



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
COORDENAÇÃO GERAL DE CURSOS DE GRADUAÇÃO

IGOR ALEXSANDER DE MELO PIMENTEL

RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO
SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Prospecção de fungos leveduriformes potencialmente biocontroladores a murcha-de-fusário
em feijão-caupi

RECIFE-PE

2019



IGOR ALEXSANDER DE MELO PIMENTEL

RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO

SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO - ESO:

Prospectiva de fungos leveduriformes potencialmente biocontroladores a murcha-de-fusário
em feijão-caupi

Relatório apresentado junto à disciplina Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), do curso de Bacharelado em Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, relativo ao Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito para obtenção do título de bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

RECIFE-PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P644p Pimentel, Igor Alexsander de Melo
Prospectiva de fungos leveduriformes potencialmente biocontroladores a murcha-de-fusário em feijão-caupi:
Relatório do estágio curricular supervisionado obrigatório / Igor Alexsander de Melo Pimentel. - 2020.
43 f.
- Orientador: Delson Laranjeira.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
Agronomia, Recife, 2020.
1. prospecção. 2. fungos. 3. feijão. I. Laranjeira, Delson, orient. II. Título

CDD 630

**RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO
SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO – ESO:**

Prospectiva de fungos leveduriformes potencialmente biocontroladores a murcha-de-fusário
em feijão-caupi

Discente: Igor Alexander de Melo Pimentel

Curso: Agronomia

Matrícula: 107.739.464-03

Tipo de Estágio: Estágio Supervisionado Obrigatório

Área: Fitopatologia

Local: Laboratório de Fungos do Solo

Início: 02/08/2018

Término: 26/06/2019

Jornadas de Trabalho: 20:00 horas semanais

Total de horas: 1.044 horas

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

Supervisora: Dra. Iwanne Lima Coelho

Estamos cientes do conteúdo do presente relatório, motivo pelo qual assinamos abaixo.

Igor Alexander de Melo Pimentel
Estagiário

Prof. Dr. Delson Laranjeira
Orientador

Dra. Iwanne Lima Coelho
Supervisora

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
COORDENAÇÃO GERAL DE CURSOS DE GRADUAÇÃO

ESTAGIÁRIO NÍVEL SUPERIOR – AGRONOMIA

AVALIAÇÃO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

NOTA:

Discente: Igor Alessander de Melo Pimentel
Graduando em Agronomia
(Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE)

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira
(Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE)

Coordenador do curso de Agronomia: Prof. Dr. Antônio Francisco de Mendonça Júnior
(Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder forças e discernimento diante das dificuldades encontradas

Aos meus pais, Emília Rejane e João Ferreira, por não se contentarem e revestiram minha existência de dignidade, dedicação e amor incondicional.

As minhas avós Josefa Jovita e Josinete, por todo amor, conselhos e apoio nas minhas decisões

Ao meu padrasto Levy Gomes, por todo carinho, cuidado e exemplo que tem me passado.

Aos docentes, empenhados em transmitir conhecimento e por todo auxílio.

A meu orientador, Prof. Dr. Delson Laranjeira, pelo apoio, auxílio e compreensão na realização deste trabalho.

A minha supervisora Dra. Iwanne Lima Coelho, pela atenção, comprometimento em transmitir seus altos conhecimentos na área, apoio pessoal e profissional e pela amizade verdadeira.

Aos meus colegas de estágio do Laboratório de fungos do solo.

Ao meu grande amigo Gleydson Lira que sempre esteve me apoiando

Enfim, sou grato a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

RESUMO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] ou cowpea (Inglês), conhecido popularmente como feijão macáça, feijão-macáçar ou feijão-de-corda, é uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae. Durante o período colonial, no Brasil, foi introduzido no estado da Bahia, e disseminado pela região Nordeste. É considerado como uma cultura de subsistência, mas para os pequenos agricultores da região configura-se como uma grande fonte de renda, por apresentar uma alta adaptabilidade às adversidades edafoclimáticas. Apesar da vasta variabilidade genética e rusticidade, muitos fatores podem ocasionar perdas significativas na produção para o cultivo de feijão-caupi, como a doença murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Synder & Hasen. Atualmente, não existem fungicidas regulamentados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o controle da murcha-de-fusário em feijão-caupi, a melhor forma de evitar o desenvolvimento da doença é a utilização de cultivares resistentes ao patógeno, porém o número de cultivares com características de interesse comercial regional é restrito. O biocontrole da murcha-de-fusário em caupi é pouco estudado, mas pode representar uma solução eficaz, aplicável, e ambientalmente sustentável. Então o presente trabalho objetivou selecionar leveduras, a partir de caule, folha, raiz e vagem de feijão-caupi, com potencial para o controle biológico de *Fusarium oxysporum* fs. sp. *tracheiphilum* em feijão-caupi. Cinco isolados de *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* foram testados quando a sua patogenicidade nas cultivares BR-17 Gurgueia e IPA-206, selecionando-se dois deles, de acordo com a patogenicidade e virulência. No total foram obtidos 91 isolados de leveduras que foram purificados e preservados para serem caracterizados quanto seu potencial biocontrolador sobre os dois fitopatogênicos selecionados. Os primeiros estudos foram realizados *in vitro* com avaliação de compostos metabólicos difundidos em meio e a ação antibiótica. Com relação ao primeiro ensaio de ações antimicrobianas e difusão de compostos, as porcentagens de inibição do crescimento micelial (PIC) e valores do índice de velocidade de crescimento (IVCM), quando comparados com o tratamento controle, evidenciaram que, dos 91 isolados testados sobre o isolado CMM-732, 40 foram potencialmente antagônicos, com desempenho significativo e, portanto, escolhidos para repetição experimental com os isolados CMM-732 e CFS-296. Nos experimentos de expressão antibiótica os resultados observados também foram positivos em relação ao patógeno CMM-

732, dos 91 isolados leveduriformes testados, 30 apresentaram padrões satisfatórios e, considerando-se os resultados conjuntos dos experimentos de inibição por difusão de metabólitos e antibiose, foram selecionadas sete leveduras, que deverão ser utilizadas nos próximos procedimentos experimentais. As cepas selecionadas foram submetidas a testes enzimáticos, fator *killer* e efeito bioprotetivo em sementes de caupi. Das cinco enzimas estudadas os isolados escolhidos foram capazes de produzir quatro delas, em meio sólido. Quanto ao fator *killer*, nenhum isolado foi capaz de expressar tal capacidade, nas condições estudadas. Quanto ao efeito bioprotetivo das leveduras selecionadas e aplicadas em sementes de feijão-caupi, observou-se que essas leveduras afetaram negativamente no desenvolvimento do *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, sem afetar negativamente a taxa de germinação das sementes. Após o término dos procedimentos para identificação molecular das leveduras selecionadas, as mesmas poderão ser aplicadas em experimentos futuros relacionados a bioprodução, formulação e aplicação *in vivo*, bem como sua eficiência na defesa da planta contra doenças causadas por diferentes fitopatógenos.

SUMÁRIO

1	ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO	10
2	INTRODUÇÃO	10
3	OBJETIVOS	13
3.1.	GERAL	13
4	METODOLOGIA	14
4.1.	OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS.....	14
4.2.	PREPARAÇÃO DE INÓCULO E AVALIAÇÃO FITOPATOGÊNICA DO ISOLADO DE <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tracheiphilum</i>	15
4.3.	DIFUSÃO DE COMPOSTOS INIBITÓRIOS EM MEIO.....	16
4.4.	AVALIAÇÃO AÇÃO DE ANTIBIOSE.....	18
4.5.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	18
4.6.	AVALIAÇÃO DE TOXINAS <i>killer</i>	19
4.7.	EFEITO BIOPROTETIVO DE LEVEDURAS SOBRE SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI	20
4.8.	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1.	OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS.....	21
5.2.	PATOGENICIDADE E SELEÇÃO <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tracheiphilum</i>	22
5.3.	AÇÃO DE COMPOSTOS METABÓLICOS E SELEÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS	25
5.4.	CARACTERIZAÇÃO ANTIBIÓTICA	29
5.5.	PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR LEVEDURAS	31
5.6.	CARACTERIZAÇÃO QUANTO AO FATOR <i>killer</i>	33
5.7.	AVALIAÇÃO QUANTO AO EFEITO BIOPROTETIVO EM SEMENTES.....	34

5.8.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS LEVEDURIFORMES.....	35
6	CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO.....	36
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
8	ATIVIDADES RELEVANTES DESENVOLVIDAS PELO ESTAGIÁRIO	40
9	DIFICULDADES ENCONTRADAS.....	43
10	PARECER DO ORIENTADOR.....	43

1 ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

O estágio supervisionado obrigatório (ESO) é uma disciplina curricular referente ao último semestre do Curso de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, composta pela realização de um Estágio Curricular e elaboração de um relatório de conclusão.

O ESO é um cumprimento da lei de diretrizes e bases da educação nacional (lei Federal n 9.394, de 20 de dezembro de 1996), faz parte do projeto pedagógico do curso. A disciplina de estágio supervisionado obrigatório figura como um importante elemento na formação acadêmica, visto que é um período em que o discente une seus conhecimentos teóricos e práticos na vida profissional.

2 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cowpea (Inglês), conhecido como feijão-macáça ou feijão-de-corda, é uma espécie botânica que pertence à família fabacea (FREIRE FILHO et al., 2011), cultivada pela primeira vez na África Ocidental. No Brasil o feijão-caupi foi introduzido no estado da Bahia, durante a época colonial, e distribuída pela região do semiárido nordestino.

O principal produtor de caupi é o continente africano, que detém cerca de 93,5% da produção, acompanhado pela Ásia, América do Sul e Europa (FAO, 2015). No mercado brasileiro, a produção de feijão é concentrada nas regiões Norte e Nordeste, com aproximadamente 80,6 e 1.409.300 ha de áreas plantadas, durante a safra 2016/17. (IBGE, 2016). A região nordeste é a principal produtora de caupi no país, proporcionando 385,1 mil toneladas, cerca de 54% da produção nacional (CONAB, 2018).

O Feijão-caupi por ser um vegetal rico em proteína (23% a 30%) e nutrientes essenciais, como vitamina do complexo B, é capaz de suprir parte das necessidades nutricionais animal e humana (BRITO, 2008) e representa grande importância para os países tropicais pouco desenvolvidos. O cultivo dessa leguminosa é feito basicamente por pequenos produtores rurais que utilizam de mão-de-obra familiar contribuindo para a permanência do homem no setor rural. Essa cultura apresenta algumas limitações, entre os quais destaca-se a falta de adoção de

tecnologia, principalmente referente aos insumos, onde o agricultor apela ao uso de sementes não selecionadas, contribuindo para o surgimento de doenças. (RODRIGUES & MENEZES, 2002).

A murcha-de-fusário é uma doença, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Synder & Hasen, e é considerada um dos maiores problemas fitossanitários, pois ocorre em grande frequência e agressividade sobre a cultura, acarretando perdas significativas e evasão em áreas infestadas pelo patógeno (ASSUNÇÃO et al., 2003).

O fungo *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* vive no solo por meio de estruturas de resistência do tipo clamidósporos e, na presença de um hospedeiro suscetível, desenvolve-se rapidamente sobre os tecidos tenros da planta, tornando-se patogênico. No processo de patogenicidade, o fungo libera enzimas que degradam o tecido vegetal, provocando perda do conteúdo celular, e entra através das raízes e coloniza os tecidos vasculares, causando murcha, clorose foliar e atrofiamento na planta (JUNIOR et al., 2010; SINGH, 1954; COELHO, 2001).

Em plântulas de caupi, os sintomas da murcha-de-fusário são caracterizados pelo aparecimento de folhas amareladas e flácidas, acompanhadas por rápida murcha e morte da planta. Na fase adulta são raquíticas, com folhas amarelas, que caem progressivamente, seguida por murcha gradual e necrose dos tecidos vasculares (SEETHAPATHY, 2017). A doença afeta diretamente na produção do feijoeiro, reduzindo em até 50% a população de plantas, como descrito na Nigéria em um campo naturalmente infestado (OYEKAN, 1977). No Brasil há relatos de 86% de perdas, em campos infestado artificialmente pelo patógeno (ASSUNÇÃO et al., 2003; ALLEN, 1983).

Para o controle da murcha-de-fusário em feijão caupi, atualmente, não existe fungicidas regulamentados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a melhor forma de impedir o ciclo da doença em locais de incidência dela é a utilização de cultivares resistentes, no entanto, o número de cultivares com atributos de interesse comercial regional é restrito (NORONHA et al., 2013).

Perante esse cenário controverso, dos prejuízos causados pelo patógeno e da necessidade de medidas imediatas, muitos produtores utilizam de forma desnorteada vários defensivos agrícolas, causando elevados índices de produção e sérios problemas de contaminação ambiental e risco a saúde humana, principalmente em relação a contaminação dos alimentos, água e solo.

Atualmente pesquisas relacionadas a controles alternativos são impulsionadas, com o objetivo de chegar a um manejo mais eficaz e econômico. Embora outros métodos alternativos de controle da doença, tais como o biológico, ainda não sejam amplamente estudados e empregados para o controle da murcha-de-fusário em feijão caupi, sabe-se que podem ser potencialmente aplicáveis, representando uma solução eficaz e sustentável.

O controle biológico é a utilização de microrganismos específicos, os quais interferem na ação e desenvolvimento de organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças em plantas, sendo um instrumento natural e sustentável para superar os problemas causados por produtos agroquímicos para proteção de plantas (CHET et al., 1997). Nesse contexto várias espécies de leveduras estão entre os principais agentes biocontroladores. Entre os gêneros estudados como potenciais biocontroladoras destacam-se *Candida Rhodotorula*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium* (BETTIOL et al., 2012).

Por surgirem como uma nova classe de agentes biocontroladores, as leveduras vêm sendo bastante estudadas, nos últimos anos (EL-GHAOUTH, 2002; HE et al., 2003; EL-TARABILY, 2006; MACHADO e BETTIOL, 2010). O ambiente mais propício para as leveduras é onde se desenvolve plantas, da microbiota epifítica e endofítica. Elas podem ser encontradas tanto nas plantas como no solo (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). As leveduras formam uma barreira na superfície foliar, por se desenvolverem desde do início do crescimento das plantas, e são responsáveis pelo controle biológico da mesma (FOKKEMA et al., 1979; BUCK e ANDREWS, 1999).

Normalmente as leveduras agem como protetoras de infecção, e não como curativo. Pois os mecanismos de biocontrole das leveduras são produção de compostos microbianos, enzimas, que além de auxiliar na indústria induzem resistência do hospedeiro, enzimas tóxicas ao patógeno e colonizadoras de ferimentos. (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). A competição por nutrientes e espaço, diretamente associadas 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 esse motivo, é extensamente estudado (EL-TARABILY; SILVASITHAMPARAM, 2006). As enzimas encontradas possuem propriedades altamente requisitadas por serem biocatalizadoras, são muito versáteis e ativas, realizando uma série de transformações de modo seletivo e rápido, assim influenciando no processamento de alimentos e estruturas vivas, como a parede celular da planta (Reed, 1975; Dziezak, 1991; Patel, 2002; Pizarro & Park, 2003). Com isso, verifica-se a importância de

pesquisar esses agentes, como as leveduras da microbiota do feijoeiro, por não trazer riscos ao ambiente, à saúde dos consumidores e pode ser um resultado próspero para adoção de medidas de controle da murcha-de-fusário, aumentando a produção e a exportação de feijão caupi com qualidade.

3 OBJETIVOS

3.1. GERAL

–Selecionar leveduras, a partir de caule, folha, raiz e vagem de feijão-caupi, com potencial para o biocontrole de *Fusarium oxysporum* fs. sp. *tracheiphilum* em feijão-caupi.

3.2. ESPECÍFICOS

–Recuperação de isolados de *Fusarium oxysporum* fs. sp. *tracheiphilum* a partir de amostras preservadas nas Coleções Micológicas Prof^a. Maria Menezes - CMM e Coleção de Fungos de Solo - CFS;

–Avaliar a patogenicidade dos isolados dos isolados fúngicos recuperados;

–Obtenção e purificação de cepas de leveduras a partir da microbiota de caule, folha, raiz e vagem de feijão-caupi;

–Avaliação as leveduras com potencial antagônico a *Fusarium oxysporum* fs. sp. *tracheiphilum* em testes *in vitro*;

–Examinar prospecção de leveduras quanto o seu potencial para a produção de enzimas hidrolíticas;

–Avaliar os isolados leveduriformes quanto o seu potencial para produção de toxinas “Killer”;

–Avaliar o efeito bioprotetivo de leveduras em sementes de feijão-caupi;

–Seleção de leveduras quanto aos mecanismos avaliados;

–Identificar molecularmente as leveduras selecionadas;

4 METODOLOGIA

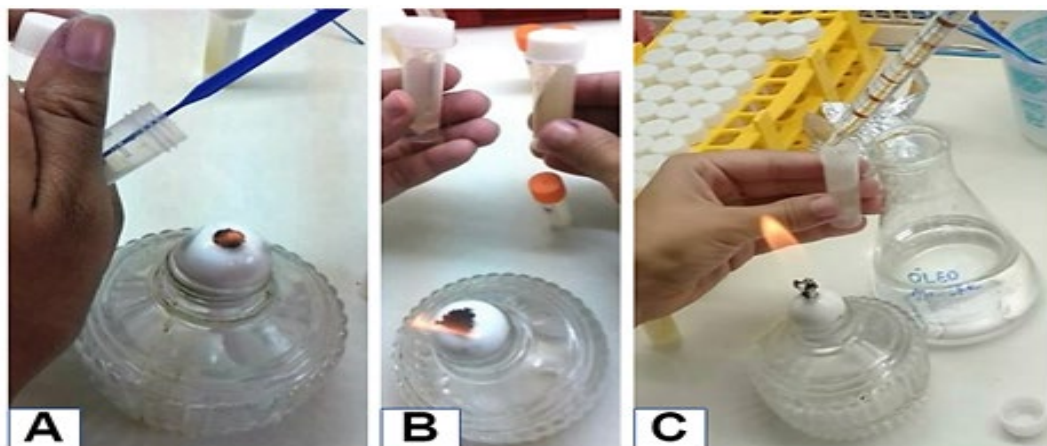
4.1. OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS

Os isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, obtidos a partir do isolamento de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walph.) com sintomas de murcha de fusário, foram resgatados pela Coleção de Culturas de Fungos do Solo e Coleção de Culturas Fúngicas “Prof. Maria Menezes” da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Todos os isolados foram cultivados em meio de cultura batata, dextrose e ágar – BDA e, foram preservados em tubos criogênicos contendo 1,5mL de água destilada esterilizada – ADE, onde depositou sete discos de 5mm de diâmetro contendo estruturas fúngicas.

As cepas de leveduras utilizadas foram obtidas a partir de caule, folhas, ramas, grãos, vagem e raízes saudáveis de feijão-caupi. Nos tubos de ensaio contendo ADE (10mL) + clorafenicol (50 mg L⁻¹), foram acondicionados seis a oito fragmentos de tecidos vegetais, e submetidos por 25 minutos a banho de ultra-som, seguidos de um agitação no vortex durante 30 segundos. Posteriormente alíquotas da suspensão (0,1mL) retiradas dos tubos de ensaio, foram acrescentadas e semeadas em placas de Petri contendo meio YEPD (yeast extract, peptone e dextrose) e as placas incubadas à temperatura de 25±2°C por um período de 72 horas. As colônias de leveduras emergentes foram repicadas em placas de Petri contendo meio YEPD e, em seguida, purificadas por contínuos cultivos.

As cepas de leveduras adquiridas, foram preservados pelo método Castellani (CASTELLANI, 1963), em microtubos criogênicos contendo 1,5mL de ADE. Além dos tubos Castellani, as leveduras também foram preservadas em óleo mineral, na qual, foram semeadas em tubos criogênicos (5mL) contendo meio YEPD e, até o completo desenvolvimento das colônias as leveduras foram conservadas em temperaturas ambiente de 28°C, após esse período são cobertas por óleo mineral estéril, até cobrir totalmente as estruturas leveduriformes contida no meio YEPD presentes no tubo criogênico (Figura 1).

Figura 1. Preservação de leveduras em microtubos pelos métodos Castellani e óleo mineral. Colônias de leveduras sendo semeada no tubo criogênico contendo meio YEPD inclinado (A), em sistemas de duplicatas (B) e, após o completo desenvolvimento fúngico, adição de óleo mineral, em ambiente estéril (C).

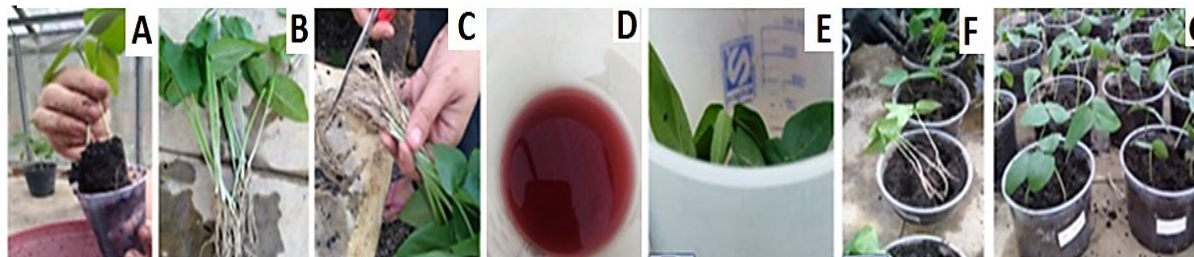


4.2. PREPARAÇÃO DE INÓCULO E AVALIAÇÃO FITOPATOGÊNICA DO ISOLADO DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*

A avaliação fitopatogênica foi realizada para os isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*: CMM 0005, CMM 0033, CMM 0041, CMM 0732, CFS 296, sobre o genótipo de feijão-caupi BR-17 Gurguéia e IPA-206, que retrata um padrão de suscetibilidade em relação a murcha-de-fusário. O método adotado para realização do teste foi o de infestação de raízes com suspensão de esporos fúngicos – SR.

As sementes, de ambos genótipos do feijão-caupi, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% por dois minutos, higienizadas em água corrente e imersas em suspensão de tetraciclina (250 ppm) por dois minutos. As sementes secas em temperatura ambiente de aproximadamente 28 ± 2 °C foram plantadas em bandejas de semeio contendo substrato de germinação BASAPLANT® e, depois de 7 dias da data de germinação, as plantas foram removidas dos substratos, as raízes lavadas em água corrente e 1/3 dessas raízes foram seccionadas com auxílio de uma tesoura. As plantas foram submetidas a imersão radicular em suspensão de esporos *Fox-trach* por 1 min, preparada em ADE com concentração ajustada a 1×10^6 conídios mL⁻¹ e em seguida foram transplantadas em vasos de 1 L contendo substrato estéril (Figura 2). No tratamento controle consistiu em vasos contendo plantas submetidas a imersão radicular em ADE. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições por tratamento, onde cada tratamento corresponde a um vaso contendo quatro plantas.

Figura 2. Infestação de raízes com suspensão de esporos fúngicos – SR. Feijão caupi semeados em substrato BASAPLANT® são removidos (A), tem suas raízes lavadas (B) e 1/3 cortadas (C); As mudas de feijão-caupi são imersas em suspensão de esporos preparada em ADE e calibrada a 1×10^6 conídios mL^{-1} (D e E) e, após 1 min de imersão são transplantadas em vasos contendo solo estéril (F e G).



Após 25 dias da infestação das plantas foram realizadas as avaliações da severidade, por meio de atribuição de notas de 0 a 4, segundo a escala adaptada por Schoonhoven e Pastor-Corrrales (1987). As notas de severidade foram transformadas em percentuais de severidade da doença, por meio do cálculo do Índice da Doença (ID) de Mckinney (1923), onde: $ID = \frac{[(\text{número de plantas com nota } 0 \times 0) + (\text{número de plantas com nota } 1 \times 1) + (\text{número de plantas com nota } 2 \times 2) + (\text{número de plantas com nota } 3 \times 3) + (\text{número de plantas com nota } 4 \times 4)] \times 100}{[(\text{total de sementes plantadas por vaso}) \times (\text{grau máximo da escala de notas})]}$. Também foi avaliado os caracteres, número de ramos (NR), número de folhas (NF), diâmetro do caule (DC) e altura de plantas (AP), massa verde e massa seca da parte aérea e raiz para as testemunhas positivas e negativas, com finalidade de examinar a influência do patógeno sobre o desenvolvimento da planta de feijão-caupi. As percentagens obtidas para Índice da Doença (ID) e valores de altura de plantas -AP, comprimento de raiz - CR, diâmetro do caule - DC, número de folhas - NF, número de ramos - NR, biomassa verde - BV e biomassa seca - BS da parte área e raiz, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, ao teste de comparação de médias no Programa SISVAR® pelos testes Scott Knott ou LCD a 5% de probabilidade.

4.3. DIFUSÃO DE COMPOSTOS INIBITÓRIOS EM MEIO

O *screening* de isolados leveduriformes constituiu de uma triagem de leveduras com potencial bicontrolador para a murcha-de-fusário em feijão-caupi, na qual aplicou-se testes *in vitro* quanto a capacidade inibitória, por difusão de compostos secundários sobre o desenvolvimento do *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* em meio YEPD. No primeiro teste as

leveduras foram previamente escolhidas em relação ao seu potencial inibitório sobre o isolado *Fox-trach* CMM-732, cultivado em meio BDA por 7 dias. Para realizar o experimento foram utilizados 91 isolados leveduriformes, onde foram cultivados individualmente em tubos “Falcon” sobre aproximadamente 30mL de YEPD líquido, sobre agitação de 80 rpm, por 72 horas para manter o meio de cultivo oxigenado. Posteriormente para redução da concentração de células leveduriformes no meio, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por cinco minutos, acarretando no adensamento da massa de células leveduriformes no fundo do tubo. Em seguida a fase líquida de YEPD sobrenadante, aproximadamente 25 mL, foi transferida para novo tubo tipo “falcon” estéril e acrescido com meio Ágar Água (AA), completando um volume de 50 mL.

Após homogeneização, o meio contendo células de leveduras, foi fracionado em placas de Petri, formando uma pequena camada (5 placas/tratamento) e, depois da solidificação, depositou-se uma nova camada de meio BDA sobre a primeira camada, formando-se uma dupla camada de meios. As placas de Petri foram incubadas por 48h a 28 ± 2 °C e, posteriormente a esse período, depositou-se um disco, na região central da placa, contendo estruturas fúngicas do isolado patogênico CMM 732 ($\varnothing=0,5$ cm).

As placas foram incubadas por mais 8 dias, e a cada 48h, mediu-se o diâmetro de crescimento do isolado CMM 732. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizados e, no tratamento controle continha apenas meio YEPD estéril, na primeira camada de meio adicionada a placa de Petri e a segunda camada sobreposta era de meio BDA mais o isolado patogênico.

Os isolados de leveduras selecionadas no primeiro experimento foram utilizados no segundo teste de difusão de compostos inibitórios, dessa vez sobre dois isolados *Fox-trach* CMM 732 e CFS296, com a finalidade de escolher pelo menos cinco isolados de leveduras com maior expressão biocontrolador, seguindo os mesmos procedimentos metodológicos citados acima.

Após o período de incubação foram calculados o índice de velocidade de crescimento micelial – IVCM e a Porcentagem de inibição do crescimento micelial – PIC para o isolado CMM 732, no primeiro experimento e, no segundo experimento para os isolados CMM 732 e CFS 296, em comparação ao controle. Os dados alcançados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

-Equações:

$$\text{IVCM} = \sum \frac{cf-ci}{t}$$

$$\text{PIC} = \frac{C_c - C_f}{C_c} * 100$$

Onde: **Ci** = crescimento inicial, **Cf** = crescimento final, **Cc** = Crescimento final tratamento controle e **t** = intervalo de avaliação.

4.4. AVALIAÇÃO AÇÃO DE ANTIBIOSE

O patógeno *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* e o antagonista foram cultivados ao mesmo tempo em placas de Petri contendo meio BDA, na qual as leveduras foram semeadas no eixo transversal com uma risca continua em duas extremidades da placa de Petri, com auxílio de “Swab” estéril. O *Fox-trach* foi depositado no ponto central entre as duas extremidades, com um disco de cultura contendo estruturas fúngicas, de 0,5 cm de diâmetro.

Em contraste, foram avaliados o tratamento controle, no qual a levedura foi substituída por ADE. Em seguida as placas de Petri, foram incubadas por 8 dias à 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, em um delineamento inteiramente casualizados, com quatro repetições. Posteriormente ao período de incubação foram feitas avaliações sobre a presença e/ou o diâmetro do halo de inibição entre o crescimento do patógeno e antagonista.

4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As avaliações das enzimas lipase e esterase foram realizadas em meio sólido contendo 10g de peptona, 20g de ágar, 0,1g CaCl₂, 5g NaCl, 1L de água destilada e pH ajustado para 6,0, utilizando HCl ou NaOH, depois preparou-se 1% de Twenn-20 estéril, autoclavado separadamente, para acrescentar ao meio antes de verter esse meio de cultura nas placas de Petri (SIERRA., 1957).

De acordo com a metodologia de Looder (1970), a avaliação quanto a capacidade amilolítica foi realizada em meio sólido constituído de 20g de amido solúvel, 5g de extrato de levedura, 18g de ágar em 1000 ml de água destilada.

Para determinar a atividade pectnolítica foi feita uma solução de 1mL de MgSO₄ e 10 ml de CaCl₂ com concentrações, respectivamente, de 1M e 0,01M e foram autoclavados separados do meio sólido que constitui de 16g de ágar, 1,2g de extrato de levedura, 4g de pectina, 2g de sacarose, 6g de Na₂HPO₄, 3g de KH₂PO₄, 0,25g de NaCl, 1g de NH₄Cl e 989 ml

de água destilada. As duas soluções foram adicionadas na hora de verter o meio para as placas de Petri, completando o volume final para 1000 mL (HANKIN et al., 1971).

Na atividade proteolítica, utilizou-se para preparo do meio sólido 10g de ágar, 10g de gelatina, 10g de leite desnatado e 100ml de uma solução tampão fosfocitrato contendo 1,2g de ácido cítrico, 1,46g Na₂HPO₄ para 1000 ml de ADE- Água Destilada Autoclavada.

Em todos testes enzimáticos, as leveduras escolhidas a partir do *screening* quanto a produção de compostos inibitórios e ação antibiótica, foram semeadas em placa de Petri contendo o meio específico para determinação de cada enzima, com auxílio de palitos de dentes estéreis (3 repetições para cada isolado). As placas foram incubadas à 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas por 48h. Posteriormente observou-se qualitativamente a formação de um halo translúcido ou opaco (para esterase e lipase) em volta das colônias de leveduras. Para facilitar a avaliação do halo após o período de incubação foi adicionado uma solução HCl. No caso da amilase, os halos foram evidenciados adicionando-se 2 mL de lugol e após 10 minutos de ação do lugol (DAMASO; ANDRADE; JÚNIOR, 2002). A ação positiva das enzimas lipase/ esterase foi determinada pela formação de um halo claro e precipitado branco.

4.6. AVALIAÇÃO DE TOXINAS *killer*

Para analisar a expressão do fenótipo *killer*, células de isolados leveduriformes previamente caracterizada como sensível, foram cultivadas em placa de Petri contendo meio YEPD – Yeast Extract Peptona Dextrose Ágar, por 48 horas a 22 ± 2 °C, e em seguida foram ressuspensas em ADE com concentração de 10^6 células mL⁻¹, e semeadas em placa de Petri, com auxílio da alça de Drigalski, contendo meio tamponado (pH 4,5) de YEPD, acrescido de azul de metileno (0,005%).

Posteriormente os isolados de leveduras a serem avaliados quanto a expressão do fato “killer” foram depositadas em arranjos pontuais equidistantes, com uso da alça de platina. Foi inoculada uma linhagem. Foi inoculada uma linhagem de leveduras por placa, com 6 repetições, e incubadas a 22 ± 2 °C por 48 horas. Após o período de incubação as colônias de coloração azul que apresentaram um halo translúcido de inibição foram consideradas, respectivamente positivas quanto à produção de toxinas *killer*.

4.7. EFEITO BIOPROTETIVO DE LEVEDURAS SOBRE SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI

Para avaliar o efeito bioprotetivo as sementes de feijão-caupi foram submetidas ao tratamento com suspensão de células leveduriformes, preparadas com ADE na concentração de 10^6 células mL^{-1} e acrescida de tween 20 (1%). As sementes, previamente desinfestadas em NaClO, como apresentado no teste de patogenicidade, foram arranjadas em frascos estéreis contendo 100 mL da suspensão leveduriforme e, depois mantidas em mesa agitadora a 120 rpm por um período de 20 minutos. Em seguida, foram colocadas em papel filtro estéril para secagem em capela de fluxo laminar e, após completa secagem dispostas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, em arranjo equidistantes com quatro sementes por placa e quatro placas por tratamento.

No meio das placas de Petri foi depositado um fragmento de disco de cultura ($\varnothing = 0,5$ cm) contendo estruturas do fúngicas do patógeno *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* e as placas foram incubadas por um período de seis dias à 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, sobre um delineamento inteiramente casualizados. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados dos tratamentos controle positivo e negativo, na qual, respectivamente, as sementes desinfestadas, não tratadas com leveduras, foram plaqueados em meio BDA na presença e na ausência do *Fox-trach*. Depois do período de incubação, foi avaliado a porcentagem de germinação das sementes de feijão-caupi, diâmetro de crescimento micelial de *Fox-trach* e infestação de sementes.

4.8. IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Os isolados leveduriformes selecionados nos experimentos anteriores foram submetidos aos métodos de extração de DNA, a partir do protocolo adaptado de Murray & Thompson (1980). O material genético obtido foi amplificado, por meios de técnicas de PCR para o espaço de transcrição interna 1 e 2, incluindo o gene 5.8S rRNA (ITS), utilizando os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Os resultados da PCR (amplicons) foram sequenciados e, as sequencias obtidas, comparadas filogeneticamente por análise de máxima verossimilhança – MV e Infêrencia Bayseana – IB.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS

A partir dos tecidos vegetais da planta do feijão-caupi como caule, rama, raiz, folha, grão e vagem foram obtidos e preservados 113 isolados leveduriformes, sendo o maior número de isolados obtidos a partir de tecidos foliares (Tabela 1). Por conta das diferenças no crescimento, caracterização morfológica das colônias e desenvolvimento em temperaturas a 37° C, 22 isolados de leveduras foram descartados, pois os mesmos apresentaram características de crescimento escassa e/ou viscosa e capacidade de desenvolvimento sob a temperatura mencionada, dificultando o cultivo do inóculo. A descrição e procedência dos isolados de *Fox-trach* cedidos pela Coleção Fungos do Solo – CFS e Coleção de Culturas Fúngicas “Prof. Maria Menezes”, podem ser verificadas na Tabela 2.

Tabela 1. Quantidade e distribuição de isolados leveduriformes obtidos a partir de órgãos vegetais de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)

Nº de isolados	Órgãos vegetais					
	Caule	Folha	Grão	Rama	Raiz	Vagem
	7	62	4	17	12	11

Tabela 2. Descrição e procedência de isolados *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* utilizados nos testes de patogenicidade em feijão caupi, cultivar BR-17 Gurguéia

Código	Coleção	Hospedeiro	Parte	Local	Ano
CMM 005	CMM	Caupi	Caule	São João-PE	2011
CMM 033	CMM	Caupi	Caule	São João-PE	2011
CMM 041	CMM	Caupi	Caule	São João-PE	2011
CMM 732	CMM	Caupi	Caule	Floresta-PE	1998
CFS 296	CFS	Caupi	Caule	Piauí	2017

CMM – Coleção Micológica Profª. Maria Menezes
CFS – Coleção Fungos de Solo

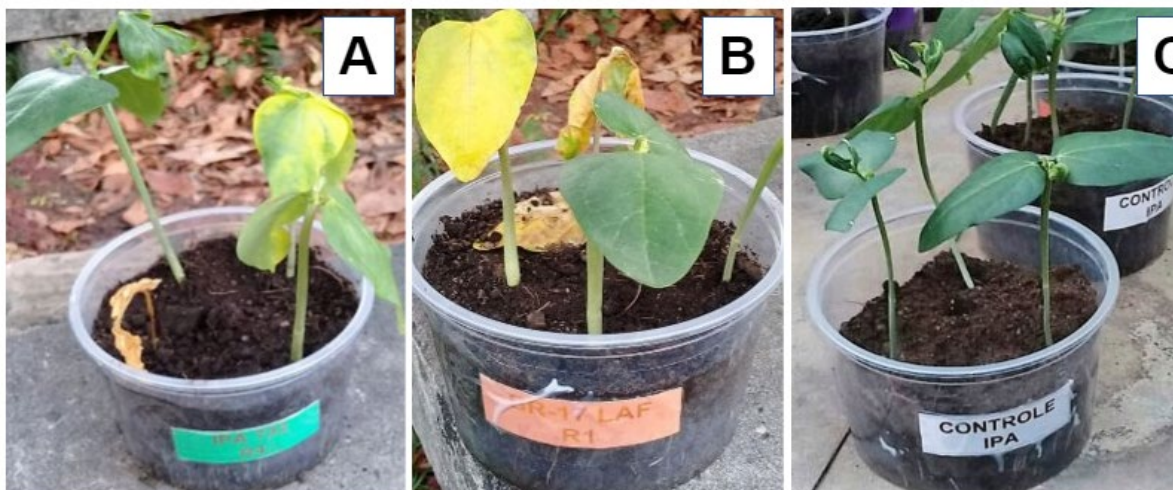
A manutenção de fungos apenas em meios de cultura, não é recomendada, pois requer muitos cuidados e, ainda assim, dependendo do fungo, há um acelerado consumo dos nutrientes presentes no meio de cultura, necessitando procedimentos de repiques frequentes, aumentando as possibilidades de contaminação e colaborando para redução ou perda da virulência desses

microorganismos (DIOGO et al., 2005). A preservação em óleo mineral e água destilada são procedimentos que podem ser considerados eficientes e adequados para muitos gêneros fúngicos, incluindo leveduriformes.

5.2. PATOGENICIDADE E SELEÇÃO *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*

A partir do método de imersão de raízes em suspensão fúngica – SR observou-se resultados satisfatórios quanto a ação patogênica de alguns dos isolados *Fox-trach*, em relação as duas cultivares de feijão-caupi avaliadas (Figura 3).

Figura 3. Plantas de BR-17 Gurguéia, aos 30 dias após germinação em substrato infestado pelo método SR sintomas da murcha-de-fusário (A e B) em comparação ao tratamento controle (C).



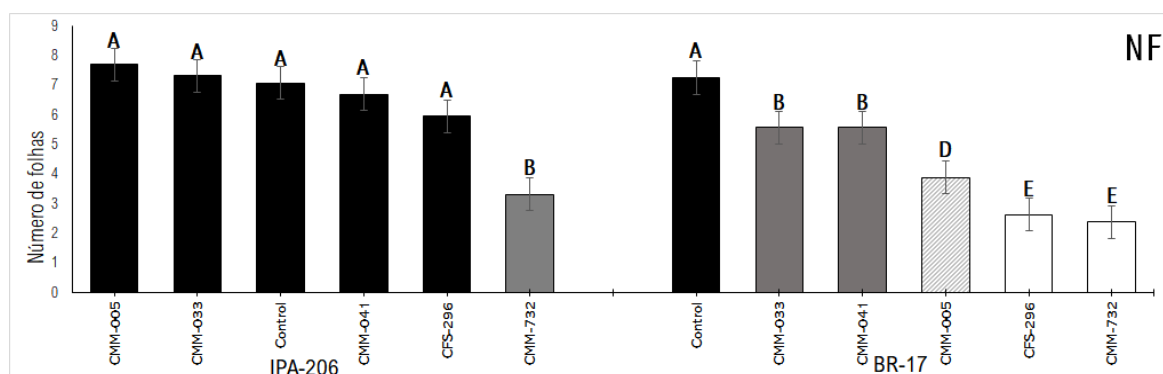
De todos os isolados patogênicos avaliados nas cultivares BR-17 Gurguéia e IP-206, apenas dois, CFS 296 e CMM 732 provocaram sintomas característicos da fusariose como: redução no crescimento das plantas de feijão-caupi, murcha e escurecimento dos feixes vasculares (Figura 4). De acordo com Noronha et al. (2006), o genótipo BR-17 Gurguéia expressa um padrão de sensibilidade ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, assim, sabe-se que a escolha e utilização desse genótipo representa credibilidade na indicação de patogenicidade e comparação de padrões de suscetibilidade em relação a outras cultivares.

Figura 4. Plantas de BR-17 Gurguéia, removidas do solo aos 30 dias após germinação. Plantas assintomáticas (A e C) apresentando bom desenvolvimento vegetativo em comparação com plantas sintomáticas pouco desenvolvidas (B), inoculadas com o patógeno CMM-732.



Com base nos experimentos de patogenicidade, os resultados de expressão sintomáticas secundárias foram coincidentes entre os dados de comprimento de raiz – CR, diâmetro de caule – DC, número de ramos – NR, altura de planta – AP, biomassa seca – BS, biomassa verde – BV e número de folhas – NF, no qual apenas os isolados CMM-732 e CFS-296 promoveram sintomas de redução no desenvolvimento nas plantas das cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206. Os dois isolados patogênicos de *Fox-trach*, afetaram negativamente o desenvolvimento vegetativo da planta de feijão-caupi para quase todos os parâmetros observados (Figura 5).

Figura 5. Efeitos secundários da ação fitopatogênica de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* sobre o desenvolvimento de plantas dos genótipos BR-17 Gurguéia e IPA-206, 30 dias após germinação: altura de planta – AP; diâmetro de caule – DC; comprimento de raiz – CR; número de folhas – NF; número de ramos – NR; biomassa verde – BV e biomassa seca - BS.



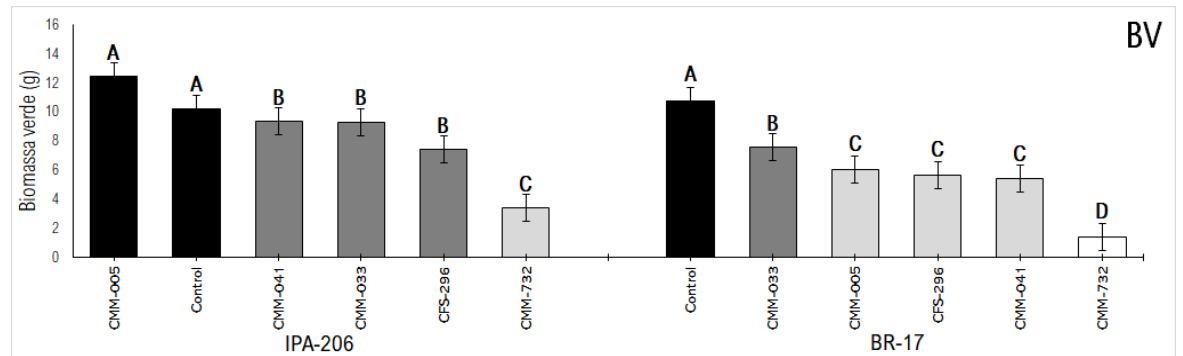
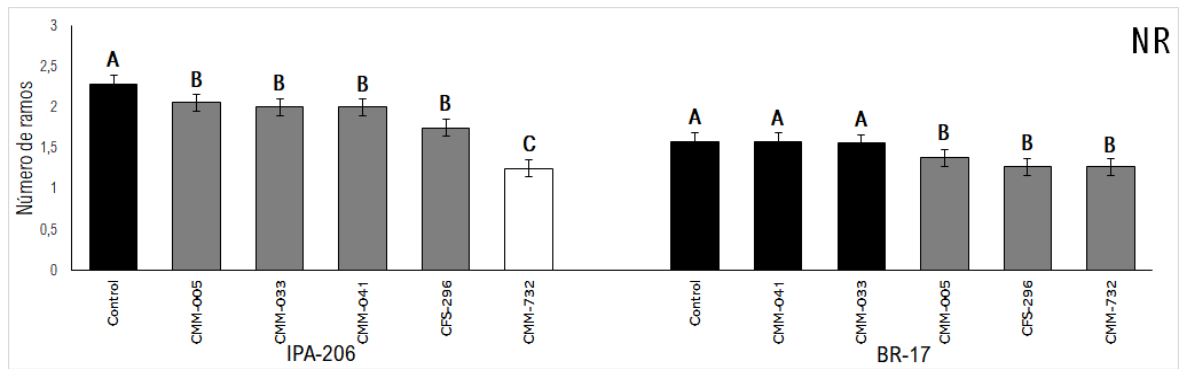
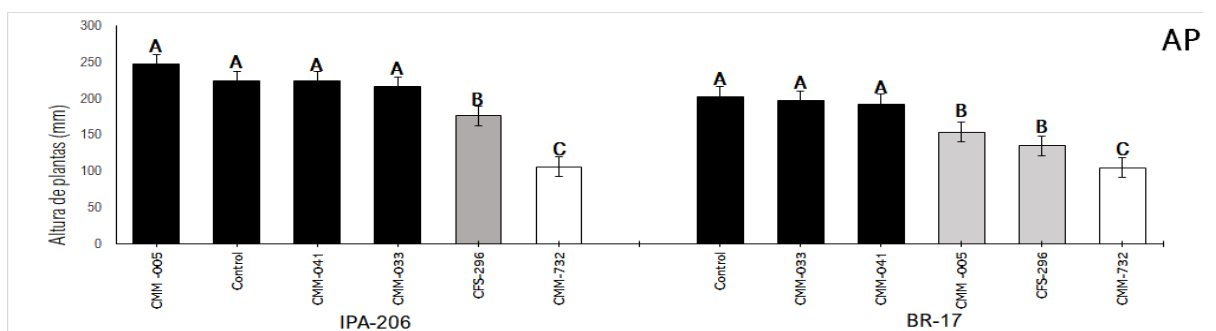
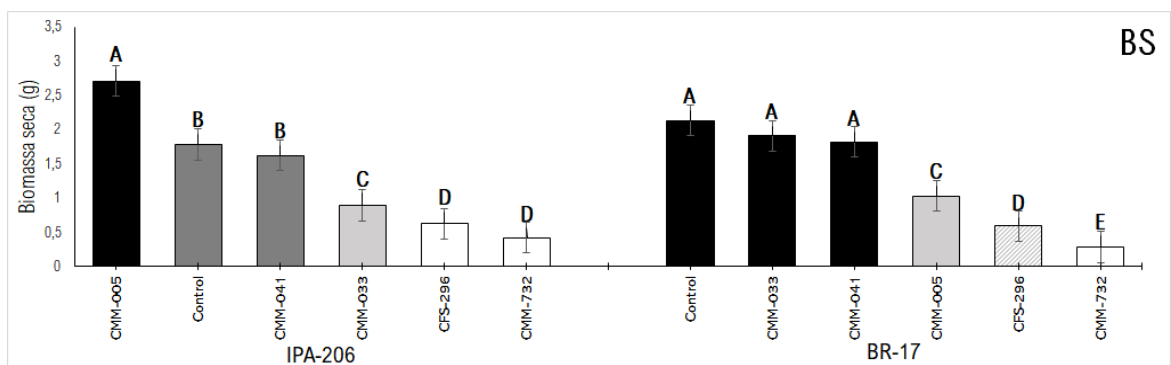
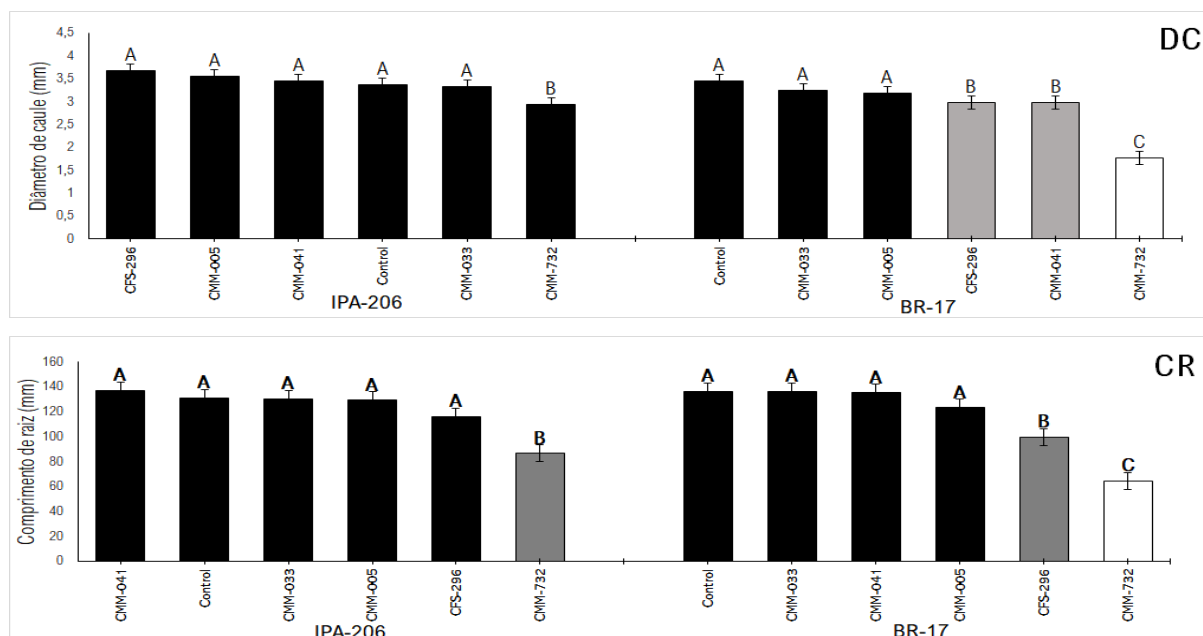


Figura 5. Cont.





5.3. AÇÃO DE COMPOSTOS METABÓLICOS E SELEÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS

O resultado do primeiro teste de difusão metabólitos em meio sólido, utilizado como métodos de triagem inicial de leveduras antagonistas ao controle do *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* causador da doença murcha-de-fusário no feijão-caupi, é apresentado na tabela 3. De acordo com o teste Scoot-Knott (1974) a 5% de probabilidade, verificou que dos 91 isolados leveduriformes testados, quando comparados com o tratamento controle, 37 apresentaram dados positivos aos níveis de Inibição do Crescimento Micelial – PIC e Índice de Velocidade de Crescimento – IVC. Nesse primeiro experimento, os 37 isolados, agrupados nos grupos A, B, C e D foram selecionadas para um segundo experimento de difusão.

Tabela 3. Porcentagem de Inibição de Crescimento micelial (PIC)^y *in vitro* do patógeno *Fox-trach*, isolado CMM-732, por compostos metabolitos produzidos por leveduras presentes na microbiota de plantas de feijão-caupi

Isolado	PIC ^z	Isolado	PIC ^z
CFS 696	100,0 ^{±0} A	CFS 721	72,63 ^{±1,71} C
CFS 730	100,0 ^{±0} A	CFS 710	72,29 ^{±0,31} C
CFS 677	100,0 ^{±0} A	CFS 622	71,48 ^{±14,1} C
CFS 631	100,0 ^{±0} A	CFS 675	70,63 ^{±10,1} C
CFS 659	100,0 ^{±0} A	CFS 619	70,56 ^{±10,1} C
CFS 684	100,0 ^{±7,42} A	CFS 652	70,45 ^{±14,8} C

CFS 701	100,0 ^{±8,59}	A	CFS 736	65,22 ^{±0,99}	C
CFS 703	85,77 ^{±7,11}	B	CFS 635	65,21 ^{±4,39}	C
CFS 729	85,32 ^{±14,6}	B	CFS 719	64,63 ^{±1,96}	C
CFS 738	83,08 ^{±1,31}	B	CFS 660	64,47 ^{±17,4}	C
CFS 620	81,87 ^{±0,18}	B	CFS 731	62,93 ^{±5,21}	C
CFS 699	81,46 ^{±1,04}	B	CFS 723	61,57 ^{±4,11}	C
CFS 676	80,60 ^{±9,85}	B	CFS 643	58,65 ^{±2,11}	D
CFS 700	80,04 ^{±1,70}	B	CFS 670	58,06 ^{±8,75}	D
CFS 642	79,98 ^{±2,08}	B	CFS 644	57,07 ^{±13,6}	D
CFS 650	77,66 ^{±3,80}	B	CFS 705	54,29 ^{±3,67}	D
CFS 671	76,48 ^{±5,10}	B	CFS 639	51,87 ^{±5,32}	D
CFS 732	61,48 ^{±10,1}	C	CFS 714	51,15 ^{±3,70}	D
CFS 623	47,00 ^{±3,85}	E	CFS 637	50,44 ^{±2,83}	D
CFS 654	45,69 ^{±5,97}	E	CFS 704	24,66 ^{±1,41}	G
CFS 647	45,51 ^{±3,31}	E	CFS 669	24,64 ^{±1,92}	G
CFS 690	44,70 ^{±4,49}	E	CFS 673	24,29 ^{±2,98}	G
CFS 624	43,83 ^{±5,29}	E	CFS 638	23,75 ^{±7,78}	G
CFS 626	42,50 ^{±3,59}	E	CFS 666	23,31 ^{±2,60}	G
CFS 708	42,42 ^{±1,93}	E	CFS 712	22,75 ^{±1,04}	G
CFS 685	40,68 ^{±7,16}	E	CFS 661	22,56 ^{±7,63}	G
CFS 706	40,24 ^{±2,62}	E	CFS 718	22,11 ^{±0,58}	G
CFS 655	37,61 ^{±0,44}	F	CFS 664	21,13 ^{±1,42}	G
CFS 681	37,23 ^{±3,08}	F	CFS 646	20,44 ^{±0,52}	G
CFS 711	37,18 ^{±12,95}	F	CFS 694	20,24 ^{±3,31}	G
CFS 627	35,58 ^{±16,50}	F	CFS 734	20,02 ^{±2,82}	G
CFS 678	35,51 ^{±3,12}	F	CFS 633	19,99 ^{±3,90}	G
CFS 651	34,23 ^{±3,12}	F	CFS 656	19,04 ^{±3,44}	G
CFS 689	33,41 ^{±1,74}	F	CFS 720	18,81 ^{±2,10}	G
CFS 691	33,36 ^{±3,90}	F	CFS 674	18,54 ^{±12,78}	G
CFS 640	33,24 ^{±2,10}	F	CFS 641	17,70 ^{±3,82}	G
CFS 683	32,94 ^{±3,56}	F	CFS 735	17,68 ^{±4,38}	G
Tabela 3. Cont.					
CFS 697	30,69 ^{±2,07}	F	CFS 709	17,47 ^{±2,40}	G
CFS 713	28,96 ^{±4,18}	F	CFS 630	17,43 ^{±2,68}	G
CFS 629	26,91 ^{±7,02}	G	CFS 648	9,13 ^{±9,13}	H
CFS 688	26,79 ^{±1,28}	G	CFS 695	6,52 ^{±6,52}	H
CFS 716	26,75 ^{±2,96}	G	CFS 628	0,0 ^{±0,0}	H
CFS 653	25,18 ^{±5,66}	G	CFS 687	0,0 ^{±0,0}	H
CFS 722	12,48 ^{±6,24}	G	CFS 725	0,0 ^{±0,0}	H
CFS 665	13,17 ^{±13,63}	G	Controle 1	0,0 ^{±0,0}	H
CFS 693	15,11 ^{±2,38}	G	Controle 2	0,0 ^{±0,0}	H
CFS 727	16,12 ^{±2,28}	G			
Média Geral	44,84				
CV%	18,72				

y: Valores médios PIC ± valores Desvio Médio; o PIC foi calculado com a equação:

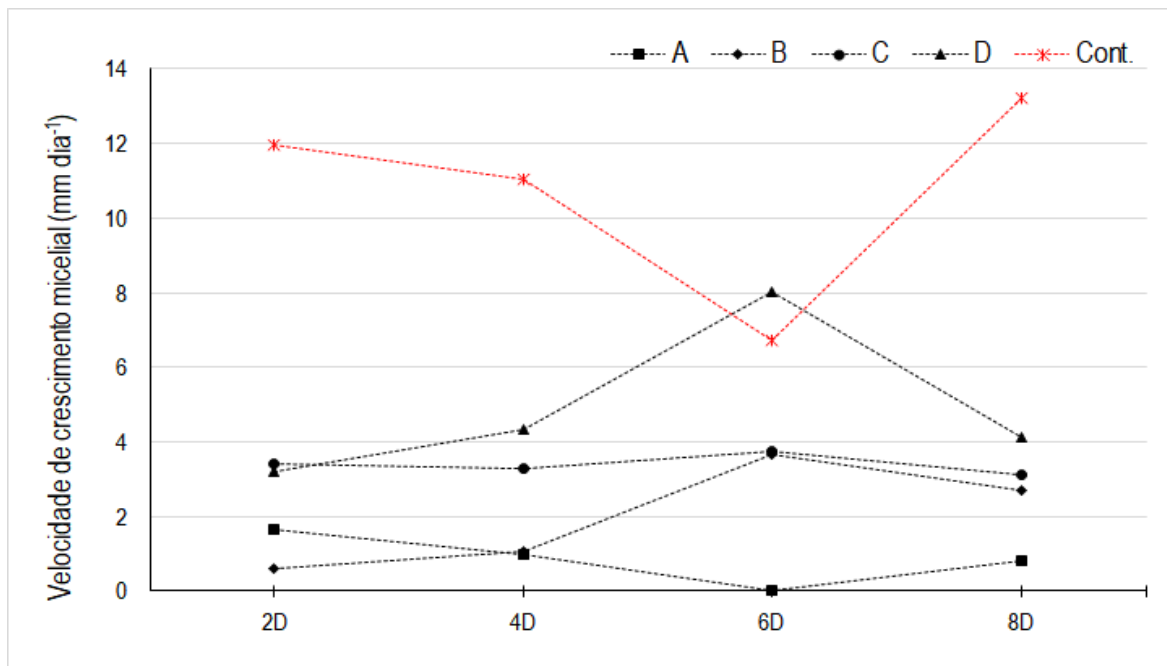
$((C_c - C_t) / C_c) \times 100$, sendo C_c : crescimento do controle, C_t : crescimento do tratamento.

z: valores médios de PIC, seguidos da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade;

Isolados selecionados foram destacados em negrito.

Quanto ao IVC, é possível observar nos grupos estatísticos de A, B, C e D, grande diferença no comportamento dos crescimentos miceliais de cada um desses grupos de leveduras selecionadas. No geral, em quase todos os tratamentos com células de leveduras houve redução significativa na velocidade de crescimento micelial *in vitro*, quando comparado ao tratamento controle, exceto para os isolados agrupados no D, pois houve aumento de IVC no intervalo de 4 a 6 dias de incubação, atingindo índices semelhantes ao controle (Figura 6).

Figura 6. Efeito dos compostos metabólicos, produzidos por leveduras, sobre o Índice de velocidade de crescimento micelial – IVC de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, isolado CMM 732. As diferentes letras maiúsculas representam os agrupamentos estatísticos entre os 40 isolados selecionados que diferiram estatisticamente pelo teste de média Scott-knott a 5% de probabilidade. Nota: o tratamento controle encontra-se destacado em vermelho.



De acordo com Fialho (2008) o estímulo e/ou inibição do crescimento micelial, bem como da germinação dos esporos fúngicos, por compostos voláteis depende de uma série de eventos somados. Por conta dos fatores ambientais e atividade microbiana apresentarem uma considerável ligação entre si e, portanto, a produção de voláteis dependerá da dinâmica envolvendo todo o ecossistema.

No segundo experimento de inibição por ação de compostos difundidos em meio, utilizando as 37 cepas de leveduras previamente selecionados, observou-se que as médias de

percentagem de inibição do crescimento micelial – PIC sobre o isolado patogênico CMM-732, destacou-se as leveduras CFS 696, CFS 738 e CFS 684, onde apresentaram cerca de 100% de inibição do *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. Já o isolado patogênico CFS-296, os isolados leveduriformes que foram positivas quanto ao controle do patógeno foram CFS 652, CFS 699, CFS 703, CFS 644 e CFS 696 (Tabela 4). A partir desses resultados nos permitem concluir que leveduras potencialmente biocontroladoras podem ser selecionadas por meio da avaliação de inibição de crescimento micelial por difusão de compostos metabólicos, e que o referido método seletivo é representativo e eficiente quando incorporado aos diversos mecanismos de controle biológico que podem estar presentes no leque antagônico de leveduras potencialmente biocontroladoras a murcha-de-fusário do feijão-caupi.

Tabela 4. Porcentagem de Inibição de Crescimento micelial (PIC)^y *in vitro* do patógeno *Fox-trach*, isolado CMM 732 e CFS 296, por compostos metabolitos produzidos por leveduras presentes na microbiota de plantas de feijão-caupi

Isolado	PIC ^z	
	CMM-732	CFS-296
CFS 619	17,72 ^{±4,0} E	0,0 ^{±0,0} E
CFS 620	19,27 ^{±6,92} E	22,64 ^{±2,52} D
CFS 622	23,62 ^{±6,84} E	6,19 ^{±7,43} E
CFS 631	20,50 ^{±2,64} E	3,78 ^{±6,05} E
CFS 635	63,82 ^{±3,13} C	43,75 ^{±8,11} C
CFS 637	18,74 ^{±4,93} E	0,0 ^{±0,0} E
CFS 639	19,24 ^{±5,73} E	15,22 ^{±2,78} E
CFS 642	25,56 ^{±2,93} E	38,33 ^{±7,02} C
CFS 643	86,15 ^{±1,76} B	73,01 ^{±10,47} B
CFS 650	82,05 ^{±3,11} B	19,71 ^{±7,15} D
CFS 652	69,11 ^{±5,82} B	91,05^{±1,50} A
CFS 659	36,78 ^{±5,09} D	79,58 ^{±21,44} B
CFS 660	16,04 ^{±1,70} E	31,61 ^{±9,18} C
CFS 670	25,87 ^{±1,03} E	11,48 ^{±9,09} E
CFS 671	40,51 ^{±4,01} D	20,92 ^{±2,42} D
CFS 675	44,66 ^{±3,85} D	65,87 ^{±2,07} B
CFS 676	76,25 ^{±2,65} B	66,85 ^{±1,38} B
CFS 677	86,42 ^{±0,57} B	68,38 ^{±4,12} B
CFS 684	100^{±0,0} A	75,14 ^{±12,07} B
CFS 696	100^{±0,0} A	86,16^{±0,0} A
CFS 699	36,28 ^{±25,48} D	100^{±0,0} A
CFS 700	26,73 ^{±8,03} E	0,0 ^{±0,0} E
CFS 701	78,60 ^{±5,79} B	38,13 ^{±2,16} C
CFS 703	46,54 ^{±1,89} D	100^{±0,0} A
CFS 705	26,45 ^{±1,28} E	23,17 ^{±4,60} D

CFS 710	60,16 ^{±22,83}	C	20,28 ^{±26,82}	D
CFS 714	33,18 ^{±2,01}	D	66,07 ^{±3,71}	B
CFS 719	39,06 ^{±10,19}	D	20,84 ^{±11,65}	D
CFS 721	38,75 ^{±12,26}	D	32,43 ^{±11,53}	C
CFS 723	29,51 ^{±3,69}	D	35,61 ^{±3,92}	C
CFS 729	20,48 ^{±2,03}	E	21,59 ^{±2,52}	D
CFS 730	58,11 ^{±17,57}	C	20,37 ^{±15,99}	D
CFS 731	17,44 ^{±1,92}	E	62,03 ^{±15,78}	B
CFS 732	24,90 ^{±4,08}	E	26,32 ^{±8,20}	D
CFS 736	30,61 ^{±5,98}	D	25,82 ^{±4,14}	D
CFS 738	100 ^{±0,0}	A	30,54 ^{±5,76}	C
CFS 644	34,96 ^{±6,26}	D	91,40 ^{±9,69}	A
Controle	0,0 ^{±0,0}	E	0,0 ^{±0,0}	E
Média Geral	44,06		40,38	
CV%	23,45		28,55	

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;

Isolados selecionados foram destacados em negrito.

5.4. CARACTERIZAÇÃO ANTIBIÓTICA

A partir dos testes de caracterização antibiótica, verificou-se que dos 91 isolados testados, 30 apresentaram a formação de um halo de inibição, em relação ao crescimento do patógeno *Fox-trach* (Figura 7). Dos 30 isolados significativos destacou-se CFS 677, CFS 696, CFS 678, CFS 643, CFS 738, CFS 643, CFS 650, CFS 650, por apresentarem um halo inibidor de diâmetro bem expressivo (Tabela 5).

Figura 7. Placas de Petri contendo leveduras com expressiva antibiose, marcado pelo halo de inibição do crescimento micelial do *Fox-trach*, isolado CMM 732. Caracterizado por um halo bastante expressivo (701), halo de inibição mediana (735) e halo de baixa inibição (647).

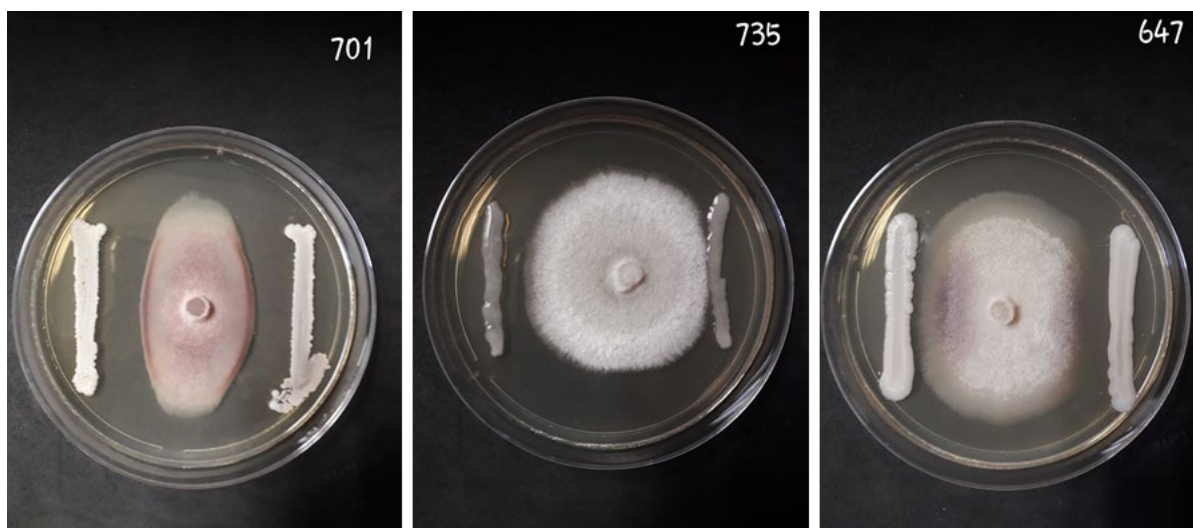


Tabela 5. Expressão¹ do fator antibiótico de leveduras sobre o patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*

Isolado	ANT	Isolado	ANT	Isolado	ANT
Testemunha		652	+	704	-
619	-	654	+	705	-
622	-	656	+	706	-
623	-	664	-	708	+
624	-	665	-	709	-
625	+	666	-	710	-
626	-	670	-	711	-
627	-	671	+	712	-
628	-	674	-	713	-
629	+	675	++	714	-
630	-	676	++	716	+
631	-	677	+++	718	-
633	-	678	+++	719	-
635	++	683	-	720	-
Tabela 5. Cont.					
637	-	684	+++	722	-
638	-	685	++	723	-
639	-	687	+	725	-
640	++	689	++	727	++
641	-	690	+	729	-
642	++	693	++	730	-
643	+++	694	-	731	-
644	-	695	-	732	-
645	-	696	+++	734	-
646	-	697	-	735	+
647	++	699	-	736	-
648	-	700	-	738	+++
650	+++	701	+++		

651	++	703	-
-----	----	-----	---

ANT: Ação Antibiótica

¹ Fenótipo positivo, caracterizado pela formação de halo inibidor discreto (+), ou halo inibidor de diâmetro médio (++) , ou halo inibidor de diâmetro expressivo (+++); Fenótipo negativo, sem halo de inibição do crescimento (-).

Mesmo que a antibiose não seja um dos mecanismos mais comum manifestados por leveduras, a antibiose quando presente, caracteriza-se como um importante mecanismo, pois o resultado da ação antifúngica por antibióticos pode estar relacionado com a produção de toxinas *killer* pelas leveduras biocontroladoras (COELHO et al., 2007), por esse motivo, é indispensável a constatação de ocorrência ou não do mecanismo quanto a caracterização antibiótica. A expressão antibiótica, em nossos testes de caracterização nos permite inferir que este mecanismo, em relação a totalidade de isolados caracterizados é um mecanismo adicional aos demais mecanismo que podem estar presentes no leque antagônico de leveduras potencialmente biocontroladoras, e pode ser utilizado no processo de escolha de isolados promissores.

As leveduras avaliadas constituem de agente promissores para o controle da murcha-de-fusário no feijão-caupi, causada pelo *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, porém se faz necessário dar continuidade e aprofundamento de conhecimentos por meio de estudos posteriores *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de avaliar o perfil antagônico e eficiência biocontroladora dessas leveduras sobre o hospedeiro.

5.5. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR LEVEDURAS

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos referentes a aptidão dos isolados leveduriformes da microflora do feijão-caupi, submetidos a experimentos para produção de protease, pectinase, amilase, lipase, esterase, bem como os resultados expressos através de um índice de produção.

Dos 7 isolados de leveduras avaliados, todos foram positivos, pois apresentaram um halo em volta da colônia fúngica do patógeno *Fox-trach*, evidenciando a expressão de pelo menos um tipo de enzima. As cepas de leveduras CFS 652, CFS 699, CFS 652 e CFS 703 se destacaram por produzir o maior número de enzimas, que no caso foram a esterase, amilase, protease e lipase (Tabela 6). Quanto ao quesito qualitativo os isolados de leveduras CFS 644, CFS 696 e CFS 652 foram promissores por apresentarem um halo bem expressivo, como é

mostrado nas Figuras 8 e 9, evidenciando o potencial destes isolados de produzir enzimas hidrolíticas.

Tabela 6. Expressão do fator enzimático *in vitro* de leveduras isoladas de folhas e frutos do abacaxizeiro.

Tratamentos	Protease	Lipase	Esterase	Amilase	Pectinase
Controle	-	-	-	-	-
644	+	++	++	-	-
652	+	++	++	+	-
684	++	+	+	-	-
696	++	++	++	++	-
699	++	+	+	+	-
703	++	+	+	+	-
738	+	-	-	+	-

¹ Fenótipo positivo, caracterizado pela formação de halo enzimático discreto (+), halo enzimático expressivo (++), ou fenótipo negativo, sem halo, ou seja, implicando-a não expressão enzimática (-)

Figura 8. Placas de Petri contendo leveduras com halo enzimático para lipase e esterase. Caracterizado por um halo bastante expressivo.

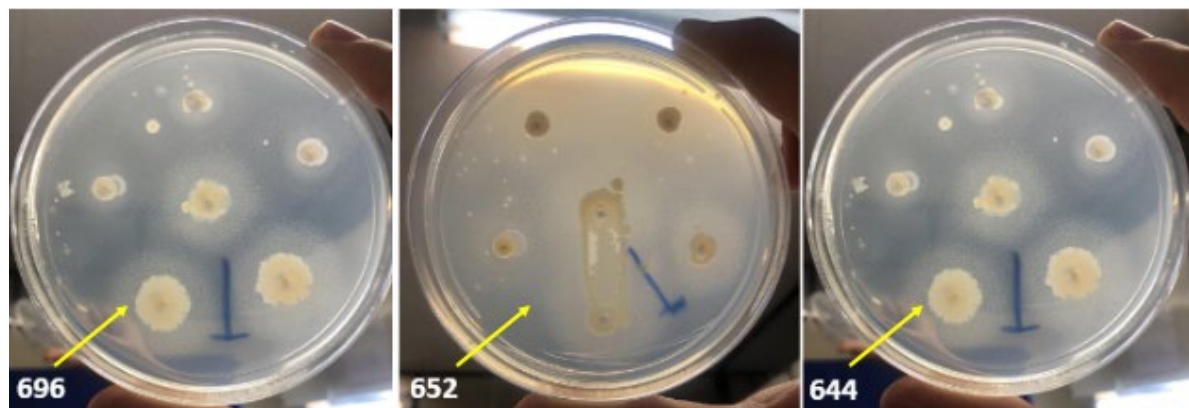


Figura 9. Placas de Petri contendo leveduras com halo enzimático para protease. Caracterizado por um halo bastante expressivo (696), halo de inibição mediana (652) e halo de baixa inibição (644).



No experimento comparativo das enzimas extracelulares em cada isolado, a enzima lipase e esterase foram as que apresentaram o índice mais significativo, pois seis, das sete cepas de leveduras avaliadas, foram capazes de produzir ambas as enzimas, como é observado na Tabela 6. As percentagens obtidas nesta pesquisa, quando comparados a produção de esterase obtida por outros autores, mostram semelhanças com Farias (2008), onde os isolados leveduriformes produziram um percentual de 70,45%.

O caráter mesófilo e térmico pode ser atribuído a ausência de desenvoltura nas leveduras para produzir ou secretar enzimas, como a pectinase. Pois a temperatura, de fato, esta entre os demais fatores que influenciam o desenvolvimento e sobrevivência dos microrganismos (SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006).

5.6. CARACTERIZAÇÃO QUANTO AO FATOR *killer*

A avaliação quanto a expressão do fenótipo *killer*, por meio de produção de toxinas inibitória ao crescimento da levedura caracterizada como sensível, constatou-se que nenhum isolado leveduriformes apresentou um halo translúcido de inibição (Tabela 7 e Figura 10).

Por mais que não seja um dos mecanismos normalmente expressos por leveduras, as toxinas *killer*, quando presente, configura-se como um formidável mecanismo, pois o resultado da ação antifúngica por *killer* pode estar associado com a ação antibiótica produzida pelas leveduras biocontroladoras, por isso é indispensável a constatação de ocorrência ou não desse mecanismo antagônico (COELHO et al., 2005).

A falta da expressão *killer*, em nossos experimentos de caracterização, nos permite inferir que este mecanismo, em relação a totalidade de células de leveduras avaliadas, não é representativo quando comparado aos demais mecanismo que podem estar presentes no leque antagônico de leveduras potencialmente biocontroladoras.

Tabela 2. Expressão¹ do fator *killer* e ação antibiótica de leveduras sobre o patógeno *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*

Isolados	Fator “Killer”
644	-
652	-
684	-
696	-
699	-
703	-
738	-

¹ Fenótipo positivo, caracterizado pela formação de halo inibidor (+), ou Fenótipo negativo, sem halo de inibição do crescimento (-);

Figura 10. Placas de Petri contendo leveduras com expressão “Killer”, caracterizado como sem halo de inibição.



5.7. AVALIAÇÃO QUANTO AO EFEITO BIOPROTETIVO EM SEMENTES

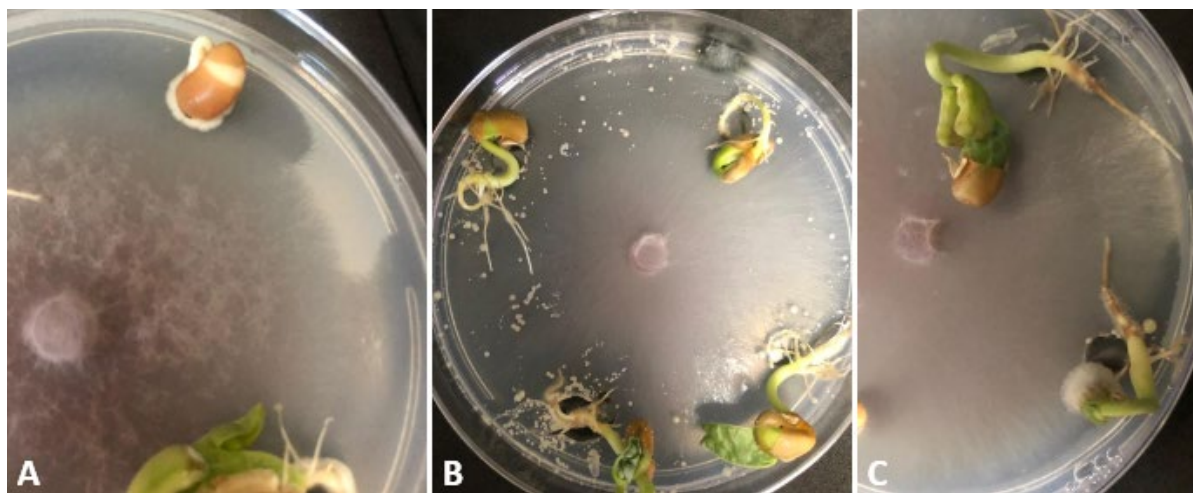
A partir dos resultados referente ao tratamento de sementes de feijão-caupi, por infestação com suspensão de células de leveduras, constatou-se que quanto a germinação das sementes nenhum dos tratamentos interferiram negativamente, mas, diferentemente dos controles, as leveduras proporcionaram aumento sobre a taxa de germinação e afetaram negativamente o crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, como é observado na Figura 11. Esses resultados reconfirma o potencial biocontrolador dos isolados

leveduriformes ao *Fox-trach*, além de indicar implicações positivas deles sobre a germinação das sementes de feijão-caupi, provavelmente pela colonização superficial nas sementes de feijão-caupi, por conta da formação de uma camada protetora à ação do *Fox-trach*.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem ser citadas como um exemplo de um sistema bioprotetivo *in vivo*. Frequentemente utilizadas como agentes de biocontrole (AKHTAR et al., 2010), essas bactérias apresentam um desenvolvimento rápido e são boas colonizadoras, de semelhante forma às leveduras. Além disso, esse gênero de bactérias compete com sucesso com outros microorganismos e produzem metabólitos secundários com alta atividade antifúngica (BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Devido os sucessos de biocontrole descrito pelo uso de algumas bactérias e da existência de semelhanças entre leveduras e bactérias antagonistas (CORREITA et al., 2009), o uso de leveduras pode ser de grande interesse na formulação de produtos antifúngicos, passíveis de serem aplicados no tratamento de doenças em sementes.

Figura 11. Placas de Petri contendo o *Fot* cultivado junto as sementes de feijão-caupi tratadas com suspensão de células leveduriformes e tiofanato metílico. Sementes tratadas com tiofanato metílico (A), ou tratadas com isolados leveduriformes (B) e sementes sem tratamento (C).

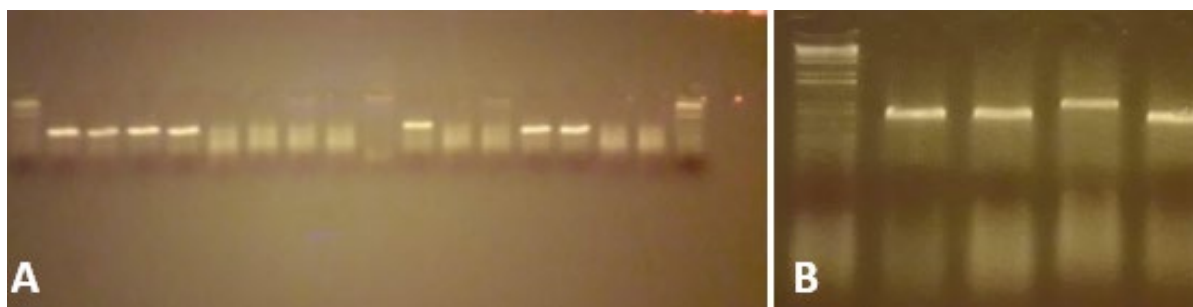


5.8. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS LEVEDURIFORMES

Os isolados de leveduras selecionados, a partir dos resultados *in vitro*, e submetê-los a extração de DNA, amplificação por PCR e purificação de amplicons, foram obtidos fragmentos, aproximadamente, entre 500 e 800pb (Figura 12).

As sequências gênicas, quando disponíveis, foram comparadas com o banco genéticos NCBI- National Center for Biotechnology Information por meio da ferramenta online de Blast, e em seguida análise de verossimilhança – AV com os isolados de leveduras de referência.

Figura 12. DNA de células leveduriformes, em duplicata, submetidos a Eletroforese(A). Isolados leveduriformes purificados (B)



6 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

ATIVIDADES	ANO											
	2018						2019					
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Obtenção de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> fs. sp. <i>tracheiphilum</i>	X	X										
Avaliação de Patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> fs. sp. <i>tracheiphilum</i>			X	X								
Obtenção de cepas de leveduras	X	X	X									
Avaliação de inibição por difusão de compostos					X	X						
Avaliação da ação de antibiose						X	X					
Avaliação da produção enzimática								X				
Avaliação de toxinas “Killer”								X				
Efeito bioprotetivo de leveduras em sementes de feijão-caupi									X	X		

Identificação de leveduras										X	X	
Preparação de Relatórios e resumos científicos											X	X
Participação em eventos científicos	X	X		X								X

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M. S.; SHAKEEL, U.; SIDDIQUI, Z.A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. **Turkish Journal of Biology**, v. 3, p. 1-7, 2010.

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, 2003.

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.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012.

BRITO, E. S. **Feijão-caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 97p.
BUCK, J. W.; ANDREWS, J. H. Role of adhesion in the colonization of barley leaves by the yeast *Rhodosporidium toruloides*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, n. 2, p. 433-440, 1999.

CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.283-286, 1963.

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, A. R.; CELLI, M. G.; ONO, E. Y. S.; WOSIACKI, G.; HOFFMANN, F. L.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. *Penicillium expansum et al versus antagonist yeasts with perspectives of application in biocontrol and patulin degradation*. **Braz Arch Biol Techn**, v. 50, p. 725–733, 2007.

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.

CORREA, O. S.; MONTECCHIA, M. S.; BERTI, M. F.; FERNÁNDEZ FERRARI, M. C.; PUCHEU, N. L.; KERBER, N. L.; GARCIA, A. F. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p. 185-194, 2009.

DIOGO, Hilda Conceição; SARPIERE, Aldo; PIRES, Mário Cezar. Preservação de fungos em água destilada. Preservação, São Paulo, 2005. PDF.

DAMASO, M. C.T.; ANDRADE, C.M.M. C.; JÚNIOR, P.N. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* ioc-4145. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 333 – 338, 2002.

DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalyses for food processes. **Food technology**., v. 45, p. 78-85, 1991.

EL-GHAOUTH. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. IN: KHACHATOURIANS GG e ARORA D K. (EDS) **Apple Mycology and Biotechnology**, v. 2. Amsterdam: Elsevier, p. 219-223.

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, n.6, 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. 2018.

FARIAS, M. V. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil**. 2008, 44 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Boa vista, 2008.

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

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 CD-ROM.

HANKIN, L., ZUCHER, M. & SANDS, D.C. Improved solid medium for detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, n. 22, p. 205-209. 1971.

HE D, ZHENG XD, YIN YM, SUN P and ZHANG, H. Y. 2003. Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. **Bot Bull Acad Sin**, v. 44, p. 211-216.

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: 02 nov. 2018.

LOODER, J. **The yeast a taxonomic study**: General classification of the yeast. 2.ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1970.

MACHADO MACF and BETTIOL W. 2010. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesqui Agropec Bras** 45: 539-545.

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** 59:488-490. 1977.

PATEL, R.N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enz. Microbial Technol.**, v. 31, p. 804-826, 2002.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2 ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573p.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 532-537, set./out. 2002.

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.

SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Laeuwenhoek**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 15-22, Dec, 1957.

SILVA NEVES, K. C.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região 76 Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 299-306, jul./set. 2006.

SINGH, R.S. Wilt of lobia in Uttar Pradesh. **Science and Culture**, v.19, n. 9, p. 454-456, 1954.

VALDEBENITO-SANHUEZA RM. 2000. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. Controle biológico, Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 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).

8 ATIVIDADES RELEVANTES DESENVOLVIDAS PELO ESTAGIÁRIO

Publicação de resumos:

- **51º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Recife/PE (27 a 30/08/2019)

VIABILIDADE DE SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI TRATADAS COM LEVEDURAS E INFESTADAS COM *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (Viability cowpea seeds treated with of yeast and infested with *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*)
igor.alexander.melo@gmail.com

IGOR ALEXSANDER MELO PIMENTEL
TIAGO BEZERRA TORRES
LETÍCIA REBECA DE ARAÚJO
ODAIZA FABIANA GOMES FERREIRA
THÁÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA
JULIANNE MARIA GALINDO BEZERRA
IWANNE LIMA COELHO
DELSON LARANJEIRA

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* EM FEIJÃO-CAUPI (Methods of inoculation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* on cowpea)
euleticiabarros@gmail.com

LETÍCIA REBECA DE ARAÚJO
ODAIZA FABIANA GOMES FERREIRA
TIAGO BEZERRA TORRES
IGOR ALEXSANDER DE MELO PIMENTEL
JACKELINE ARAÚJO MOTA SIQUEIRA
IWANNE LIMA COELHO
DELSON LARANJEIRA

PRODUÇÃO DE ESTERASE POR LEVEDURAS NATIVAS DE TECIDOS VEGETAIS (Production of esterase by native yeasts of plant tissue)
juliannemaria1@gmail.com

JULIANNE MARIA GALINDO BEZERRA

SÉRGIO BATISTA RAMOS
MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA
THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA
IGOR ALEXSANDER DE MELO PIMENTEL
JACKELINE ARAÚJO MOTA SIQUEIRA
IWANNE LIMA COELHO
DELSON LARANJEIRA

- 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Maceió/AL (6 a 9/10/2019)

PATHOGENICITY AND SEVERITY OF RHIZOCTONIA SOLANI IN COWPEA
julianmemaria1@gmail.com

JULIANNE MARIA GALINDO BEZERRA
SÉRGIO BATISTA RAMOS
MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA
IGOR ALEXSANDER DE MELO PIMENTEL
ODAIZA FABIANA GOMES FERREIRA
THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA
IWANNE LIMA COELHO
DELSON LARANJEIRA

- XXX Congresso de Iniciação Científica da UFRPE, Recife/PE (12 a 13/11/2019)

METABÓLITOS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS NO DESENVOLVIMENTO DE
Fusarium FITOPATOGÊNICO AO FEIJÃO-CAUPI
igor.alexander.melo@gmail.com

IGOR ALEXSANDER DE MELO PIMENTEL
TIAGO BEZERRA TORRES
THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA
IWANNE LIMA COELHO
DELSON LARANJEIRA

- XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, Recife/PE (16 a 18/10/2018)

SÍNTESE DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR LEVEDURAS POTENCIALMENTE
BIOCONTROLADORAS DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO
igor.alexander.melo@gmail.com

IGOR ALEXSANDER MELO PIMENTEL
TARCIANA SILVA DOS SANTOS
ODAIZA FABIANA GOMES FERREIRA
AILTON DA SILVA ESTRELA JÚNIOR
THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA
DELSON LARANJEIRA

BIOFILME E COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS DO ABACAXIZEIRO

igor.alexander.melo@gmail.com

IGOR ALEXSANDER MELO PIMENTEL
TARCIANA SILVA DOS SANTOS
LETÍCIA REBECA DE ARAÚJO BARROS
MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA
IWANNE LIMA COELHO
DELSON LARANJEIRA

ASPECTOS DE BIOCONTROLE DE LEVEDURAS SOBRE O AGENTE CAUSAL DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

igor.alexander.melo@gmail.com

IGOR ALEXSANDER MELO PIMENTEL
TARCIANA SILVA DOS SANTOS
SÉRGIO BATISTA RAMOS
TIAGO BEZERRA TORRRES
AILTON DA SILVA ESTRELA JÚNIOR
DELSON LARANJEIRA

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Fusarium guttiforme* EM ABACAXI

euleticiabarros@gmail.com

LETÍCIA REBECA DE ARAÚJO BARROS
TARCIANA SILVA DOS SANTOS
IGOR ALEXSANDER MELO PIMENTEL
MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA
TIAGO BEZERRA TORRRES
DELSON LARANJEIRA

LEVEDURAS E SUA APTIDÃO QUANTO A PRODUÇÃO DE BIOFILME

sergiobaptistaramos@gmail.com

SÉRGIO BATISTA RAMOS
IGOR ALEXSANDER MELO PIMENTEL
THAÍS REGINA PINTINO DE ALMEIDA
IWANNE LIMA COELHO
TARCIANA SILVA DOS SANTOS
DELSON LARANJEIRA

Menção Honrosa:

-XXXIX Congresso Iniciação Científica – CIC, UFRPE, Recife/PE (12 a 13/11/2019)

PROSPECÇÃO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES POTENCIALMENTE BIOCONTROLADORES A MURCHA-DE-FUSÁRIO EM FEIJÃO-CAUPI

igor.alexander.melo@gmail.com

IGOR ALEXSANDER DE MELO PIMENTEL

Participação em curso:

- **I Curso Extração de DNA, PCR e Eletroforese aplicadas ao estudo de fungos fitopatogênicos**, promovido pelo Programa de Pós- Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, em Recife-PE, ministrado pela **Dra. Ana Paula Oliveira de Barros** e pela **Dra. Iwanne Lima Coelho**, no período de 25 a 29 de novembro de 2019.

9 DIFICULDADES ENCONTRADAS

Não foram significativas as dificuldades para realização das atividades previstas.

10 PARECER DO ORIENTADOR

O bolsista Igor Alexsander de Melo Pimentel apresentou ótimo desempenho acadêmico e científico, demonstrando avanços progressivos durante o desenvolvimento do seu plano de trabalho. Em todas as etapas, ele demonstrou interesse pela pesquisa, realizando suas atribuições com responsabilidade. Vale salientar a dedicação, a facilidade de convívio e entrosamento com a equipe LAFSOL.

Recife, 2020

Assinatura do Orientador

Assinatura do Aluno