da Costa

**RECIFE-PE
JULHO - 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

T693s Torres, Tiago Bezerra
Seleção, identificação e aplicação de leveduras no controle da
murcha-de-fusário em *Vigna unguiculata* (L.) Walp / Tiago Bezerra
Torres. – Recife, 2019.
51 f.: il.

Orientadora: Delson Laranjeira.

Coorientadores: Marcos Paz Saraiva Câmara, Antonio Felix da
Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife,
BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* 2. *Vigna unguiculata*
(L.) Walp 3. Leveduras 4. Biocontrole 5. Controle genético
I. Laranjeira, Delson, orient. II. Câmara, Marcos Paz Saraiva,
coorient. III. Costa, Antonio Felix da, coorient. IV. Título

CDD 632

**SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NO CONTROLE
DA MURCHA- DE-FUSÁRIO EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

TIAGO BEZERRA TORRES

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 30/07/2019

ORIENTADOR:

Profº. Drº. Delson Laranjeira

EXAMINADORES:

Profª. Drª. Rejane Pereira Neves

Drª. Iwanne Lima Coelho

**RECFE-PE
JULHO – 2019**

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, agradeço o dom da vida saúde, a sabedoria e o amor.

A minha Família, em especial meus pais Manoel e Salete, pela ajuda muitas vezes financeira, pela compreensão do isolamento que se faz necessário para a consecução da Dissertação;

Ao meu Orientador Profº Dr.º Delson Laranjeira pela colaborações e orientações por ele propostas , minha sincera admiração;

Ao Coorientador Pesquisador Dr.º Antonio Felix da Silva, pelo apoio e suporte na condução do trabalho;

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em especial aqueles que tive o prazer ser aluno durante o curso: Sônia Maria Alves de Oliveira, Marcos Paz Saraiva Câmara, Delson Laranjeira, Elineide Barbosa de Sousa e Marco Aurélio Siqueira da Gama, pela dedicação na transmissão do conhecimento em fitopatologia;

Aos meus amigos do Laboratório de Fungos de Solo (LAFSOL) sem os quais não seria possível a condução do trabalho, Iwanne, Marcelo, Thais, Letícia, Odaisa, Igor e Julia pela colaboração, aconselhamentos e paciência;

Aos amigos que disponibilizaram o seu tempo na ajuda da execução deste trabalho, em especial: Alejandro, Pedro, Davi, Suzilâne e Gerson;

A minha namorada Nadja pelo companheirismo e colaboração em muitas avaliações e conduções de experimento, além de sua companhia e parceria;

E, por fim, todos aqueles que me ajudaram de maneira direta e indireta na construção do meu conhecimento durante o Curso de Mestrado em Fitopatologia.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	8
1. Importância sócio econômica da cultura do feijão-caupi	9
2. Murcha-de-fusário do feijão-caupi	10
3. Controle biológico.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO II.....	19
Caracterização antagônica e bioprotetiva de leveduras em genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> (E.F. Sm.) Snyder and Hansen].....	20
Resumo	21
1.Introdução	23
2. Material e Métodos	24
2. Material e Métodos	24
2. Material e Métodos	24
2.1 Obtenção, preservação e identificação de isolados fúngicos.....	24
2.2 Patogenicidade	24
2.3 Caracterização da resistência de genótipos de caupi a <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tracheiphilum</i>	25
2.4 Caracterização antagônica e seleção de leveduras <i>in vitro</i>	26
2.4.1 Atividade antibiótica	27
2.4.2 Difusão de compostos em meio sólido	27
2.4.3 Identificação das cepas de leveduras	28
2.5 Efeito bioprotetivo de leveduras a murcha-de-fusário em genótipos de caupi	28
2.6 Análises estatísticas	29
3. Resultados	30
3.1 Obtenção, preservação e identificação de isolados fúngicos	30
3.2 Patogenicidade	30
3.3 Caracterização da resistência de genótipos de caupi a <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tracheiphilum</i>	31
3.4 Caracterização antagônica e seleção de leveduras	32
3.4.1 Caracterização antibiótica	32
3.4.2 Capacidade inibitória do crescimento micelial do patógeno em meio sólido	32
3.4.3 Identificação das cepas de leveduras	33
3.5 Efeito bioprotetivo de leveduras sobre genótipos de caupi a murcha-de-fusário.....	33
4. Discussão	34
5.Conclusão	36
6.Referências	37
7. Tabelas e Figuras.....	42
CONCLUSÕES GERAIS	50

RESUMO GERAL

A murcha-de-fusário do feijão-caupi causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) é relatada em muitas regiões produtoras provocando perdas na produção e produtividade no Brasil e no mundo. Não existe medida de controle eficiente para esta doença, pois o patógeno produz estruturas de resistência do tipo clamidósporos capazes de permanecer inativo no solo por um longo período sobre condições adversas. O uso integrado da resistência genética hospedeira aliada a aplicação de leveduras antagonistas, apresenta-se como uma alternativa de controle a essa doença. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a patogenicidade e a resistência de diferentes genótipos de feijão-caupi a Fot, bem como a aplicação de cepas de leveduras antagonistas como agentes de controle biológico da murcha-de-fusário do caupi. Os isolados de Fot foram avaliados pelo método de dipping ou imersão de raízes de plantas em suspensão de conídios utilizando dois genótipos considerados suscetível ao patógeno, sobre condições de casa de vegetação. Os isolados CFS-296 e CMM-732 promoveram a doença apresentando murcha, amarelecimento e redução do crescimento em plantas na cv. BR-17 gurguéia e IPA-206. A partir destes isolados, vinte genótipos foram caracterizados quanto a resistência e a interferências na altura, comprimento de raiz, número de folhas, número de ramos, diâmetro do caule, biomassa verde e seca das plantas em relação a doença. Os genótipos apresentaram diferentes resistências a doença em relação aos isolados do patógeno, afetando as características morfológicas das plantas. Todos os genótipos apresentaram altamente resistente a CMM-732, exceto o genótipo Casa Amarela-06 que se mostrou suscetível. Enquanto para CFS-296, seis genótipos apresentaram moderadamente resistentes, cinco suscetível e nove altamente suscetível. As trinta cepas de leveduras isoladas de partes da planta de feijão-caupi, foram selecionadas e caracterizadas quanto a ação inibitória e antibiótica *in vitro* sobre o isolado mais agressivo (CMM-732), e confrontadas com os dois isolados patogênicos, demonstrando que as cepas CFS- 644, CFS-652 e CFS-699 foram eficiente na redução do crescimento micelial para CFS-296, assim como CFS-738 para o isolado CMM-732. No ensaio bioprotetivo, as sementes de caupi e as plantas com 6 dias de geminadas tratadas com quatro leveduras por imersão e pulverização na concentração de 1×10^6 células mL^{-1} respectivamente, bem como inoculadas com os dois isolados patogênicos, apresentaram redução de 12-46% da severidade da doença. Em destaque, o genótipo Encruzilhada-04 tratado com CFS-652 reduziu em 46% a infecção da doença. Utilização do biocontrole com leveduras aliada a resistência hospedeira demonstrou ser uma alternativa de manejo a murcha-de-fusário.

Palavras-chaves: *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*; *Vigna unguiculata* (L.) Walp; leveduras; biocontrole; controle genético.

GENERAL ABSTRACT

Cowpea fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) is reported in many producing regions causing production and productivity losses in Brazil and worldwide. There is no efficient control measure for this disease, as the pathogen produces chlamydospore-like resistance structures capable of remaining inactive for long periods of time under adverse conditions. The integrated use of host genetic resistance coupled with the application of antagonist yeasts is presented as a control alternative to this disease. In this context, the objective of this work was to investigate the pathogenicity and resistance of different cowpea genotypes to Fot, as well as the application of antagonistic yeast strains as biological control agents of cowpea fusarium wilt. Fot isolates were evaluated by the method of dipping or immersing roots of conidial suspended plants using two genotypes considered susceptible to the pathogen under greenhouse conditions. Isolates CFS-296 and CMM-732 promoted disease with wilting, yellowing and reduced growth in cv. BR-17 Gurguéia and IPA-206. From these isolates, twenty genotypes were characterized for resistance and interference in height, root length, number of leaves, number of branches, stem diameter, green biomass and plant dryness in relation to the disease. The genotypes presented different resistance to disease in relation to pathogen isolates, affecting the morphological characteristics of the plants. All genotypes were highly resistant to CMM-732, except the Casa Amarela-06 genotype, which was susceptible. While for CFS-296, six genotypes were moderately resistant, five susceptible and nine highly susceptible. Thirty strains of yeast isolated from cowpea plant parts were selected and characterized for inhibitory and antibiotic action *in vitro* on the most aggressive isolate (CMM-732), and compared with the two pathogenic isolates, demonstrating that the strains CFS-644, CFS-652 and CFS-699 were effective in reducing mycelial growth for CFS-296, as well as CFS-738 for CMM-732 isolate. In the bioprotective assay, cowpea seeds and 6-day old twinned plants treated with four yeasts by immersion and spraying at a concentration of 1×10^6 cells mL⁻¹ respectively, as well as inoculated with the two pathogenic isolates, showed a reduction of 12-46% of the severity of the disease. In particular, the CFS-652-treated Encruzilhada-04 genotype reduced the disease infection by 46%. Use of yeast biocontrol combined with host resistance has been shown to be an alternative management approach to fusarium wilt.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*; *Vigna unguiculata* (L.) Walp; yeasts; biocontrol; genetic control.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCONTROLADORES LEVEDURAS NO CONTROLE DA MURCHA- DE-FUSÁRIO EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância sócio econômica da cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] também conhecido como cowpea (Inglês), feijão-macáassar, feijão-de-corda, feijão-da-colônia, feijão-da-praia, feijão-miúdo e feijão-fradinho, é uma espécie vegetal dicotiledônia pertencente à família das Fabaceae (FILHO et al., 2011), uma cultura anual, amplamente cultivados no mundo, principalmente na África, na América Latina e em algumas partes da Ásia e nos Estados Unidos. Esta leguminosa teve seu centro de origem no continente africano, especificamente na África Ocidental (D'ANDREA et al. 2007), e supostamente introduzida no Brasil pelo estado da Bahia por escravos, e disseminado pela zona da mata de Alagoas e Pernambuco e logo chegou aos sertões semiárido e ao agreste Nordestino (GUAZELLI, 1988).

O caupi representa grande importância aos países tropicais menos desenvolvidos exercendo uma atividade de subsistência por sua versatilidade e rusticidade. Esta leguminosa é utilizada na alimentação de animais pode ser usada como forragem, feno e silagem. Como também humana, na qual toda a planta é aproveitada, sendo o grão seco o produto mais consumido (SINGH et al., 2003), seguido dos grãos verdes e em alguns países do continente Africano as folhas e vagens muitas vezes uma importante fonte durante o período de fome (SOUSA et al., 2015). Considerado um alimento rico em proteína (23% a 30%) e nutrientes essenciais, como vitaminas do complexo B, é capaz de suprir parte das necessidades nutricionais humana e animal (BRITO, 2008).

O continente africano é o principal produtor mundial de caupi, detém aproximadamente 93,5 % da produção, seguido pela Ásia, América do Sul e Europa (FAO, 2015). O Brasil encontra-se como o terceiro país no ranking mundial de produção, mas a maior parte da desse produto é consumida no país e pouco é exportado (FILHO et al., 2011). No atual cenário brasileiro, a produção de feijão concentra-se nas regiões Norte e Nordeste, com áreas plantadas de aproximadamente 80,6 e 1.409.300 ha, durante a safra 2016/2017, respectivamente (IBGE, 2016). O Nordeste é o principal produtor de caupi no país, apresentando 385,1 mil toneladas, cerca de 54% da produção nacional (CONAB, 2018).

O caupi está entre os principais vegetais cultivados no Brasil. O Norte e Nordeste são os principais produtores e consumidores do caupi, apresenta-se como item para alimentação

básica das populações rurais e urbana. Porém, o cultivo do caupi é observado em quase todos os estados, variando os sistemas de produção desta cultura. Nas regiões Norte e Nordeste, o cultivo é realizado por empresários e agricultores familiares de forma tradicionais. Na região Centro-Oeste, detém de uma produção de larga escala, mecanizada e altamente tecnificada, provinda de médios e grandes empresários (FREIRE FILHO, 2011).

O cultivo dessa leguminosa configura-se como uma atividade de subsistência, especialmente em lugares onde a proteína animal não é facilmente disponível às famílias (NGALAMU, 2015). Considerada também como uma cultura rústica, por ser comprovadamente tolerante a solos com baixa fertilidade e ácidos, além de possuir variedades de genótipos que podem adaptar-se bem a altas temperaturas e a baixos regimes hídricos, produzindo safra com até 300 mm de precipitação, o que contribui na manutenção e desenvolvimento da produção de feijão-caupi na região Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2016).

Apesar dessa rusticidade e da grande variabilidade genética do caupi, vários fatores podem acarretar muitas perdas produtivas dentre eles, a murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Synder & Hasen. A Murcha-de-fusário pode ser considerada um dos maiores problemas fitossanitários para essa cultura, pois quando ocorre com grande frequência e agressividade sobre a cultura, resulta em perdas significativas e evasão da atividade em áreas infestadas pelo patógeno (ASSUNÇÃO et al., 2006).

2. Murcha-de-fusário do feijão-caupi

O gênero *Fusarium*, pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Nectriaceae. O gênero *Fusarium oxysporum*, corresponde os fungos causadores de murcha vascular, compreendendo mais de 120 diferentes formas especiais com base na especificidade do hospedeiro pertencentes a uma gama de famílias de plantas (MICHELSE; REP, 2009).

A murcha-de-fusário do caupi é uma doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, que já foi relatada em muitas regiões produtoras de feijão-caupi, em países da África e América (OYEKAN, 197; TERI, 1981; ELOY, et al., 2004). O patógeno apresenta 4 raças fisiológicas que podem ser identificadas por variedades diferenciadoras (SMITH et. al, 1999). A raça 3 é amplamente distribuída, enquanto a raça 1 é restrita a Nigéria (ARMSTRONG E ARMSTRONG, 1980). A doença ocorre no Brasil, porém não há relato da identificação dessas raças.

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sobrevive no solo por meio de estruturas de resistência do tipo clamidósporos e, na presença de um hospedeiro suscetível, multiplica-se rapidamente sobre os tecidos tenros do hospedeiro, tornando-se patogênico (SILVA et al., 2011). Nesse processo de patogenicidade, o fungo libera enzimas que degradam o tecido, provocando perda do conteúdo celular e subsequente desagregação desses tecidos. O patógeno penetra através do sistema radicular e coloniza o tecido vascular, causando murcha, clorose foliar e atrofiamento em toda a planta (JUNIOR et al., 2010; SINGH, 1954; COELHO, 2001). A doença ocorre com maior frequência em regiões secas e com altas temperaturas, onde as plantas estão mais sujeitas a estresse, motivo pelo qual ocasiona perdas localizadas e sazonais (ALLEN, 1983).

Em plântulas de caupi, a murcha-de-fusário caracteriza-se pelo surgimento de folhas flácidas e amareladas, seguida por rápida murcha e morte da planta. Plantas mais velhas são raquíticas, com folhas amarelas, que caem progressivamente, seguida por murcha gradual e necrose do tecido vascular (SEETHAPATHY, 2017). A doença pode reduzir em até 50 % a população de plantas, como relatado na Nigéria em um campo naturalmente infestado, consequentemente refletindo na queda produtiva (OYEKAN, 1977). Na Índia há relatos de 50% de perdas e no Brasil 86%, em campo infestado artificialmente pelo patógeno (ASSUNÇÃO et al., 2006; ALLEN, 1983).

As doenças fúngicas têm sido uma das principais causas de perdas de culturas desde que os humanos começaram a cultivar plantas. Até o momento, a disseminação epidêmica de doenças fúngicas é controlada por: (a) várias técnicas de cultivo, como rotação de culturas e evitando a propagação de solo infestado e materiais vegetais transportadores de patógenos, (b) criação de cultivares resistentes a fungos, e (c) a aplicação de agroquímicos. Embora os criadores tenham conseguido produzir cultivares resistentes a doenças fúngicas, os processos demorados de fazer cruzamentos e cruzamentos e a seleção de progênies para a presença de características de resistência tornam difícil reagir adequadamente à evolução de novas raças fúngicas virulentas. Portanto, os agricultores geralmente precisam usar produtos químicos. No entanto, os agrotóxicos são caros e acabam se tornando menos eficientes devido à evolução do patógeno. Além disso, tanto a produção quanto a persistência no solo após o uso são potencialmente prejudiciais ao meio ambiente.

Atualmente, não existem fungicidas regulamentados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2019), para o controle da murcha-de-fusário em feijão-caupi e a melhor forma de impedir o desenvolvimento da doença, em locais de incidência dela é a utilização de cultivares resistentes. No entanto, o número de cultivares com características

de interesse comercial regional é restrita (NORONHA et al., 2013). Embora os pesquisadores conseguiram produzir cultivares resistentes a doenças fúngicas, os processos são demorados é preciso fazer cruzamentos até a seleção de uma progênie com características de resistência, que dificilmente pode ou não reagir adequadamente à evolução de novas raças fúngicas virulentas.

Diante desse cenário controverso, dos prejuízos significativos causados pelo patógeno e da necessidade de medidas imediatistas, e muitos produtores inclusive os agricultores familiares utilizam de forma desorientada diversos defensivos químicos, na esperança de manutenção das safras, e pela falta de conhecimento do uso destes produtos assumem o risco a sua saúde e a segurança alimentar. No entanto, os agrotóxicos são caros e acabam se tornando menos eficientes devido à evolução do patógeno. Além disso, a sua persistência no solo após o uso é potencialmente prejudicial ao meio ambiente a saúde humana, meio ambiente e aos ecossistemas.

A escassez de produtos fitossanitário, indicados e regulamentados para uso no controle da murcha-de-fusário do caupi, somado ao número reduzido de cultivares resistentes, impulsionam pesquisas relacionadas a alternativas de controle a esse patossistema. A indução de resistência em plantas de Caupi por meio da aplicação de produtos abióticos, os indutores de Acibenzolar-S-methyl (ASM), ácido β aminobutírico (BABA) e quitosana, por exemplo, permitiram aumentar a resistência sistêmica adquirida (RSA) das plantas reduzindo a doença em até 68,90 % (RODRIGUES et al., 2006). O uso de extratos vegetais na tentativa de controle alternativo da murcha-de-fusário do caupi, no entanto os resultados obtidos foram ineficientes (SILVA et al. 2009). Apesar dessas respostas o mais indicado e eficiente é a utilização de rotação de cultura com a finalidade de diminuir a densidade do inóculo deste fungo no solo (SILVA et al., 2011).

Em geral, não há medida de controle eficiente para as murchas causadas por *Fusarium oxysporum*, em outras culturas o mais indicado é a utilização medidas integrada de controle. Porém, ao contrário do caupi essas culturas são bastantes estudadas, permitindo obter estratégias integradas de manejo, como por exemplo a utilização de práticas culturais, resistência do hospedeiro e controle biológico (AJILOGBA;BABALOLA, 2013)

Embora outros métodos alternativos de prevenção e controle da doença tenham se mostrados promissores no manejo de outros patógenos deste mesmo gênero, tais como o controle biológico (MORAIS, 2009), este método não foi abordado para *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Sabe-se que podem ser potencialmente aplicáveis, representando uma solução eficiente e ambientalmente sustentável, uma vez que, constantemente, são empregadas

em diversas culturas para controle de muitas doenças, principalmente aquelas provocadas por patógenos veiculados em solo.

3. Controle biológico

Controle biológico, é definido como a utilização de microrganismos específicos, os quais interferem junto a organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças em plantas, sendo uma ferramenta natural e uma alternativa ecológica para superar os problemas causados por métodos químicos para a proteção de plantas (CHET et al., 1997). Estes microrganismos antagonistas, também conhecidos como agentes de controle biológico (ACBs), envolve em sua maioria indivíduos dos grupos de fungos e bactérias, que podem ser de ocorrência natural ou de manipulação genética. Recentemente, as leveduras passaram a ser estudadas com maior frequência no controle de doenças de plantas, por estas apresentar diversas características antagonista promissoras para muitos patógenos de plantas e pós-colheita.

O grande interesse nesse grupo de fungos é por serem organismos amplamente distribuídos em todos os ambientes terrestres, capazes de colonizar solo, substratos e o sistema radicular de diversos tipos de plantas e produzirem muitas substâncias, incluindo enzimas degradadoras da parede celular de outros fungos, antibióticos e outros compostos, que atuam no crescimento e nos mecanismos de defesa biológica das plantas (MACHADO et al., 2012).

As leveduras são microrganismos unicelulares, que se reproduzem por fissão binária ou brotamento e que não apresentam corpo de frutificação. São presentes nos filos Ascomycota e Basidiomycota e entre os fungos mitospóricos (anteriormente denominados Deuteromycetes) (HAWKSWORTH et al., 1995). São integrantes da microbiota epifítica, endofítica, que ocupam, comumente, a superfície das folhas, casca, frutas, flores, tecidos necróticos, solo e a rizosfera. Tal qual os fungos filamentosos, as leveduras desempenham importante papel no controle biológico, sendo consideradas, atualmente, um dos principais microrganismos que constituem os nichos microbiológicos (BUSBY et al., 2016; QIN et al., 2015).

Entre os gêneros de leveduras estudados como potenciais biocontroladores destacam-se *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium* (BETTIOL et al., 2012). São várias as características que fazem das leveduras promissores biocontroladores a facilidade de produção e manutenção *in vitro*, fácil adaptação nutricional, alta capacidade de proliferação, boa capacidade colonizadora (ROBIGLIO et al., 2011). Alguns produtos que contém leveduras como princípio ativo, a exemplo do Aspire®, já são registrados mundialmente e vêm demonstrando êxito no biocontrole. CandiFruit®, Shemer®, BoniProtect®, Yield Plus®,

Aspire® e Blossom Protect™ são exemplos de outros produtos consumidos em diversos países (BETTIOL et al, 2012).

A competição por nutrientes e espaço, diretamente associada às rápidas capacidades de reprodução e assimilação de nutrientes no meio em que se encontram, é um dos mecanismos mais importantes desempenhados por leveduras e, por este motivo, é extensamente estudado (ELTARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Algumas leveduras atividade antifúngica dos compostos orgânicos voláteis (CHEN et al., 2018), podem ser úteis no controle biológico de fitopatógenos e, portanto, são potenciais fungicidas alternativos com baixo impacto ambiental.

A seleção e uso de leveduras antagônicas nativas isoladas dos mesmos nichos ecológicos, tornou-se uma estratégia eficaz para prevenir doenças pós-colheita causadas por fungos patogênicos, isso por que essas se adaptam melhor as condições de ambiente e também apresentam uma maior prevalência sobre a fruta (PEREZ et al., 2016). Diversos autores demonstram que, além da ação competitiva em relação a fungos fitopatogênicos, principalmente no biocontrole preventivo em frutos pós-colheita (BELLO et al., 2008; HAÏSSAM, 2011), certos gêneros, podem suportar diversas condições de estresse (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000; ROBIGLIO et al., 2011).

No controle de doenças de plantas, as leveduras antagonistas podem produzir hormônios, induzirem respostas de defesa do hospedeiro após sua aplicação ao tecido da planta, ou em algumas vezes pode ter ação direta. Estes antagonistas podem conferir competência rizosférica permitindo que os sítios de infecção sejam colonizados e competindo com outros patógenos (EL-TARABILY, 2004; EL MEHALAWY et al., 2004).

A preocupação residual acerca do uso de agrotóxicos, impulsiona a demanda por métodos alternativos que possam ser incluídos nos sistemas de manejos fitossanitários. Nesse contexto o controle biológico desponta como prática promissora, aplicável ao manejo de patologias vegetais em campo e em pós-colheita. Consequentemente, crescem importância e necessidade de estudos direcionados a essa perspectiva, principalmente à busca de resultados significativos e confiáveis que assegurem além da eficiência dos produtos a segurança alimentar e ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5. ed. Oxford, UK: Academic Press Publications, 2005. 922 p.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 junho 2019.
- AJILOGBA, CAROLINE F. e BABALOLA, OLUBUKOLA O. Integrated Management Strategies for Tomato Fusarium Wilt. **Biocontrol Science**, v. 18, n. 3, p. 117–127, 2013.
- ALLEN, D.J. **The Pathology of Tropical Food Legumes: Disease Resistance in Crop Improvement**. New York. John Wiley & Sons. 1983.430p.
- ARMSTRONG, GME ARMSTRONG, JK Cowpea murcham *Fusarium oxysporum* f. sp.*tracheiphilum* Race I da Nigéria. **Plant Disease**, v.64,p. 954-955, 1980.
- ASSUNÇÃO, I. P.; MICHEREFF, S. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Influence of Fusarium wilt intensity on cowpea yield. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 615–619, 2006.
- BELLO, G. D.; MÓNACO, C.; ROLLAN, M. C.; LAMPUGNANI, G.; ARTETA, N.; ABRAMOFF, C.; RONCO, L.; STOCCO, M. Biocontrol of postharvest grey mould on tomato by yeasts. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, p. 257-263, 2008.
- BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, v.5 p. 59-97, 1997.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J. V.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas– Jaguariúna, SP : **Embrapa Meio Ambiente**, 2012. 155 p.
- BRITO, E. S. **Feijão-caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 97p.
- BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 645–655, 2016.
- CARDOSO, M.J.; RIBEIRO, V.Q. Desempenho agrônômico do feijão-caupi, cv. Rouxinol, em função de espaçamento entre linhas e densidade de plantas sob regime de sequeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, p.102-105, 2006.
- CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.283-286, 1963.
- CHEN, P.H.; CHEN, R.Y.; CHOU, J.Y. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. **Mycobiology**, v.46, p.33–46, 2018. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454013>
- CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: **WICKLOW, D. T., SODERSTROM, B. (ed.) The mycota IV: Environmental and microbial relationships**. Berlin: Springer-Verlag. 1997. p. 165-184.
- COELHO, R. S. B. **Doenças fúngicas do caupi**. Anais, 5ª Reunião Nacional de Pesquisa do Caupi, Teresina, PI. 2001. pp.321-322.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acomp. safra bras. grãos, v. 6 Safra 2017/18 - Sexto levantamento, Brasília, p. 1-140, mar. 2018.
- D'ANDREA, A. C.; KAHLHEBER, S.; LOGAN, A. L.; AND WATSON, D. J. Early domesticated cowpea (*Vigna unguiculata*) from Central Ghana. **antiquity**, v. 81(313), 686-698, 2007.

DRUZHININA, I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K.; ZEILINGER S.; GRIGORIEV, I.V.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nat Rev Microbiol**, v.16. p.749–759, 2011.

EL-MEHALAWY, A.A.; HASSANEIN, N.M.; KHATER, H.M.; EL-DIN E.A.K.; 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, n. 4, p. 599–605, 2004.

ELOY, A. P.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, C. W. A.; LARANJEIRA, D.; BORGES, M. A. S. Natureza da supressividade de solo à murcha-de-fusário do caupi e dinâmica populacional de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 2, p. 209, 2004.

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

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

FAO 2015. **World Production**: Cow peas, dry. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> >. Acesso em: 10 fev. 2019.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. In: Reunião de Biofortificação no Brasil, 4., 2011, Teresina. **Palestras e Resumos...** Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 1 CDROM.

FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005a. 519p.

FUENTE, A.M. **Bioprospeção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos de humano**. 2007.144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

GUAZELLI, R.J. Histórico das pesquisas com caupi no Brasil. In: De Araújo, J.P.P.; Watt, E.E.(Eds.). O caupi no Brasil. IITA, EMBRAPA-CNPAF, Brasília, p.26-46, 1988.

HAÏSSAM, J. M. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, p. 93-105, 2011.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* Species Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2003**: sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 mai. 2018.

KESWANI C.; MISHRA, S.; SARMA, B.; SINGH, S.; SINGH, H. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 98, p.533-544, 2014.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R; SILVA, A. C.F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n.26, p 274-288, 2012.

MICHIELSE, C.B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Mol Plant Pathol**. V.10(3), p.311–24.2009

MORAIS, L. A. S. de. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectiva. Jaguariúna: EMBRAPA CNPMA, 2009. p. 139-141.

- MUKHERJEE P.K.; BUENSANTEAI, N.; MORAN-DIEZ, M.E.; DRUZHININA, I.S.; KENERLEY, C.M. Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in induced systemic resistance response in maize. **Microbiology**, 2012. v.158, p.155-165.
- NGALAMU, T.; O德拉, J.; TONGUN, N. **Cowpea production handbook**. Afristar Publishing House Juba, 2015, 54 p.
- NORONHA, M. A.; LOPES, C. L. R. B. P. ; OLIVEIRA, B. M. M. ; VENTURA, H. P. ; TORRES, R. J. A. ; MICHEREFF, S. J. ; SILVA, K. J. D. E. . Reação de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. In: III Congresso Nacional de Feijão-caupi, 2013, Recife. **Anais do III Congresso Nacional de Feijão-caupi**, 2013.
- OYEKAN, P.O Occurrence of cowpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* in Nigeria. **Plant Disease Reporter** , v.8, p488-490. 1975.
- OYEKAN, P.O. Reactions of some cowpea vaneties to *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* in Nigeria. **Tropical Grain Legume Bulletin**, Ibadam, v.8, p.47-49, 1977.
- PEREZ, M.F.; CONTRERAS, L.; GARNICA, N.M.; FERNÁNDEZ-ZENOFF, M.V.; FARÍAS, M.E.; SEPULVEDA, M.; RAMALLO, J.; DIB, J.R. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. **PLoS One**, v.11, p.1–21, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165590>
- QIN , X.; XIAO, H.; XUE,C.; YU, Z.; YANG, R.; CAI, Z.; SI, L. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 160–167, 2015.
- ROBIGLIO, A.; SOSA, M. C.; LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 211-216, 2011.
- RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA N. E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n.5, p. 492-499, 2006.
- SEETHAPATHY P.; KURUSAMY, R.; KUPPUSAMY, P. Soil borne diseases of major pulses and their biological management. **Innovative Farming**, v. 2(1), p. 1-11, 2017.
- SEETHAPATHY, P., KURUSAMY, R.; KUPPUSAMY, P. Soil borne diseases of major pulses and their biological management. **Innovative Farming**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2017.
- SILVA, G. C.; MAGALHÃES, R. C.; SOBREIRA, A. C., SCHMITZ, R.; SILVA, L. C. Rendimento de grãos secos e componentes de produção de genótipos de feijão-caupi em cultivo irrigado e de sequeiro. **Revista Agro ambiente** (On-line), v. 10, n. 4, p. 342-350, 2016.
- SILVA, J. A.; PEGADO, C. M. A.; RIBEIRO, V.V; BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp *tracheiphilum* em sementes de caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 611-616, 2009.
- SILVA, W. C.; ASSUNÇÃO, I.P.; GAUS; MONTEIRO, J.H.A.; Feijó, F.M.; FERREIRA, J. T. P. Sucessões culturais na produção de feijão-caupi e sobre atributos químicos do solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, p. 1-5, 2011.
- SINGH, B.B.; AJEIGBE, H.A.; TARAWALI, S.A.; FERNANDEZ-RIVERA, S.; ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v.84, p.169-177, 2003.
- SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMO, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p.287-300.
- SINGH, R.S. Wilt of lobia in Uttar Pradesh. **Science and Culture**, v.19, n. 9, p. 454-456, 1954.

SMITH, S.N.; HELMS, D.M.; TEMPLE, S.R.; FRATE, C. The distribution of Fusarium wilt of blackeyed cowpeas within California caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 4. *Plant Disease* v.83: p. 694–694, 1999.

SOUSA, A. M.; BARROSO NETO, A. M.; PINHEIRO, J. I.; SILVA, V. B.; NOGUEIRA, D. B. Comportamento dos preços de milho e feijão-caupi no mercado do estado do Ceará. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 5, p. 1-8, 2015.

TERI, J.M. Cowpea wilt Incited by *Fusarium. oxysporum*. f. sp. *tracheiphilum* in Tanzania. **Tropical Grain Legume Bulletin Number**, 29, 25-26, 1981.

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

VIEIRA JÚNIOR, R. J. **Ocorrência da fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*) em feijão-caupi. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa, 2010. 4 p. (Comunicado Técnico 355).

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO ANTAGÔNICA E BIOPROTETIVA DE LEVEDURAS EM GENÓTIPOS DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp CONTRA *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Sm.) Snyder and Hansen]

Caracterização antagônica e bioprotetiva de leveduras em genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Sm.) Snyder and Hansen]

Tiago Bezerra Torres¹, Delson Laranjeira¹, Marcos Paz Saraiva Câmara¹, Antônio Felix Costa², Rejiane Pereira Neves³ e Iwanne Lima Coelho¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Laboratório de Fungos do Solos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmão, CEP - 52.171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: tiagob.torres@yahoo.com.br, delson@depa.ufrpe.br, mcamara@depa.ufrpe.br

² Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA, Av. Gal. San Martin, 1371, Bairro Bongi, CEP - 50761-000, Recife, PE, Brasi. E-mail: felix.antonio@ipa.br.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Professor Nelson Chaves, s/n Cidade Universitária, CEP -50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: rejadel@yahoo.com.br

Autor para correspondência: Delson Laranjeira. Departamento de agronomia, Área de Fitossanidade, Laboratório de Fungos de Solos, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP-52171-900, Recife, PE, Brasil. (081) 3320-6060.

Resumo

A murcha-de-fusário do feijão caupi, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (Fot) é uma doença de grande importância para feijão caupi, que afeta o rendimento e produtividade desta cultura. No solo, este fungo pode sobreviver inativo por longo período de tempo através de estruturas de resistência. Assim, não há controle efetivo para esse patógeno, sendo aplicadas estratégias de manejo que visam a redução do inóculo do patógeno. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo investigar a patogenicidade em diferentes cultivares de feijão caupi, bem como a utilização de cepas de leveduras antagonistas a Fot como agentes de controle biológico da murcha-de-fusário do feijão caupi. Foram avaliadas as resistências de vinte genótipos de feijão-caupi aos isolados patogênicos causadores da murcha-de-fusário (CFS-296 e CMM-732), com base na severidade e a ação da doença sobre as características morfológicas das plantas dos genótipos. Simultaneamente, foram avaliadas cepas de leveduras, isoladas da microbiota de plantas de feijão-caupi coletadas em diferentes regiões do estado de Pernambuco, selecionadas por meio da avaliação inibitória do crescimento micelial e ação antibiótica sobre as estruturas fúngicas dos isolados CFS-296 e CMM-732, e caracterizados quanto ao efeito bioprotetivo em hospedeiros que apresentaram suscetibilidade no teste de resistência com esses patógenos. Das trinta cepas de leveduras selecionadas para a avaliação, 23 inibiram o crescimento micelial de CFS-296, destacando-se CFS-644 (*Meyerozyma caribbica*), CFS-652 (*Meyerozyma caribbica*) e CFS-699 (*Kalmanozyma brasiliensis*), que reduziram em 91%, 91% e 100%. Para CMM-732 (*Meyerozyma caribbica*), 18 cepas inibiram o seu crescimento, destacando-se CFS-738 com 100%. Os vinte genótipos apresentaram resistências variadas em relação aos isolados inoculados. Para CFS-296, nove genótipos mostraram-se altamente suscetível, cinco suscetível e seis moderadamente suscetível, enquanto para CMM-732 todos os genótipos mostraram altamente suscetível, exceto CAM-06 que expressou suscetibilidade em relação a severidade. As leveduras (CFS- 644, CFS-652, CFS-699 e CFS-738) conferiram redução da infecção dos isolados CFS-296 e CMM-732 a murcha-de-fusário, em destaque a *Meyerozyma caribbica* (CFS-652) que reduziu a severidade da doença em 46 % no genótipo Encruzilhada-04. O biocontrole com leveduras integrado a resistência genética do feijão-caupi configurou-se uma ferramenta promissora no manejo da murcha-de-fusário .

Palavras-chaves: Murcha-de-fusário, genótipos de caupi, biocontrole , controle genético.

Abstract

Cowpea fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (Fot) is a major disease for cowpea, which affects the yield and productivity of this crop. In soil, this fungus can survive inactive for long time through resistance structures. Thus, there is no effective control for this pathogen, and management strategies are applied to reduce the inoculum of the pathogen. In this context, the objective of this work was to investigate the pathogenicity in different cowpea cultivars, as well as the use of Fot antagonist yeast strains as biological control agents of cowpea fusarium wilt. The resistance of twenty cowpea genotypes to the pathogenic isolates causing fusarium wilt (CFS-296 and CMM-732) was evaluated based on the severity and the action of the disease on the plant morphological characteristics of the genotypes. Simultaneously, yeast strains isolated from the microbiota of cowpea plants collected in different regions of the state of Pernambuco were evaluated, selected by inhibitory evaluation of mycelial growth and antibiotic action on the fungal structures of isolates CFS-296 and CMM-732, and characterized for the bioprotective effect in hosts that showed susceptibility to resistance testing with these pathogens. Of the thirty yeast strains selected for the evaluation, 23 inhibited mycelial growth of CFS-296, most notably CFS-644 (*Meyerozyma caribbica*), CFS-652 (*Meyerozyma caribbica*) and CFS-699 (*Kalmanozyma brasiliensis*). 91%, 91% and 100%. For CMM-732 (*Meyerozyma caribbica*), 18 strains inhibited their growth, with CFS-738 standing out with 100%. The twenty genotypes presented different resistances in relation to the inoculated isolates. For CFS-296, nine genotypes were highly susceptible, five susceptible and six moderately susceptible, while for CMM-732 all genotypes were highly susceptible except CAM-06 which expressed susceptibility to severity. Yeasts (CFS-644, CFS-652, CFS-699 and CFS-738) reduced the infection of isolates CFS-296 and CMM-732 to fuse wilt, in particular *Meyerozyma caribbica* (CFS-652). reduced disease severity by 46% in the Encruzilhada-04 genotype. Yeast biocontrol integrated with cowpea genetic resistance was a promising tool in the management of fusarium wilt.

Keywords: Fusarium wilt, cowpea genotypes, biocontrol, genetic control.

1. Introdução

O Caupi (*Vigna unguiculata* Walp (L.) é um componente essencial dos sistemas de cultivo nas regiões áridas dos trópicos e de essencial importância para a subsistência de milhões de pessoas na África Subsaariana (Timko e Singh, 2008). Toda as partes da planta são aproveitadas, como folhas frescas jovens, vagens verdes imaturas e sementes verdes usadas como vegetais, sementes secas usadas em várias preparações alimentícias (Enyiukwu et al., 2019). A produção mundial corresponde a 7.4 milhões de toneladas, distribuídas na África (94.8%), América (1.6%), Ásia (3%) e Europa (0.6%). A Nigéria, o maior produtor e consumidor, responde por 61% da produção na África e 58% em todo o mundo (FAOstat, 2017).

Apesar da grande rusticidade, o cultivo desta cultura é limitada por diversos fatores incluindo a incidência de doenças provocada por fungos de solo, como *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (Fot) agente casual da murcha-de-fusário que pode provocar morte de até 50% (Oyekan, 1975) das plantas e reduções 86,51% no rendimento de sementes (Assunção et al., 2006). Uma vez presente no solo, o fungo é dificilmente controlado, pois apresenta estruturas de resistências que permite a sua sobrevivência por um tempo prolongado até que sejam ativados na presença de hospedeiros suscetíveis (Gordon, 2017). Não há recomendações de produtos fitossanitários eficientes para o controle químico deste patógeno, sendo o controle cultural o mais indicado, visando reduzir o inóculo presente no solo por meio da rotação de culturas (Silva et al., 2011). O controle genético também configura-se como importante alternativa no controle desta doença. Atualmente, encontram-se comercialmente poucas cultivares tolerantes e ainda não foram desenvolvidas cultivares resistentes a ação desse fitopatógeno (Noronha et al., 2008).

Diante da escassez de métodos e/ou produtos que possibilitem o controle da murcha-de-fusário no caupi (Agrofiti, 2019), principalmente quando se busca um contexto de aplicações de metodologias sustentáveis, o controle biológico emerge como uma alternativa promissora ao controle químico. Os termos “controle biológico” e seu sinônimo abreviado “biocontrole” têm sido utilizados em diferentes campos da biologia, principalmente a entomologia e a fitopatologia. Na fitopatologia, o termo se aplica ao uso de antagonistas microbianos para suprimir doenças, bem como ao uso de patógenos específicos do hospedeiro para controlar populações de ervas daninhas (Pal et al., 2006).

A utilização de leveduras como agente de controle biológico, mostraram uma redução significativa das doenças de plantas, por meio de diversos mecanismos para reduzir o desenvolvimento do patógenos e doenças (Spadaro and Droby, 2016). Produção de enzimas

hidrolíticas e antibióticos, competição por nutrientes de plantas e colonização de nicho, indução de mecanismos de defesa do hospedeiro e interferência com fatores de patogenicidade no patógeno são os mecanismos mais importantes (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a patogenicidade em diferentes cultivares de feijão caupi, bem como a utilização de cepas de leveduras antagonistas a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* como agentes biocontroladores e o Cercobin 700 WP no manejo da murcha-de-fusário do feijão caupi.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção, preservação e identificação de isolados fúngicos

Os isolados de Fot utilizados neste trabalho foram cedidos pelas coleções de Culturas Fúngicas “Prof. Maria Menezes” (CMM) e “Coleção de Fungos de Solos” (CFS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE.

As leveduras utilizadas foram isoladas conforme Tenório et al., 2019, a partir de tecidos do caule, ramo, vagem, sementes verdes e folhas de feijão-caupi. Foram amostradas cinco plantas, por área coletada, nas regiões de Mata Atlântica (Pernambuco), Agreste (Pernambuco) e Sertão (Pernambuco e Ceará). Seis fragmentos de tecidos, de cada órgão das plantas, foram transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada-ADE (10 mL), acrescida de cloranfenicol (50 mg L^{-1}), submetidos a banho de ultra-som durante 25 minutos. Os tubos foram agitados em vórtex, em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi depositada e semeada em placas de Petri contendo meio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YEPD). As placas foram mantidas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante um período de 72 horas e as colônias emergentes foram purificadas, por sucessivos repiques em placas de Petri contendo meio YEPD, e preservadas em tubos em tubos criogênicos graduados de rosca externa (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil) pelos métodos de Castellani e óleo mineral, respectivamente.

2.2 Patogenicidade

Para condução do teste de patogenicidade, os isolados de Fot foram inoculados por meio do método “dipping” ou imersão de raízes de hospedeiros considerados suscetíveis, a cv.BR-17 e a IPA-206 (Albuquerque et al., 2001) em suspensão de esporos. O inoculo dos isolados Fot foram cultivados em Erlenmeyers contendo 150mL de meio batata-dextrose (BD), sob agitação constante (100 rpm) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 7 dias em condições de ambiente no laboratório.

As sementes destes genótipos foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 1 min., lavadas com água estéril e semeadas em copos descartáveis contendo substrato de terra vegetal estéril (capacidade 180 mL, pré-furados na base para favorecer a drenagem). Quando as plantas apresentavam dois pares de folhas totalmente abertas (precisamente aos 7 dias após a germinação), as mesmas foram removidas e as raízes lavadas para remoção do substrato. A porção da extremidade das raízes, aproximadamente um terço, foi removida e a porção radicular mantida na planta foi imersa por 5 minutos em suspensão de esporos de *Fot*, (1×10^6 conídios mL⁻¹). Após a inoculação, as plantas foram replantadas em vasos contendo aproximadamente 2,0 kg de terra vegetal esterilizada (4 plantas por vaso e 5 vasos por genótipo). Os vasos foram mantidos em condições de casa-de-vegetação com temperatura média de 36 °C±2 e umidade 47%±5.

A avaliação da reação de cada planta ocorreu aos 21 dias após a inoculação, com base na escala de notas de 0 a 4, onde 0 = ausência de sintomas; 1 = ausência de sintomas externos de murcha e presença de escurecimento vascular confinada à raiz principal; 2 = sintomas iniciais da doença (amarelecimento e murcha) e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule; 3 = sintomas bem definidos da doença (amarelecimento, murcha, lesões foliares e seca de folhas) e escurecimento vascular atingindo o terço médio da planta; e 4 = sintomas bem definidos da doença e escurecimento vascular atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas (Nascimento et. al, 1995). Após a avaliação da severidade, fragmentos das plantas com sintomas foram coletados e submetidos a processo de isolamento indireto, para confirmação da presença e ação patogênica dos isolados de *Fot*.

Os percentuais de severidade da doença, foram calculados a partir das notas atribuídas, de acordo com a escala previamente mencionada, utilizando-se o cálculo do Índice de Doença (ID) de McKinney (1923), onde: $ID = [\sum(\text{grau de escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$. Os parâmetros como a altura de plantas (AP), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), e número de ramos (NR), massa verde (MV) e massa seca (MS) e comprimento de raiz (CR) foram avaliados e comparados com os valores obtidos nos tratamentos controles, a fim de verificar a influência do patógeno sobre o desenvolvimento fisiológico das plantas de feijão caupi.

2.3 Caracterização da resistência de genótipos de caupi a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*

A avaliação da reação dos genótipos de feijão-caupi quando a ação fitopatogênica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, foi realizada conforme os métodos descritos para a

patogenicidade. Foram utilizados vinte genótipos de caupi: Belém de São Francisco 01 (BSF), Casa Amarela 03 (CAM-03), Casa Amarela 06 (CAM-06), Cavaleiro 13 (CAVA-13), Cavaleiro 18 (CAVA-18), Cordeiro 03 (COR-03), Encruzilhada 02 (ENC-02), Encruzilhada 04 (ENC-04), Juazeiro 02 (JUA-02), Juazeiro 09 (JUA-09), Sempre Verde Imbimirim (SVR), Taipú 01 (TAI), Salgueiro (SAL), BRS-Imponente (IMP), BRS- Maratão (MAR), Canapú (CANA), Milênio (MIL) e Manteiguinha (MAN) , incluindo os padrões de suscetibilidade: cv. BR-17 gurguéia (BR-17) e IPA-206, todos cedidos pelo banco de germoplasma do Instituto Pernambucano de Agronomia - IPA.

As sementes destes genótipos foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (1%) durante 1 minuto, lavadas em água estéril, e semeadas em bandejas de isopor com 200 células, preenchidas com substrato de terra vegetal) esterilizado. Após sete dias da data de germinação, quando as plantas apresentavam dois pares de folhas totalmente abertas, as plantas foram inoculadas pelo método “dipping”, conforme descrito nos procedimentos de avaliação da patogenicidade, por imersão das raízes em suspensão de esporos dos isolados de *Foto* selecionados. Após a inoculação, as plantas foram transplantadas para copos descartáveis contendo 0,5 kg de terra vegetal, previamente furados na base para favorecer a drenagem. Em cada copo, foi transplantada uma planta, utilizando-se 20 copos por genótipo (4 plantas/repetição e 5 repetições/genótipo). Em seguida foram mantidos em condições de casa-de-vegetação com temperatura média de $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$ e umidade $47\%\pm 5$. Como controle, foram mantidos vinte copos a mais de cada genótipo com plantas submetidas ao “dipping”, porém imersas em água esterilizada.

A avaliação da reação de resistência dos genótipos foi realizada aos 14 dias após a inoculação, utilizando a escala de notas proposta por Nascimento et. al (1995), conforme ao teste de patogenicidade avaliados os parâmetros AP, DC, NF, NR, MV, MS e CR. Quanto a resistência, os genótipos foram classificadas por meio das notas médias em cinco classes de reação: 0 = semelhante à imune (SI); 0,1-1,0 = altamente resistente (AR); 1,1-2,0 = medianamente resistente (MR); 2,1-3,0 = suscetível (SU); 3,1-4,0 = altamente suscetível (AS) (NORONHA et al., 2008).

2.4 Caracterização antagonica e seleção de leveduras *in vitro*

As cepas de leveduras obtidas do isolamento de plantas de feijão-caupi, foram caracterizadas quanto a ação antibiótica e selecionadas segundo a capacidade inibitória ao desenvolvimento de *Fot in vitro*, por ação de compostos secundários difundidos em meio de cultivo.

2.4.1 Atividade antibiótica

A atividade antibiótica dos isolados selecionados no experimento anterior foi realizada em relação ao desenvolvimento *in vitro* do isolado patogênico mais virulento.

O patógeno e o antagonista foram cultivados simultaneamente em placas de Petri em meio YEPD, no qual as leveduras foram semeadas, desenhando-se uma risca contínua em duas extremidades da placa com auxílio de “Swab” estéril. No centro de cada tratamento foi repicado um disco de 0,5 cm de diâmetro contendo as estruturas fúngicas do patógeno. No tratamento controle, as placas foram cultivadas apenas com a colônia do patógeno. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico PVC, incubadas por oito dias à 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

A avaliação constou da observação do halo de inibição formado pelas cepas de leveduras sobre o fungo. Os halos foram classificados quanto sua expressão visual sobre a colônia do patógeno, conforme a Figura 1, assumindo em três tipos: “+” para halos pouco expressivos; “++” halos medianamente expressivos; e “+++” halos muito expressivos.

2.4.2 Difusão de compostos em meio sólido

A produção de substâncias antibióticas das cepas de leveduras foi avaliada adaptando-se o método descrito por Collazo et al., (2017). As leveduras foram cultivadas individualmente em tubos “Falcon” (capacidade de 50 mL) contendo 30 mL YEPD líquido, a 25 °C em agitação constante de 80 rpm).

Após 72 horas de cultivo, os tubos foram centrifugados (por cinco minutos a 4000 rpm) e o sobrenadante, transferido a um tubo estéril e, posteriormente misturados ao meio Ágar Água (20gL^{-1}), na proporção 1:1. O meio ágar-água adicionado de sobrenadante das leveduras foi transferido para placas de Petri (10 mL/placa) e após completa solidificação, coberto por uma segunda camada de 10 mL de meio BDA. As placas foram incubadas por 48 h a 28 ± 2 °C (5 placas/tratamento) e, após esse período, depositou-se um disco contendo estruturas do isolado agressivo do patógeno ($\varnothing=0,5$ cm) sobre o meio, na região central da placa. O tratamento controle consistiu no cultivo do patógeno na ausência do antagonista.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, assumindo-se como tratamento cepas individuais de cada agente antagônico. O teste foi repetido utilizando-se as leveduras que desempenharam os melhores resultados quanto a capacidade inibitória sobre o crescimento micelial do isolado mais agressivo, no qual foi incluído outro isolado patogênico selecionado no teste de patogenicidade.

As avaliações foram realizadas a cada 24 horas, até o completo desenvolvimento do patógeno no tratamento controle. A avaliação consistiu na medição dos diâmetros das colônias nos dois sentidos perpendiculares entre si tomando-se como valor de crescimento a média dos dois eixos, e em seguida, esses valores foram usados para estimar o Índice de velocidade de crescimento micelial - IVCm, (mm dia^{-1}) e a Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial – PIC (%), por meio das equações (q.1):

$$\text{a) IVCm} = \sum \frac{C_f - C_i}{t} \qquad \text{b) PIC} = \frac{C_c - C_f}{C_c}$$

Onde: C_i = crescimento inicial, C_f = crescimento final, C_c = Crescimento final tratamento controle e t = intervalo de avaliação.

Os resultados de IVCm e PIC foram submetidos a análise de variância – ANOVA e, quando significativos, ao teste de comparação de médias pelo Teste Scott Knott a 5% de probabilidade, para determinar os tratamentos mais eficientes.

2.4.3 Identificação das cepas de leveduras

Os isolados de levedura selecionados para o ensaio de biocontrole foram identificados de acordo com as taxonomias clássicas (Kurtzman et al. 2011) e moleculares (Negri et al. 2014). A região do espaço de transcrição interna 1 e 2, incluindo o gene 5.8S rRNA (ITS), foi amplificada utilizando primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). As sequências de DNA geradas a partir dos isolados foram comparadas às sequências depositadas no GenBank usando Blastn (Altschul et al. 1997).

Os produtos da PCR (amplicons) foram sequenciados e as sequências obtidas depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) e comparadas filogeneticamente por análise de Máxima Verossimilhança - MV e inferência Bayesiana - IB.

2.5 Efeito bioprotetivo de leveduras a murcha-de-fusário em genótipos de caupi

As leveduras selecionadas que apresentaram potencial antagonico *in vitro* contra o Fot foram testadas como biocontroladoras por meio do tratamento das sementes antes do semeio, e aplicação adicional na planta, 24 horas antes dessas serem inoculadas com o patógeno.

As sementes de cada um dos genótipos foram inicialmente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (1%), secas em temperatura ambiente de 28 ± 2 °C, e tratadas com inóculo dos agentes antagonistas por imersão em suspensão de leveduras (1×10^6 células mL^{-1} + 1% de Tween 80). As sementes imersas na suspensão foram mantidas em agitação de 90rpm durante 20 minutos, e secas a $28 \pm$ °C por 3 h.

Os genótipos tratados foram germinados e cultivados em copos descartáveis de 180mL preenchidos com terra vegetal. Aos 6 dias de germinadas, as plantas foram submetidas a um novo tratamento com suspensão de leveduras, as mesmas utilizadas anteriormente nas sementes, por meio de aspersão de 50 mL de suspensão (10^6 células mL^{-1}) sobre as folhas. No dia seguinte (24 horas), as plantas foram inoculadas com os isolados patogênicos conforme descrito no teste de patogenicidade, transplantadas para vasos contendo 2,0 kg de terra vegetal. Foram transplantadas quatro plantas por vaso, cada tratamento constituiu de quatro vasos. Como controle, foram mantidos quatro vasos de cada um dos genótipos inoculados apenas com água esterilizada.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso - BIC, com seis repetições por tratamento, onde cada tratamento correspondeu a um vaso contendo 4 plantas. As determinações de ação biocontroladora e o efeito sobre a resistência em cada cultivar também seguirá o mesmo critério para Avaliação de resistência de cultivares de feijão-caupi a Fot e os resultados dos parâmetros submetidos a análise estatística (ANOVA) e quando significativos a teste de comparação de médias e os resultados obtidos confrontados com os testes iniciais sem o uso biocontroladores. As notas médias da severidade foram levadas em consideração para classificação do efeito das leveduras sobre os genótipos.

2.6 Análises estatísticas

Os experimentos realizados em casa de vegetação foram conduzidos em blocos casualizados e experimentos *in vitro* foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. As médias dos resultados dos parâmetros da patogenicidade foram transformadas utilizando a equação $\sqrt{x + 0,5}$, enquanto na caracterização da resistência de genótipos de caupi apenas os resultados de diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), e número de ramos (NR), massa verde (MV) e massa seca (MS) e comprimento de raiz (CR) foram transformados utilizando $\sqrt{x + 1}$.

As médias dos resultados dos experimentos foram submetidas à análise de variância, comparados e agrupados pelo teste de média de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 1998).

3. Resultados

3.1 Obtenção, preservação e identificação de isolados fúngicos

Para a realização deste trabalho, foram cedidos onze isolados identificados como *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) o CMM-005, CMM-013, CMM-22, CMM-28, CMM-031; CMM-033, CMM-034, CMM-041, CMM-043, CMM-732 e CFS-296 da Coleção de Culturas Fúngicas “Prof. Maria Menezes” (CMM) e Coleção de Fungos de Solos (CFS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, obtidos de plantas de feijão-caupi que apresentavam sintomas de murcha e escurecimento vascular.

As amostras de plantas de feijão caupi coletadas de diferentes regiões, resultaram na obtenção de 114 (cento e quatorze) cepas de leveduras, sendo: 5 isolados da região de Belém de São Francisco-PE, 28 de Cariús-CE, 43 de Recife-PE, 38 de Vitória de Santo Antão-PE. Em relação ao órgão vegetal da planta, foram obtidos: 70 isolados de folhas, 4 de grão, 17 de ramo, 11 raiz e 12 de vagem. As leveduras apresentaram características como coloração: creme, laranja, branca e marrom; textura: lisa ou rugosa; Brilho: brilhosa ou opaca. Das 114 cepas de leveduras, 75 foram recuperados e preservados em tubos Eppendorf de 5mL pelo método de Castellani e óleo mineral e depositadas na Coleção de Fungos de Solos (CFS), para a utilização dos experimentos de biocontrole da murcha-de-fusário no feijão caupi.

3.2 Patogenicidade

Entre os isolados avaliados, os isolados CMM-732 e CFS-296 foram patogênicos em relação às cultivares suscetíveis BR-17 Gurguéia e a IPA-206 (Figura 3). Na BR-17 Gurguéia, os sintomas surgiram aos 8 dias, com o amarelecimento e murcha das folhas, e com 10 dias, ocorreu a queda das folhas e morte de plantas, a severidade observada foi de 100% e 89,6% para CMM-732 e CFS-296 respectivamente (Figura 2). Em comparação, para IPA-206 os sintomas surgiram aos 10 dias, o amarelecimento e murcha das folhas, e com 12 dias morte de plantas e a severidade foi de 100% para CMM-732 e 83.8% para CFS-296. Os demais isolados interferiram nas características fisiológicas das plantas, em comparação com o tratamento controle, porém não ocasionaram os sintomas típicos da murcha-de-fusário em caupi (Figura 2).

Quando comparados, o isolado patogênico CMM-732 foi o mais virulento em relação ao CFS-296, afetando negativamente as plantas da cv. BR-17 na altura, comprimento de raiz, número de folhas, diâmetro do caule, biomassa seca e biomassa verde, exceto o diâmetro do caule que não interferiu no desenvolvimento em relação ao tratamento controle. No genótipo

IPA-206, o isolado interferiu negativamente na altura, comprimento da raiz, número de ramos, biomassa verde e biomassa seca das plantas.

O isolado CFS-296 apresentou menor redução nos parâmetros morfológicos das plantas, mesmo manifestando a doença (sintomas de murcha e escurecimento vascular) nos genótipos. Os parâmetros de comprimento de raiz e biomassa seca foram afetados para a cv. BR-17, enquanto para IPA-206 a altura e a biomassa seca.

Na altura das plantas do genótipo IPA-206, os isolados CMM-005, CMM-013, CMM-022, CMM-034, CMM-043, CMM-041, CMM-028, CMM-033, CMM-031 se comportaram estatisticamente semelhantes ao tratamento controle. Da mesma forma sobre a cv. BR-17, os isolados CMM-033, CMM-013, CMM-041, CMM-028, CMM-034 não diferiram estatisticamente do controle. Entretanto, os isolados CMM-031, CMM-043, CMM-005, CMM-022 o comportamento foi igual para o isolado CFS-296.

Diante dos resultados de severidade e dos parâmetros morfológicos analisados, os isolados de CFS-296 e CMM-732 foram selecionados para a realização dos experimentos de caracterização da resistência dos genótipos, bem como a ação antagônica e seleção de leveduras *in vitro* e *in vivo*.

3.3 Caracterização da resistência de genótipos de caupi a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*

De acordo com os resultados das médias das notas de severidade, os genótipos inoculados com CFS 296 foram considerados moderadamente suscetíveis(MR): BSF, CAM-06, COR-03, MAR, SAL e TAI; Suscetíveis (SU): CAM-06, CAVA-18, ANC-02, ENC-04 e MAN; Altamente suscetível (AS): BR-17, CANA, CAVA-13, IMP, IPA, JUA-02, JUA-09, MIL e SVR. Em comparação, todos os genótipos foram classificados como altamente suscetíveis, exceto CAM-06 que foi classificado como suscetível conforme os resultados da severidade provocado pelo isolado CMM-732 (Figura 4).

Em geral, a doença incitada por CMM-732 e CFS-296 causaram uma redução de 9,7 - 32,5% na Altura da planta (ALT), 26,8-70,5% no comprimento da raiz (CR), 41,9 - 72,6% no número de folhas (NF), 21,7 - 47,1% no número de ramos (NR), 25,4 - 88% no diâmetro do caule (DC), 44-96,2 na biomassa verde (BV) e 33-89,3% na biomassa seca (BS) nos genótipos BR-17, ENC-04, IMP, IPA e JUA-02 (Tabela1). Nos genótipos BSF, CAVA-13, CAVA-18 e COR-03 poucas características foram afetadas por estes fungos.

O isolado CMM-732 foi agressivo para ENC-02, JUA-09, MAN, MAR, MIL, SVR e TAI, conforme os resultados dos parâmetros avaliados apresentado na tabela 1. Na maioria dos

genótipos, este isolado afetou um quantidade maior de características das plantas, proporcionando uma redução de 40,3% na altura, 70,5% no comprimento da raiz, 47,2% no número de ramos, 79,1% número de folhas, 87,8% diâmetro do caule, 96,2% na biomassa seca e 89,3% na biomassa verde.

Enquanto o isolado CFS-296 foi pouco agressivo em relação a doença quando comparado ao outro isolado, alterando poucas características morfológicas, porém no caso do ENC-02 não foram observadas alterações nas morfologias das plantas (Tabela 1). No entanto, observou-se alterações no comprimento da raiz (CR) em BSF; a altura (ALT) e diâmetro do caule (DC) em CAVA-18; a Biomassa seca (BS) em COR-03; a altura (ALT) em MAN; e Altura e o comprimento da raiz em TAI. Este proporcionou uma redução de 32,5 % na altura, 65% no comprimento da raiz, 42,1% no número de ramos, 73,2% número de folhas, 87,8% diâmetro do caule, 56,5% na biomassa seca e 89,4% na biomassa verde.

3.4 Caracterização antagonica e seleção de leveduras

3.4.1 Caracterização antibiótica

As leveduras variaram a ação antibiótico sobre o patógeno mais agressivo (CMM-732), entre as 76 cepas avaliadas, 30 obtiveram a formação do halo de inibição do crescimento micelial (Tabela 2). A classificação qualitativa proposta em relação ao halo de inibição, permitiu classificar em três grupos de cepas. Grupo das leveduras que apresentaram pouca ação antibiótica, ou seja, o halo tipo '+': CFS-625, CFS-629, CFS-671, CFS-687, CFS-690, CFS-708, CFS-716 e CFS-735. Grupo em que apresentaram o halo tipo '++': 635, 640,642,647,651,675,676,685,689,693 e 727. Grupo em que apresentaram o halo tipo '+++': CFS 643, CFS 650, CFS 677, CFS 678, CFS 684, CFS 696, CFS 701, CFS 738, por apresentar um halo inibidor de diâmetro bem expressivo.

3.4.2 Capacidade inibitória do crescimento micelial do patógeno em meio sólido

No primeiro experimento, de acordo cerca de 94 % das cepas de leveduras apresentaram capacidade inibitória por difusão de compostos em meio solido sobre o crescimento micelial do isolado mais agressivo do patógeno (CMM-732), porém as cepas CFS-695, CFS-687, CFS-628 e CFS-725 não interferiram no desenvolvimento do fungo (Tabela 2).

As cepas de leveduras CFS-631, CFS-677, CFS-701 e CFS-730 foram eficientes no controle do desenvolvimento *in vitro* do isolado CMM-732, inibindo em 100% do crescimento micelial deste fungo. Contudo, trinta cepas de leveduras apresentaram os melhores resultados,

pois variaram em 50-100% a porcentagem de inibição dos crescimentos micelial do isolado CMM-732, nesta ocasião, foram novamente avaliadas utilizando a mesma metodologia, porém sobre os dois isolados patogênicos (CMM-732 e CFS-296).

No segundo experimento, a quantidade de cepas leveduras antagonistas variaram quanto a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) entre os patógenos. Aproximadamente 76% das cepas de leveduras apresentaram antagonismo ao isolado CMM-732, assim como 60% para o isolado CFS-296 quando comparados com o tratamento controle.

O desenvolvimento do isolado CMM -732 foi reduzido de 29,51% a 100%, bem como de 25,82% a 100% para CFS-296 pelas leveduras. A cepa CFS -738 foi a única que inibiu 100% do crescimento micelial do CMM-732. No entanto, as cepas CFS- 644, CFS-652 e CFS-699 inibiram em 91%, 91% e 100% o desenvolvimento micelial do CFS-296 (Tabela 3). De acordo com esses resultados, as quatro cepas que apresentaram melhor eficiência antagônica contra os patógenos nos testes *in vitro* (Figura 5) foram identificadas e escolhidas para avaliar o efeito bioprotetivo nos genótipos de caupi Juazeiro 09, Encruzilhada 04 e na cv. BR-17 Gurguéia em relação a patogenicidade dos isolados CMM-732 e CFS-296.

3.4.3 Identificação das cepas de leveduras

As sequências ITS e 26S rDNA identificaram os isolados CFS-644, CFS-652 e CFS-738 como *Meyerozyma caribbica*, com aproximadamente 100% de similaridade a um isolado dessa espécie (KY104217). A sequência do isolado CFS-699 foi idêntica à do isolado *Kalmanozyma brasiliensis* KF737866. As sequências variaram de 596 pb a 723 pb e foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KX781276, KX781277 e KX781278, respectivamente.

3.5 Efeito bioprotetivo de leveduras sobre genótipos de caupi a murcha-de-fusário

As leveduras não apresentaram redução no desenvolvimento da doença nos genótipos BR-17 e JUA-09, assim como o tratamento químico (CERCOBIN 700 WP). Nestes genótipos, a doença variou de 79% a 100% de severidade, classificando-os como altamente suscetível (Figura 6). No entanto, as reações de severidade variaram entre os tratamentos com ENC-04, observando reduções na infecção tanto em CFS-296 como em CMM-732.

Em ENC-04 As severidades variaram de 79% a 88 (altamente suscetível), de 65% a 69% (suscetível) e de 47% para (moderadamente suscetível) entre os isolados patogênicos e os tratamentos. Os tratamentos CFS-652, CFS-738 e CERCOBIN 700 WP provocaram uma diminuição da doença causada pelo o isolado CFS-296. Assim como, CFS-652, CFS-699 e o

CERCOBIN 700 WP para o patógeno CMM-732, considerado o mais agressivo na patogenicidade. O tratamento com a levedura CFS-644, a infecção dos patógenos não foram reduzidas (altamente suscetível). Porém, a cepa CFS-652 provocou uma diminuição da severidade, no qual as plantas do genótipo apresentaram reações diferentes a doenças provocadas pelos patógenos, nos quais as plantas apresentaram-se modernamente suscetíveis ao isolado mais agressivo, e suscetíveis a o menos agressivo.

4. Discussão

Entre os 11 isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* cedidos da Coleção de Fungos Professora Maria Menezes(CMM) e Coleção de Fungos de Solo (CFS), dois estimularam a doença (CMM-732 e CFS-296), provocando murcha e escurecimento vascular na cv. BR-17 Gurguéia e IPA-206, considerados padrões de suscetibilidade para esse patógeno. O isolado CMM-732 apresentou maior agressividade em relação a CFS-296, pois demonstrou uma maior intensidade da doença sobre os genótipos suscetíveis. Os nove isolados não apresentaram patogenicidade, ou seja, não foi observado os sintomas expressos nas plantas dos genótipos de feijão-caupi e nem o escurecimento vascular característico da murcha-de-fusário, no entanto causaram redução nos parâmetros morfológicos analisados neste trabalho. Os resultados coincidem com as informações relatadas por Assunção et al. (2006), Rodrigues et al., (2007) e Noronha et al. (2008) em relação a suscetibilidade da cv. BR-17 Gurguéia e IPA-206 ao fungo causador da murcha-de-fusário no caupi.

O método de inoculação “dipping” ou imersão de raízes em suspensão de conídio, foi rápido e eficiente na caracterização dos isolados patogênicos e agressivos ao caupi (Cavalcanti et al., 2002). A inoculação por este método é utilizado em muitos trabalhos na determinação da resistência de genótipos a patógenos de plantas por sua rapidez no estabelecimento da doença, por causar um dano na raiz é considerado agressivo causando variações nos resultados de resistência em comparação a outras metodologias menos hostis (Shaw et al., 2016).

Neste estudo, 75 leveduras foram isoladas de plantas de feijão-caupi coletadas de diferentes regiões climáticas e avaliadas *in vitro* contra *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. Quatro leveduras isoladas, *Meyerozyma caribbica* CFS-644, *Meyerozyma caribbica* CFS-652, *Meyerozyma caribbica* CFS-738 e *Kalmonazyma brasiliensis* CFS-699, foram selecionados como potenciais agentes de biocontrole de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*.

O estudo demonstrou também que as leveduras apresentaram variação na intensidade da ação antagônica no crescimento micelial dos isolados patogênicos, supondo que essas cepas

apresentem diferentes mecanismos de interação antagônica, assim como os patógenos podem apresentar diferentes sensibilidade a esses mecanismos.

O método de difusão de inibição do crescimento micelial, aliado a método de antibiose permitiu uma melhor caracterização e seleção das leveduras antagonistas no controle *in vitro* do fungo. Muitas são as técnicas utilizadas para a triagem de cepas antagonista de leveduras, o método de antibiose em emparelhamento ágar usando diferentes substratos para avaliar medir as zonas de inibição (Hernández Montiel et al., 2018), determinação de atividade killer de leveduras, filtrados da cultura inibição do crescimento vegetativo e germinação de esporos de patógenos fúngicos *in vitro* (Pretscher et al., 2018), ou também a utilização frutos, folhas e plantas inoculados com o antagonista e os patógenos (Buck, 2002; Wang et al., 2009).

As leveduras endofíticas e epifíticas isoladas de hospedeiros e utilizadas como agentes de controle biológico são amplamente pesquisadas, pois uma grande parte da população desses microrganismos apresenta efeito inibitório a muitos patógenos de plantas (Wang et al., 2009; Pretscher et al., 2018; Martins et al., 2019). Na literatura a *Meyerozyma caribbica* é relatada como agente promissor no controle de patógenos em frutos pós-colheita, por apresentar grande potencial antagônico por competição de espaço e parasitismo, além de produzir enzimas hidrolíticas como quitinase, N-acetil-b-D-glucosaminidase e b-1, 3-glucanase (Bautista-Rosales et al., 2013; Tournas and Katsoudas, 2019).

No entanto, nenhum relatório anterior sobre a aplicação e potencialidade de *Kalmanozyma brasiliensis* como agentes de biocontrole foi encontrado e, portanto, os mecanismos de ação são desconhecidos.

Os ensaios *in vitro* foram importantes para selecionar as cepas de leveduras, porém era necessário também avaliar o potencial de biocontrole em associação com plantas infectadas com o patógeno. As cepas investigadas variaram na redução das doenças nos genótipos estudados, sendo mais perceptível no genótipo encruzilhada-04, na qual *Meyerozyma caribbica* reduziu 46% da infecção de plantas. As demais leveduras e o controle químico com Cercobin 700 WP as infecções foram reduzidas entre 2,6% a 23,9% nos genótipos estudados. O trabalho sugere que essas cepas juntamente com genótipo (ENC-04) deveriam ser submetidas a experimentos de avaliação em campo naturalmente infestado com o patógeno. Ternório et. al. (2019) observaram que *Candida saopaulonensis*, *Cryptococcus laurentii*, *Bullera sinensis* isoladas de plantas de feijão-caupi, reduziram 55 a 75% o tombamento e a podridão do colo causado por *Rhizoctonia solani* no caupi por meio de sementes tratadas com essas leveduras.

A redução da doença não foi observada nos genótipos BR-17 e JUA-09. Neste caso, o rápido estabelecimento do patógeno foi favorecido pela utilização do método de inoculação

“dipping” ou imersão de raízes aliados a alta suscetibilidade do hospedeiro e a especificidade do patógeno. Em condições naturais de campo o fungo ocorre de maneira lenta os sintomas podem se desenvolver muito tarde (Assunção et al., 2006), as vezes confundido com outras doenças (Okungbowa and Shittu, 2012). Além disso, *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* apresenta uma diversidade genética (Pasquali et al., 2004; Pottorff et al., 2012, 2014), e isso pode dificultar o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogenicidade dos isolados e sua interferência em relação com as leveduras estudadas. Neste contexto, sugere-se a utilização de metodologias de inoculação de plantas menos agressivas e que simulem condições de campo (Assunção et al., 2006; Silva et al., 2011) para esse patógeno, para melhor observação da ação protetoras dessas leveduras sobre os genótipos em relação a doença, associando os parâmetros de produção e produtividade. Em geral, as murchas causadas por *Fusarium oxysporum* são de difícil controle, a melhor indicação é um plano integrado visando uma estratégia de manejo, com a utilização de plantas resistentes, controle biológico e o controle cultural (Yasmin et al., 2018).

5. Conclusão

Os resultados desse trabalho evidenciam o potencial do genótipo CAM-6 de feijão-caupi por apresentar menor severidade ao isolado CMM-732, considerado o patógeno mais agressivo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. Assim como, BSF, CAM-06, COR-03, MAR, SAL e TAI que se destacaram por apresentarem as menores severidades da murcha-de-fusário, classificando-as em moderadamente resistentes para CFS-296 considerado o isolado menos agressivo. A morfologia dos genótipos de feijão-caupi COR-03 e BSF foram menos afetadas com a doença.

As quatro cepas de leveduras conferiram ação controladora sobre o *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* no desenvolvimento *in vitro*, variando em relação ao isolados. Na qual, *Meyerozyma caribbica* (CFS-652) obteve maior ação de biocontrole da murcha-de-fusário no genótipo ENC-04.

6.Referências

Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 junho 2019.

Albuquerque, M.P., Coelho, R.S.B. & Perez, J.O., 2001. Avaliação de linhagens e cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) em relação a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. Caderno Omega – Série Agronomia 12:5-7. 2001.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>. PMID:9254694

Assunção, I.P., Michereff, S.J., Mizubuti, E.S.G., Brommonschenkel, S.H., 2006. Influência da intensidade da murcha-de-fusário no rendimento do caupi. *Fitopatol. Bras.* 28, 615–619. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582003000600006>

Bautista-Rosales, P.U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N.A., Ragazzo-Sánchez, J.A., 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biol. Control* 65, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.010>

Buck, J.W., 2002. *In vitro* antagonism of *Botrytis cinerea* by phylloplane yeasts . *Can. J. Bot.* 80, 885–891. <https://doi.org/10.1139/b02-078>

Cavalcanti, L. S., Coelho, R. S. B. , Perez, J.O., 2002. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* F. SP. *phaseoli* USE v.32, 1–5.

Collazo, C., Abadias, M., Aguiló-Aguayo, I., Alegre, I., Chenoll, E., Viñas, I., 2017. Studies

on the biocontrol mechanisms of *Pseudomonas graminis* strain CPA-7 against food-borne pathogens *in vitro* and on fresh-cut melon. *LWT - Food Sci. Technol.* 85, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.029>

El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47, 25–35. <https://doi.org/10.1007/s10267-005-0268-2>

Enyiukwu, D., Amadioha, A., Ononuju, C., 2019. Nutritional Significance of Cowpea Leaves for Human Consumption. *Greener Trends Food Sci. Nutr.* 1, 1–10. <https://doi.org/10.15580/gtfsn.2018.1.061818085>

FAOStat (2017) Food and Agriculture Organization (FAO), World Production. Available at: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (acessado 15 de julho 2019)

Gordon, T.R., 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 23–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>

Hernández Montiel, L.G., Rivas García, T., Romero Bastidas, M., Chiquito Contreras, C.J., Ruiz Espinoza, F.H., Chiquito Contreras, R.G., 2018. Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas.* <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1000>

Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. *The yeasts, a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2011. v.2, 1062p.

Martins, C., Silva, M., Fonseca, J., Raphael, S.I., Pimenta, S., 2019. Isolation of epiphytic yeasts from *Eugenia dysenterica* DC . fruits and evaluation of their antimicrobial activity against phytopathogenic fungi Isolamento de leveduras epifíticas de frutos de *Eugenia dysenterica* DC . e avaliação de atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos 090, 223–231.

McKinney HH (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agri. Res.*, 26:pp 195-217

Nascimento, S. R. C.; Kurozawa, C.; maringoni, A. C. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.20, n.2, p. 214-217, 1995.

Negri, C.E., Gonçalves, S.S., Xafranski, H., Bergamasco, M.D., Aquino, V.R., Castro ,P.T.O., Colombo, A.L., 2014. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and *in vitro* susceptibility to triazoles. Journal of Clinical Microbiology 52:3633–3640

Noronha, M. A. ; Lopes, C. L. R. B. P. ; Oliveira, B. M. M. ; Michereff, S. J. ; Ventura, H. P. ; Torre, R. J. A. ; Silva, K. J. D. E., 2013. Reação de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* E *Sclerotium rolfsii*. Congresso Nacional De Feijão-Caupi 3, 3–7.

Okungbowa, F.I., Shittu, H., 2012. Fusarium Wilts : An Overview. Enviromental Res. J. 6(2), 83–102.

Oyekan, P.O., 1975. Ocurrence of cowpea wilt caused by *Fusarium oxyspomm* f.sp. *tracheiphilum* in Nigeria. Plant Disease Reporter 59, p.488490.

Pal, K. K. and B. McSpadden Gardener, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>

Pasquali, M., Marena, L., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2004. Vegetative Compatibility Grouping of the Fusarium Wilt Pathogen of Paris Daisy (*Argyranthemum frutescens* L.) 259, 257–259.

Pottorff, M., Wanamaker, S., Ma, Y.Q., Ehlers, J.D., Roberts, P.A., Close, T.J., 2012. Genetic and physical mapping of candidate genes for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* race 3 in cowpea [*vigna unguiculata* (L.) walp]. PLoS One 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041600>

Pottorff, M.O., Li, G., Roberts, P.A., 2014. Genetic mapping , synteny , and physical location of two loci for *Fusarium oxysporum* f . sp . *tracheiphilum* race 4 resistance in cowpea [*Vigna unguiculata* (L .) Walp] 779–791. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9991-0>

Pretscher, J., Fischkal, T., Branscheidt, S., Jäger, L., Kahl, S., Schlander, M., Thines, E., Claus, H., 2018. Yeasts from Different Habitats and Their Potential as Biocontrol Agents. *Fermentation* 4, 31. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020031>

Rodrigues, A.A.C., Bezerra Neto, E., Coelho, R.S.B., 2007. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatol. Bras.* 31, 492–499. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582006000500009>

Shaw, R.K., Shaik, M., Mir, Z.A., Prasad, M.S.L., Prasad, R.D., Senthilvel, S., 2016. Establishing a high throughput screening method for large scale phenotyping of castor genotypes for resistance to *Fusarium* wilt disease. *Phytoparasitica* 44, 539–548. <https://doi.org/10.1007/s12600-016-0535-0>

Silva, W.C. da, Assunção, I.P., Lima, G.S. de A., Monteiro, J.H.A., Feijó, F.M., Ferreira, J.T.P., 2011. 11597 - Sucessões culturais na produção de feijão-caupi e sobre atributos químicos do solo infestado com. VII Congr. Bras. Agroecol. 6, 1–5.

Spadaro, D., Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

Tenório, D.A. De, Medeiros, E.V. De, Lima, C.S., Silva, J.M., Barros, J.A. De, Neves, R.P., Laranjeira, D., 2019. Biological control of *Rhizoctonia solani* in cowpea plants using yeast 113–119.

Tournas, V., Katsoudas, E., 2019. Effect of CaCl₂ and Various Wild Yeasts From Plant Origin on Controlling *Penicillium expansum* Postharvest Decays in Golden Delicious Apples. *Microbiol. Insights* 12, 117863611983764. <https://doi.org/10.1177/1178636119837643>

Wang, X., Li, G., Jiang, D., Huang, H.C., 2009. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. *Biol. Control* 50, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.009>

White, T. J. Et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press, . p.315–322.

Yasmin, L., Ali, M., Khan, F., 2018. Integrated management of *Fusarium* wilt of gladiolus, Bangladesh Journal of Agricultural Research. <https://doi.org/10.3329/bjar.v43i1.36155>

7. Tabelas e Figuras

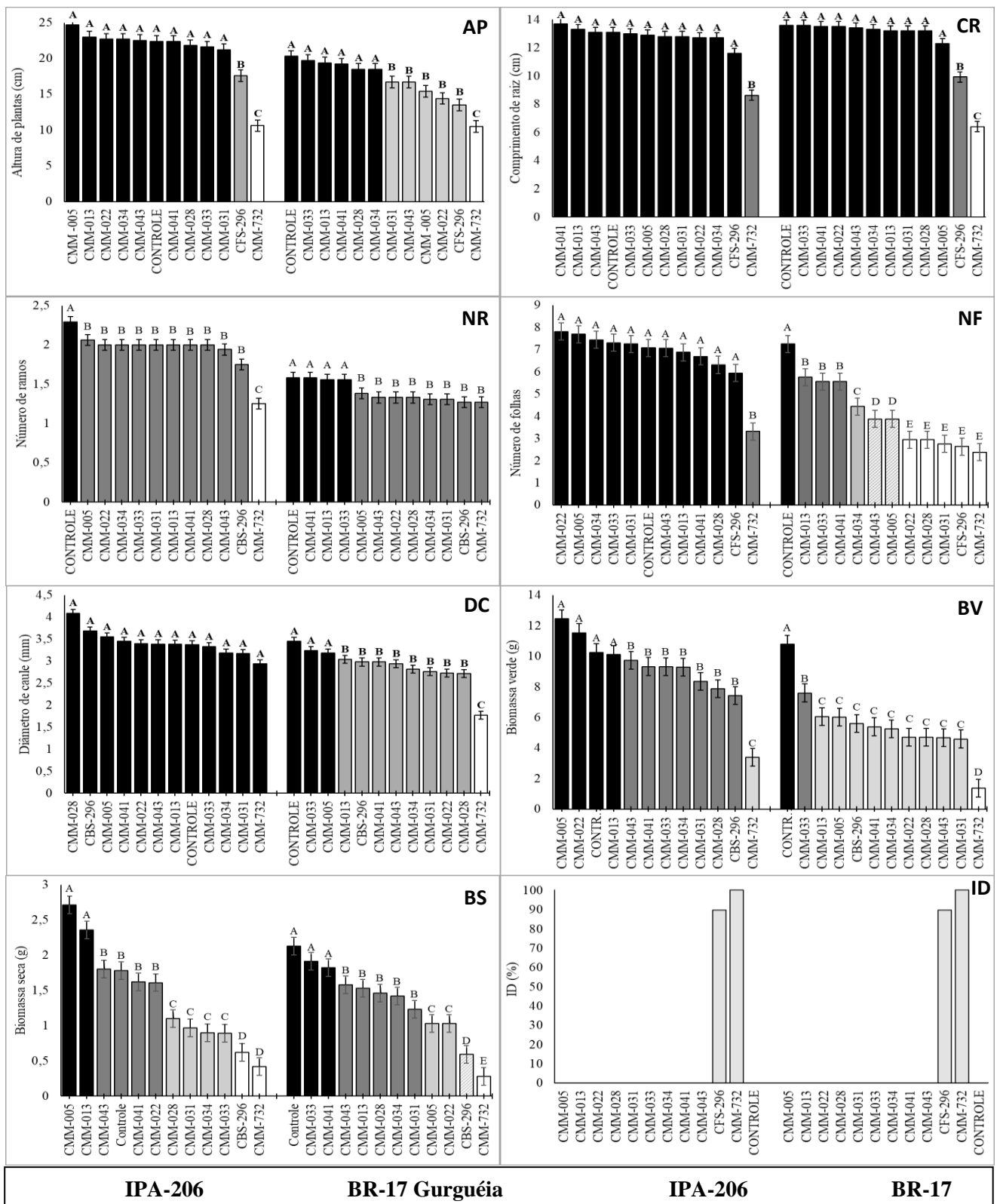


Figura 2. Efeitos da ação fitopatogênica de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* sobre parâmetros morfológicos de plantas dos de BR-17 Gurguéia e IPA-206, 30 dias após germinação: altura de planta (AP); comprimento da raiz (CR); número de ramos (NR); número de folhas (NF); Biomassa verde (BV) ; biomassa seca (BS) ; diâmetro de caule (DC); índice da doença (ID).

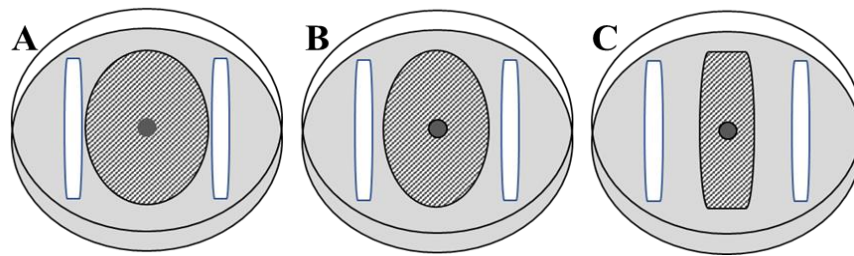


Figura 1. Ilustração da classificação das cepas de leveduras em relação a formação do halo de inibição sobre o crescimento micelial do isolados CMM-732 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, classificando-as em: (A) “+” halo pouco expressivo; (B) “++” halo medianamente expressivo e (C) “+++” halo muito expressivo.

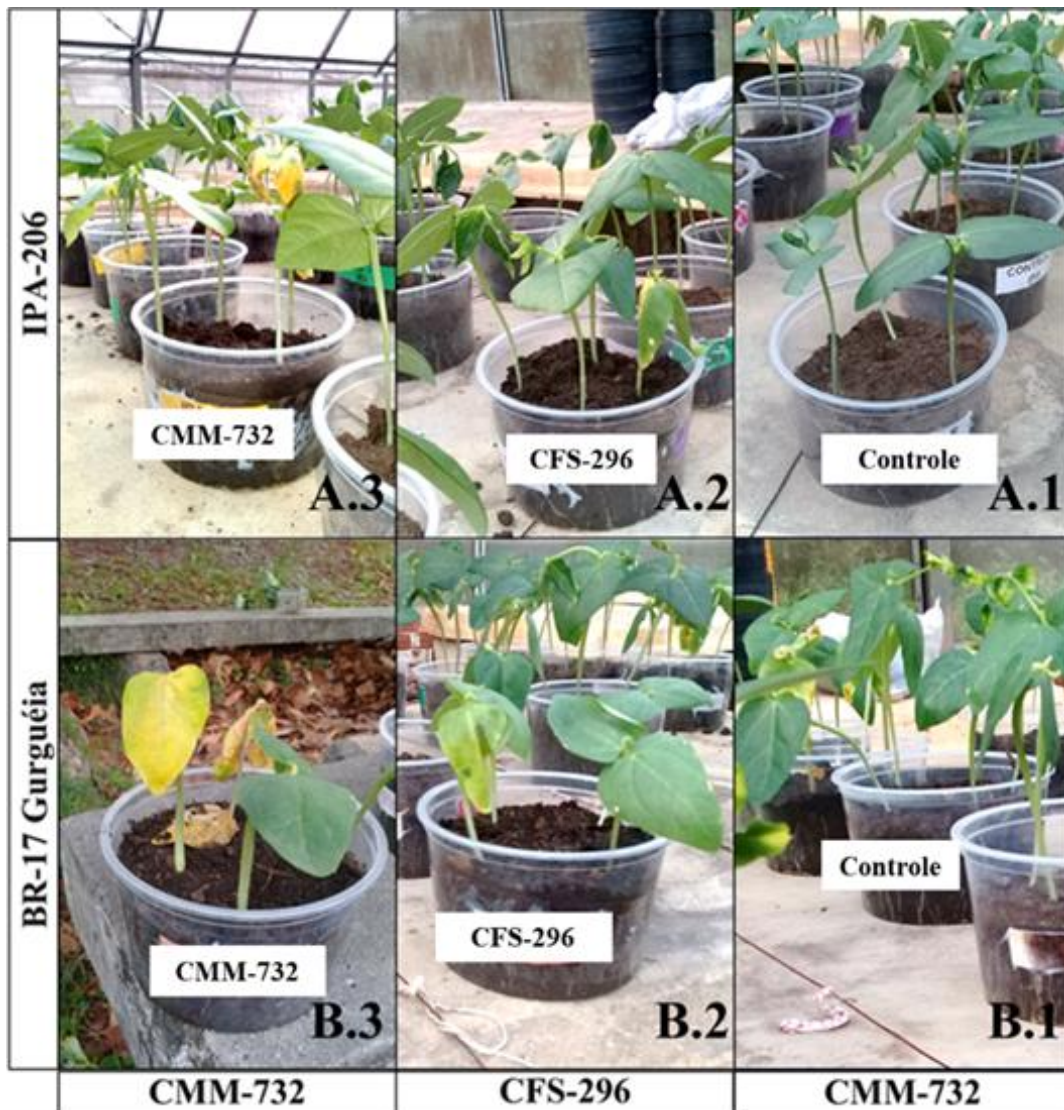


Figura 3. Sintomas de murcha, redução do crescimento e amarelecimento de plantas da cv. BR-17 Gurguéia e IPA-205 provocados por CFS-296 (A.1 e B.2) e CMM-732(A.3 e B.3), em comparação com os seus respectivos tratamentos controles (A.1 e B.1).

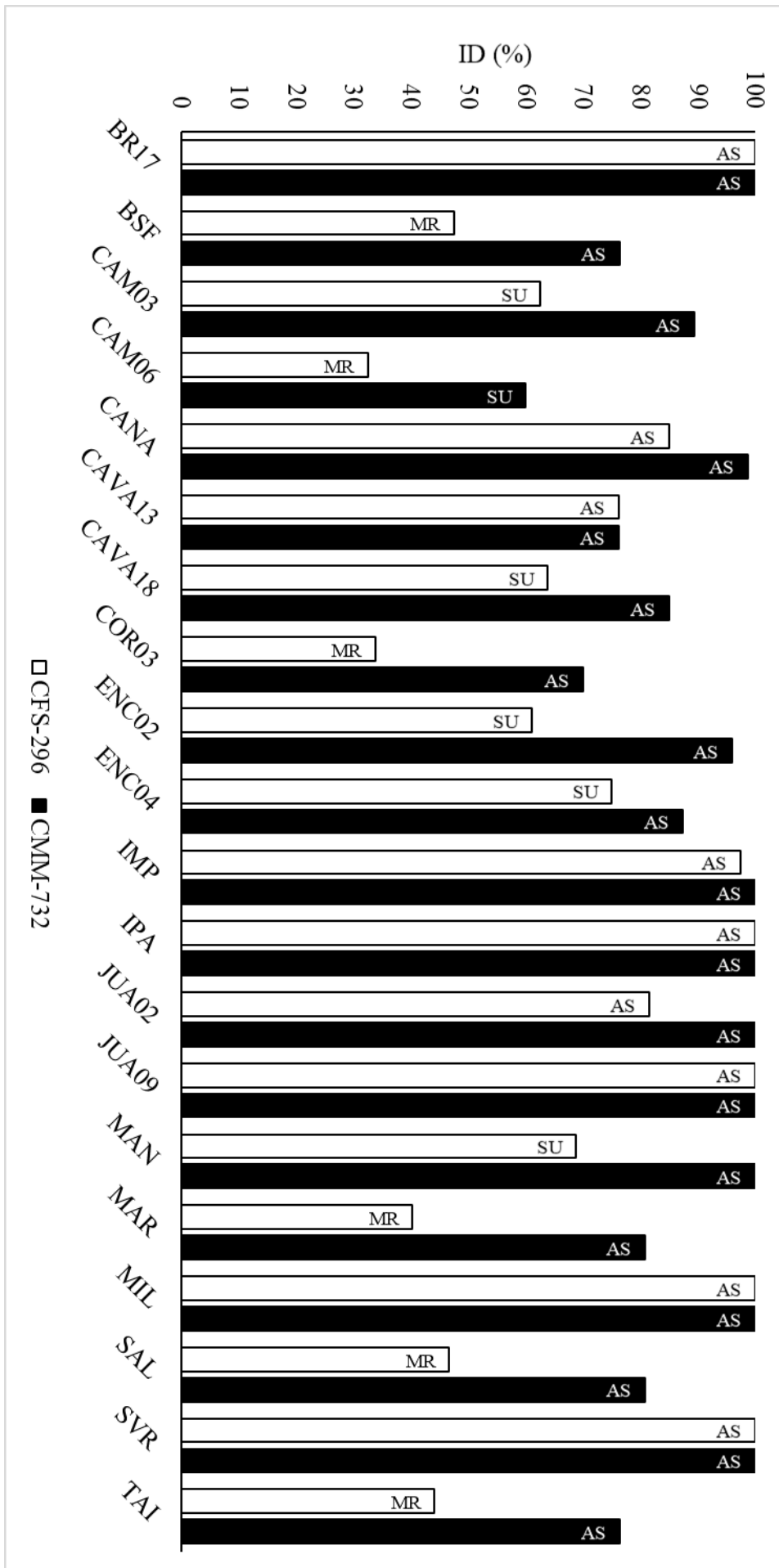


Figura 4. Índice da doença (ID) em relação as classificações das reações dos genótipos a CFS-296 (■) e CMM-732(□), de acordo com as médias das notas de severidade: 0 = semelhante à imune (SI); 0,1-1,0 = altamente resistente (AR); 1,1-2,0 = medianamente resistente (MR); 2,1-3,0 = suscetível (SU); 3,1-4,0 = altamente suscetível (AS).

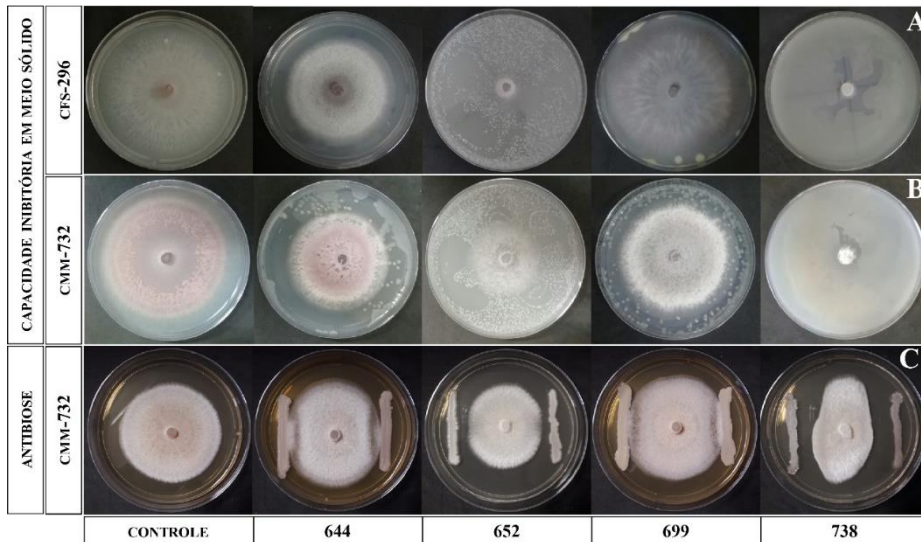


Figura 5. Capacidade Inibitório crescimento micelial do isolado CFS-296(A) e CFS-732(B), e antibiose do isolado CMM-732(C) por CFS-644, CFS-652, CFS-699 e CFS-738 em meio sólido.

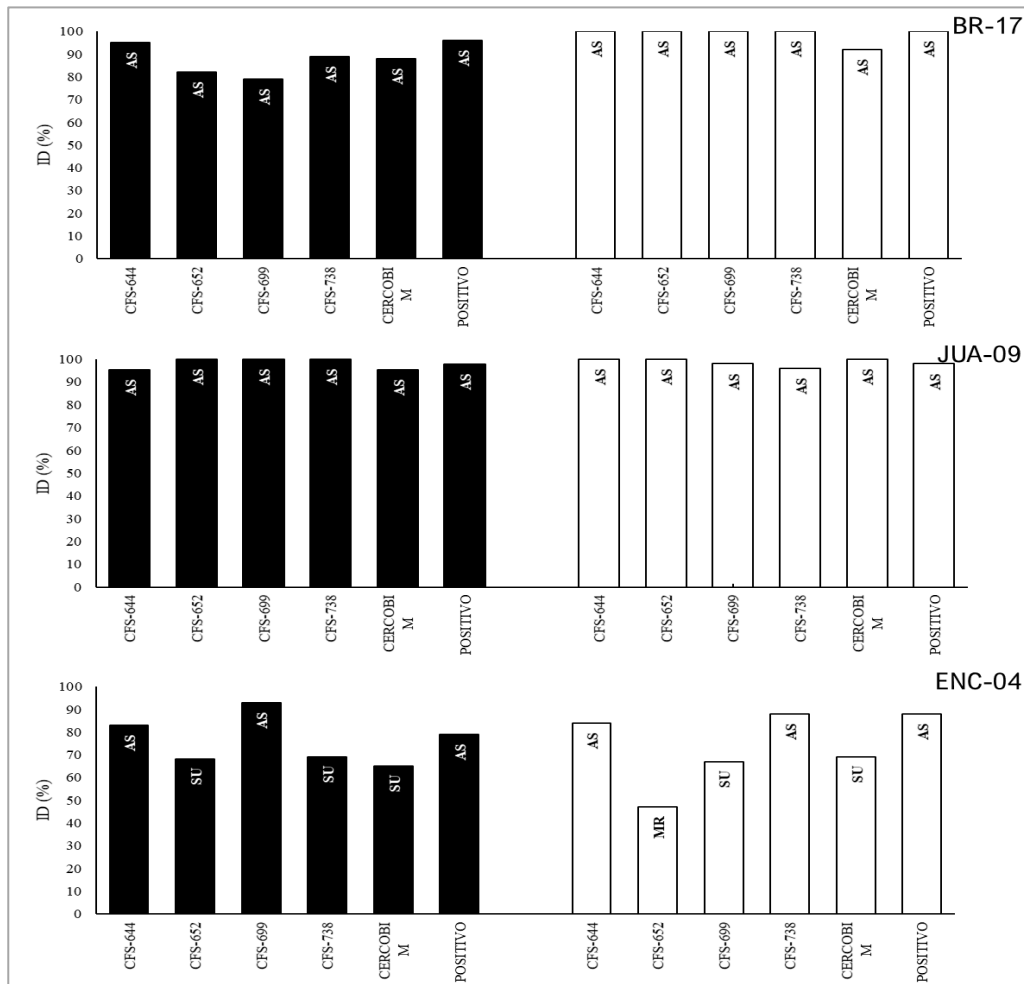


Figura 6. índice da doença dos genótipos Encruzilhada 04 (ENC-04), Juazeiro 09 (JUA-09) e cv. BR-17 gurguéia tratados com as leveduras CFS-644, CFS-652, CFS-699 e CFS-738 e o CERCObin 700 WP, em relação a CFS-296 (■) e CMM-732(□).

Tabela 1. Efeitos da ação da doença dos isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* sobre parâmetros morfológicos de plantas dos de BR-17 Gurguéia e IPA-206, 30 dias após germinação: altura de planta (ALT); comprimento da raiz (CR); número de ramos (NR); número de folhas (NF) ; diâmetro de caule (DC), Biomassa verde (BV) ; biomassa seca (BS).

GENÓTIPO	Tratamentos	ALT (cm)	CR (cm)	NR (n°)	NF (n°)	DC (mm)	BV (g)	BS (g)
BR17	Controle	22,63 a	15,78 a	1,81 a	7,31 a	2,62 a	3,66 a	0,77 a
	CFS-296	17,55 b	10,88 b	1,05 b	3,65 b	1,87 b	1,58 b	0,29 b
	CMM-732	16,05 b	4,65 c	1 c	2 b	0,46 c	0,14 c	0,1 c
	MÉDIA	18,46	10,05	1,25	4	1,58	1,66	0,36
	CV(%)	13,76	14,97	5,38	14,06	12,75	13,2	6,81
BSF	Controle	18,73 a	18,8 a	1,55 a	6,65 a	3,09 a	3,93 a	0,98 a
	CFS-296	17,53 a	18 b	1,68 b	6,79 a	2,96 a	3,7 a	1,09 a
	CMM-732	14,53 b	12,01 c	1,59 c	5,88 a	2,77 a	2,4 b	1,02 a
	MÉDIA	15,63	16,05	1,6	6,46	2,95	3,39	1,02
	CV(%)	17,04	16	9,86	15,37	14,15	18,56	14,11
CAM03	Controle	18,05 a	18,38 a	1,55 a	6,65 a	2,68 a	4,41 a	1,36 a
	CFS-296	16,08 b	16,53 a	1,3 a	5,6 b	2 b	2,99 b	1,24 a
	CMM-732	15,11 b	17,68 a	1,21 a	4,68 a	2,15 b	2,72 b	0,7 b
	MÉDIA	16,43	17,52	1,36	5,66	2,27	3,39	1,11
	CV(%)	15,95	11,52	9,76	15,05	10,66	16,55	13,76
CAM06	Controle	17,99 a	20,7 a	1,26 b	5,79 b	4,35 a	6,47 a	2 a
	CFS-296	15,75 b	20,6 a	1 c	5 c	3,22 b	5,46 b	1,56 b
	CMM-732	15,95 b	19,71 a	1,74 a	7,05 a	3,73 c	4,87 c	0,7 c
	MÉDIA	16,55	20,34	1,33	5,93	3,76	5,6	1,42
	CV(%)	10,68	10,24	7,66	9,36	7,87	12,68	11,94
CANA	Controle	16,4 a	13,55 a	1,6 a	6,45 a	2,83 a	3,66 a	0,61 a
	CFS-296	15,05 b	11,35 b	1,15 b	4,55 b	2,22 b	2,3 b	0,61 a
	CMM-732	14,05 b	5,15 c	1 c	1,35 b	0,53 c	0,61 c	0,12 b
	MÉDIA	15,17	10,02	1,25	4,12	1,86	2,19	0,45
	CV(%)	17,75	12,04	7,64	18,02	14,97	16,21	14,6
CAVA13	Controle	18,16 a	17,37 a	1,21 a	5,47 a	2,55 a	3,45 a	1,55 a
	CFS-296	15,66 b	15,74 a	1 a	4,42 a	1,96 b	2,44 b	0,75 b
	CMM-732	16,26 b	15,71 a	1,21 a	4,79 a	2,27 a	2,67 b	0,63 b
	MÉDIA	16,69	16,27	1,14	4,89	2,26	2,85	0,98
	CV(%)	15,98	11,43	7,45	14,45	7,95	11,18	8,51
CAVA18	Controle	16,78 a	19,3 a	1,25 a	5,75 a	4,05 a	4,38 a	1,1 a
	CFS-296	15,03 b	17,35 a	1,25 a	5,15 a	3,34 b	3,55 a	1,08 a
	CMM-732	13,85 b	17,43 a	1,4 a	5,15 a	2,85 b	2,72 b	0,6 b
	MÉDIA	15,27	18,03	1,3	5,35	3,41	3,55	0,93
	CV(%)	16,56	16,45	10,37	16,77	11,51	16,49	12,73
COR03	Controle	19,7 a	19,85 a	2 a	8 a	3,83 a	4,35 a	2,29 a
	CFS-296	18,19 a	18,6 a	2 a	8 a	3,59 a	4,09 a	1,36 b
	CMM-732	14,15 b	17 b	1,88 b	7,29 b	2,81 b	2,82 a	0,9 c
	MÉDIA	17,51	18,56	1,96	7,79	3,44	3,8	1,55
	CV(%)	14,05	5,41	5,69	4,42	6,22	9,68	10,18
ENC02	Controle	17,03 a	17,55 a	1,42 a	5,63 a	3,62 a	3,14 a	0,67 a
	CFS-296	15,75 a	16,14 a	1,61 a	6,33 a	3,31 a	3,21 a	0,44 a
	CMM-732	14,05 b	13,26 b	1,11 b	3,74 b	2,5 b	1,77 b	0,9 b
	MÉDIA	15,61	15,64	1,38	5,21	3,14	2,7	0,68
	CV(%)	20,71	17,8	9,31	16,89	14,56	17,8	10,25
ENC04	Controle	16,83 a	16,43 a	1,8 a	7,2 a	3,63 a	3,39 a	0,72 a
	CFS-296	14,15 b	11,53 b	1,41 b	4,18 b	2,03 b	1,9 b	0,48 b
	CMM-732	11,39 c	9,31 b	1,28 b	3,89 b	1,61 b	1,25 b	0,32 b
	MÉDIA	13,96	12,2	1,48	4,98	2,36	2,11	0,49
	CV(%)	17,96	20,31	9,42	22,88	22,69	21,81	10,07

Continua...

Tabela 1. Continuação.

GENÓTIPO	Tratamentos	ALT (cm)	CR (cm)	NR (n°)	NF (n°)	DC (mm)	BV (g)	BS (g)
IMP	Controle	16,11 a	17,58 a	1,89 a	7,68 a	4,22 a	5,01 a	2,42 a
	CFS-296	10,87 b	12,87 b	1,16 b	4,37 b	3,15 b	2,38 b	0,26 b
	CMM-732	10,92 b	6,56 c	1 c	2,17 b	0,86 c	0,39 c	0,56 b
	MÉDIA	12,66	12,44	1,36	4,79	2,78	2,64	1,09
	CV(%)	19,91	14,1	5,94	13,06	11,71	15,37	18,14
IPA	Controle	19,57 a	17,68 a	1,36 a	5,64 a	3,32 a	3,38 a	0,73 a
	CFS-296	16,9 b	10,23 b	1 b	2,3 b	1,51 b	1,33 b	0,29 b
	CMM-732	16,44 b	6,31 c	1 c	2,17 b	0,4 c	0,69 c	0,17 c
	MÉDIA	17,46	10,88	1,1	3,15	1,61	1,66	0,37
	CV(%)	15,77	12,8	5,63	14,04	18,56	13,37	4,84
JUA02	Controle	19,74 a	20,09 a	2 a	8 a	4,14 a	6,14 a	1,36 a
	CFS-296	17,82 b	13,21 b	1,32 b	4,42 b	2,27 b	2,51 b	0,55 b
	CMM-732	15,53 c	6,97 c	1,06 c	2,24 c	1,18 c	0,76 c	0,24 c
	MÉDIA	17,7	13,42	1,45	4,87	2,52	3,11	0,71
	CV(%)	13,79	14,38	6,48	16,34	16,16	20,42	11,2
JUA09	Controle	21,16 a	20,16 a	1,63 a	6,89 a	2,45 a	4,67 a	1,35 a
	CFS-296	15,39 b	7,06 b	1 b	2 b	1,07 a	0,52 b	0,17 b
	CMM-732	15,82 b	6,82 b	1 b	2 b	0,91 b	0,38 b	0,14 b
	MÉDIA	17,56	11,59	1,22	3,72	1,5	1,94	0,58
	CV(%)	18,04	13,62	6,3	7,69	10,49	13,24	9,9
MAN	Controle	16,97 a	18,41 a	2 a	7,82 a	3,34 a	3,82 a	1,14 a
	CFS-296	13,75 b	18,4 a	2,1 a	8,3 a	3,14 a	4,37 a	1 a
	CMM-732	10,13 c	8,7 b	1,1 b	2,6 b	1,03 b	0,85 b	0,18 b
	MÉDIA	13,44	15	1,72	6,16	2,46	2,97	0,75
	CV(%)	12,89	11,71	5,79	9,72	11,14	14,07	9,42
MAR	Controle	19,15 a	20,45 a	2 a	8 a	3,83 a	6,04 a	0,84 a
	CFS-296	15,5 b	15,58 b	1,78 a	7 a	3,37 b	3,76 b	0,5 b
	CMM-732	14,38 b	14,62 b	1,47 b	6,06 b	2,89 c	3,37 b	0,45 b
	MÉDIA	16,48	17,05	1,76	7,07	3,39	4,47	0,61
	CV(%)	17,65	10,01	7,21	10	6,17	13,29	7,91
MIL	Controle	18,24 a	18,59 a	1,82 a	7,47 a	3,02 a	5,72 a	1,25 a
	CFS-296	13,45 b	6,95 b	1 b	2 b	1,4 b	0,69 b	0,22 a
	CMM-732	14,74 b	6,05 b	1 b	2 b	1,25 b	0,48 b	0,18 b
	MÉDIA	15,34	10,18	1,25	3,66	1,84	2,15	0,52
	CV(%)	16,94	14,24	4,59	5,69	10,97	12,6	7,34
SAL	Controle	20,42 a	21,56 a	1,83 a	7,5 a	2,53 a	4,66 a	1,49 a
	CFS-296	17,83 b	17,6 b	1,47 b	6,2 b	2,2 a	3,74 a	1,17 a
	CMM-732	16,18 b	12,88 c	1,53 b	5,71 b	2,2 a	2,73 b	0,72 b
	MÉDIA	18,2	17,42	1,62	6,5	2,32	3,73	1,13
	CV(%)	15,28	13,08	9,31	15,19	12,26	16,35	13,32
SVR	Controle	20,68 a	19,12 a	1,41 a	6,24 a	3,24 a	4,78 a	1,53 a
	CFS-296	13,97 b	15,63 a	1,11 a	4,37 b	2,22 b	2,25 b	0,47 b
	CMM-732	13,96 b	9,76 b	1 b	2,18 b	1,02 c	0,74 c	0,23 c
	MÉDIA	16,12	14,87	1,17	4,26	2,16	2,58	0,73
	CV(%)	18,46	22,74	7,44	13,92	14,76	17,7	7,31
TAI	Controle	23,05 a	19,32 a	2 a	8 a	3,69 a	5,39 a	1,02 a
	CFS-296	18,71 b	16,59 b	1,88 a	7,47 a	3,73 a	4,46 a	1,26 a
	CMM-732	17,03 b	14,11 b	1,56 b	5,67 b	2,67 b	3,1 b	0,64 b
	MÉDIA	19,67	16,722	1,8148	7,06	3,36	4,33	0,97
	CV(%)	21,12	13,99	6,63	13,9	14,36	21,68	13,2

Valores médios de comprimento de raiz (CR), número de ramos (NR), número de folhas (NF), diâmetro do caule (DC), biomassa verde (BV) e biomassa seca (BS) foram transformado pela fórmula $(x+1)^2$ melhor análise de variância; Letras iguais na coluna de cada genótipo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade;

Tabela 2. Resultados da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e antibiose das 76 cepas de leveduras isoladas do filoplano de partes das plantas sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*.

Isolado	PIC ^z	Antibiose	Isolado	PIC ^z	Antibiose	Isolado	PIC ^z	Antibiose
CFS 631	100,0± ⁰	A -	CFS 644	57,07± ^{13,6}	D -	CFS 641	17,70± ^{3,82}	G -
CFS 677	100,0± ⁰	A +++	CFS 670	58,06± ^{8,75}	D -	CFS 646	20,44± ^{0,52}	G -
CFS 701	100,0± ^{8,59}	A +++	CFS 705	54,29± ^{3,67}	D -	CFS 656	19,04± ^{3,44}	G +
CFS 730	100,0± ⁰	A -	CFS 714	51,15± ^{3,70}	D -	CFS 664	21,13± ^{1,42}	G -
CFS 642	79,98± ^{2,08}	B ++	CFS 623	47,00± ^{3,85}	E -	CFS 665	13,17± ^{13,63}	G -
CFS 650	77,66± ^{3,80}	B +++	CFS 624	43,83± ^{5,29}	E -	CFS 666	23,31± ^{2,60}	G -
CFS 671	76,48± ^{5,10}	B +	CFS 626	42,50± ^{3,59}	E -	CFS 674	18,54± ^{12,78}	G -
CFS 676	80,60± ^{9,85}	B ++	CFS 647	45,51± ^{3,31}	E ++	CFS 693	15,11± ^{2,38}	G ++
CFS 699	81,46± ^{1,04}	B -	CFS 654	45,69± ^{5,97}	E +	CFS 694	20,24± ^{3,31}	G -
CFS 700	80,04± ^{1,70}	B -	CFS 685	40,68± ^{7,16}	E ++	CFS 704	24,66± ^{1,41}	G -
CFS 729	85,32± ^{14,6}	B -	CFS 690	44,70± ^{4,49}	E +	CFS 709	17,47± ^{2,40}	G -
CFS 738	83,08± ^{1,31}	B +++	CFS 706	40,24± ^{2,62}	E -	CFS 712	22,75± ^{1,04}	G -
CFS 619	70,56± ^{10,1}	C -	CFS 708	42,42± ^{1,93}	E +	CFS 716	26,75± ^{2,96}	G +
CFS 622	71,48± ^{14,1}	C -	CFS 627	35,58± ^{16,50}	F -	CFS 718	22,11± ^{0,58}	G -
CFS 635	65,21± ^{4,39}	C ++	CFS 640	33,24± ^{2,10}	F ++	CFS 720	18,81± ^{2,10}	G -
CFS 652	70,45± ^{14,8}	C +	CFS 651	34,23± ^{3,12}	F ++	CFS 722	12,48± ^{6,24}	G -
CFS 675	70,63± ^{10,1}	C ++	CFS 678	35,51± ^{3,12}	F +++	CFS 727	16,12± ^{2,28}	G ++
CFS 710	72,29± ^{0,31}	C -	CFS 683	32,94± ^{3,56}	F -	CFS 734	20,02± ^{2,82}	G -
CFS 719	64,63± ^{1,96}	C -	CFS 689	33,41± ^{1,74}	F ++	CFS 735	17,68± ^{4,38}	G +
CFS 723	61,57± ^{4,11}	C -	CFS 697	30,69± ^{2,07}	F -	CFS 628	0,0± ^{0,0}	H -
CFS 731	62,93± ^{5,21}	C -	CFS 711	37,18± ^{12,95}	F -	CFS 687	0,0± ^{0,0}	H +
CFS 732	61,48± ^{10,1}	C -	CFS 713	28,96± ^{4,18}	F -	CFS 695	6,52± ^{6,52}	H -
CFS 736	65,22± ^{0,99}	C -	CFS 629	26,91± ^{7,02}	G +	CFS 725	0,0± ^{0,0}	H -
CFS 637	50,44± ^{2,83}	D -	CFS 630	17,43± ^{2,68}	G -	Controle 1	0,0± ^{0,0}	H
CFS 639	51,87± ^{5,32}	D -	CFS 633	19,99± ^{3,90}	G -	Média Geral	44,84%	
CFS 643	58,65± ^{2,11}	D +++	CFS 638	23,75± ^{7,78}	G -	CV (%)	18,72	

y: Valores médios PIC ± valores Desvio Médio; o PIC foi calculado com a equação: $((C_c - C_t) / C_c) \times 100$, sendo C_c : crescimento do controle, C_t : crescimento do tratamento. z: valores médios de PIC, seguidos da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade;

Tabela 3. Resultado de porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados selecionados na patogenicidade exercida pelas 34 cepas de leveduras previamente selecionadas em relação a capacidade de inibição ao isolados 732.

Isolados	PIC ^z		Isolados	PIC ^z	
	CMM-732	CFS-296		CMM-732	CFS-296
CFS 619	17,72 ^{±4,0} E	0,0 ^{±0,0} E	CFS 700	26,73 ^{±8,03} E	0,0 ^{±0,0} E
CFS 622	23,62 ^{±6,84} E	6,19 ^{±7,43} E	CFS 701	78,60 ^{±5,79} B	38,13 ^{±2,16} C
CFS 631	20,50 ^{±2,64} E	3,78 ^{±6,05} E	CFS 705	26,45 ^{±1,28} E	23,17 ^{±4,60} D
CFS 635	63,82 ^{±3,13} C	43,75 ^{±8,11} C	CFS 710	60,16 ^{±22,83} C	20,28 ^{±26,82} D
CFS 637	18,74 ^{±4,93} E	0,0 ^{±0,0} E	CFS 714	33,18 ^{±2,01} D	66,07 ^{±3,71} B
CFS 639	19,24 ^{±5,73} E	15,22 ^{±2,78} E	CFS 719	39,06 ^{±10,19} D	20,84 ^{±11,65} D
CFS 642	25,56 ^{±2,93} E	38,33 ^{±7,02} C	CFS 723	29,51 ^{±3,69} D	35,61 ^{±3,92} C
CFS 643	86,15 ^{±1,76} B	73,01 ^{±10,47} B	CFS 729	20,48 ^{±2,03} E	21,59 ^{±2,52} D
CFS 644	34,96 ^{±6,26} D	91,40 ^{±9,69} A	CFS 730	58,11 ^{±17,57} C	20,37 ^{±15,99} D
CFS 650	82,05 ^{±3,11} B	19,71 ^{±7,15} D	CFS 731	17,44 ^{±1,92} E	62,03 ^{±15,78} B
CFS 652	69,11 ^{±5,82} B	91,05 ^{±1,50} A	CFS 732	24,90 ^{±4,08} E	26,32 ^{±8,20} D
CFS 670	25,87 ^{±1,03} E	11,48 ^{±9,09} E	CFS 736	30,61 ^{±5,98} D	25,82 ^{±4,14} D
CFS 671	40,51 ^{±4,01} D	20,92 ^{±2,42} D	CFS 738	100 ^{±0,0} A	30,54 ^{±5,76} C
CFS 675	44,66 ^{±3,85} D	65,87 ^{±2,07} B	Controle	0,0 ^{±0,0} E	0,0 ^{±0,0} E
CFS 676	76,25 ^{±2,65} B	66,85 ^{±1,38} B			
CFS 677	86,42 ^{±0,57} B	68,38 ^{±4,12} B	CV (%)	23,45	28,55
CFS 699	36,28 ^{±25,48} D	100 ^{±0,0} A	Média Geral	44,06	40,38

y: Valores médios PIC \pm valores Desvio Médio; o PIC foi calculado com a equação: $((C_c - C_t) / C_c) \times 100$, sendo C_c : crescimento do controle, C_t : crescimento do tratamento. z : valores médios de PIC, seguidos da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- O método de inoculação “dipping” ou imersão de raízes em suspensão de inóculo, permitiu uma rápida identificação patogênica dos isolados, como também a resistência dos genótipos estudados neste trabalho;
- As leveduras CFS-644, CFS-652, CFS-699 e CFS-738 apresentaram potencial de controle *in vitro* a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*; porém apenas o isolado CFS-652 teve uma maior ação bioprotetiva sobre a murcha-de-fusário;
- A utilização do genótipo Encruzilhada 04, considerado suscetível ao isolado mais agressivo (CMM-732), possibilitou observar a redução da severidade em relação aos tratamentos com as cepas antagonistas de leveduras;
- A maioria das leveduras apresentaram redução do crescimento micelial em relação as cepas de leveduras nos testes *in vitro*, nos quais variaram em relação aos isolados patogênicos, destacando CFS-699 para CFS-296 e CFS-738 para CMM-732 considerado mais agressivo;
- O uso de leveduras antagônicas integrado a utilização de resistência hospedeira a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, demonstrou ser uma estratégia de manejo no controle da murcha-de-fusário do caupi.