



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Potencial de leveduras no biocontrole da
resinose do coqueiro, causada por
*Ceratocystis paradoxa***

Iwanne Lima Coelho

**Recife – PE
2013**

IWANNE LIMA COELHO

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA RESINOSE DO
COQUEIRO, CAUSADA POR *Ceratocystis paradoxa***

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: Delson Laranjeira

Co-Orientadores: Luiz Gonzaga Biones Ferraz e Rejane Pereira Neves

**RECIFE-PE
JULHO – 2013**

Ficha Catalográfica

C672p Coelho, Iwanne Lima
Potencial de leveduras no biocontrole da resinose do coqueiro, causada por *Ceratocystis paradoxa* / Iwanne Lima Coelho. -- Recife, 2013.
58 f.: il.

Orientador: Delson Laranjeira.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2013.
Inclui referências.

1. *Candida dosseyi* 2. *Ceratocystis paradoxa* 3. Coqueiro-anão-verde 4. Manejo integrado 5. *Pichia guilliermondii* 6. *Thielaviopsis paradoxa* I. Laranjeira, Delson, orientador II. Título

CDD 632

**POTENCIAL DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA RESINOSE DO
COQUEIRO, CAUSADA POR *Ceratocystis paradoxa***

IWANNE LIMA COELHO

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 30/07/2013.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Luiz Gonzaga Biones Ferraz (IPA)

Prof. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

Dra. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho (UFRPE)

**RECIFE-PE
JULHO – 2013**

A Deus, que desde os primeiros passos guiou-me por todos os caminhos, sempre me mostrando que não existem vitórias ou conquistas sem que haja uma batalha.

Aos meus pais, Ivanildo e Heliane, que foram os primeiros a acreditarem em mim e jamais deixaram de apoiar meus sonhos.

DEDICO

Ao meu namorado, Gerson Moreira Barros, que foi meu braço direito por “horas a fio” em todas as etapas experimentais e que esteve ao meu lado tanto nos bons quanto maus momentos.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para o alcance deste degrau.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo cuidado, amparo, força, amor, direção, paciência e livramentos concedidos, permitindo minha existência e meu trajeto por esse caminho.

Aos meus pais, Ivanildo e Heliane, pelos ensinamentos, amor, incentivo, apoio e confiança. Eles são a razão de tudo o que sou.

Aos meus orientadores Dr. Delson Laranjeira, Dr. Luiz Gonzaga Biones Ferraz e Dra. Rejane Pereira Neves pela orientação, ensinamentos, apoio e paciência.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE e ao Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA pelo apoio institucional e à Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus irmãos, Susianne e Ivanildo pelo amor, apoio, incentivo e orações.

Ao meu namorado, Gerson que esteve ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio, carinho e confiança.

A todos os meus familiares que sempre demonstraram desejos positivos e torceram pelo meu sucesso.

Às minhas amigas Caroline, Juliana, Tamiris, Emmannuele e Viviane pelo companheirismo e auxílio em todos os momentos.

À Rejane Costa pela amizade e apoio incondicional ao desenvolvimento das atividades.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelas contribuições necessárias à minha formação.

Ao Prof. Dr. Manoel Guedes e aos amigos Igor Tenório, Celma Peixoto, Geane Fontes, Elaine Almeida e Antônio Neto pela contribuição com material vegetal utilizados neste trabalho.

Às Dras. Célia Tremacoldi, Iris Lettiere, Alessandra Boari e Tereza Cristina de Assis, pelos ensinamentos, amizade, carinho, paciência, auxílios e, principalmente, por encaminharem meus primeiros passos na fitopatologia.

Às Dras., Luciana Sartori (IPA) e Regina Ceres (IPA) pelo apoio e auxílio.

Ao Técnico Fábio Teixeira (IPA), pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

Ao Sr. Mário Leandro da Silva (IPA), pela contribuição nas atividades realizadas no telado do IPA.

*Porque Deus é quem efetua em vós tanto o
querer como o realizar, segundo sua boa
vontade.*

Filipenses 2:13

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	ix
GENERAL ABSTRACT	x
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
1. IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO COQUEIRO	2
2. A RESINOSE DO COQUEIRO	4
3. MANEJO E CONTROLE DA RESINOSE DO COQUEIRO	7
3.1. MEDIDAS PREVENTIVAS	7
3.2. MEDIDAS CURATIVAS	7
3.3. CONTROLE ALTERNATIVO	8
3.4. CONTROLE BIOLÓGICO	9
4. LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO II	23
Seleção de leveduras com potencial biocontrolador da resinose do coqueiro	24
Resumo	25
Introdução	26
Material e Métodos	28
Obtenção e cultivo de leveduras	28
Patogenicidade de <i>C. paradoxa</i>	28
Seleção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de leveduras com potencial antagônico a <i>C. paradoxa</i>	29
Avaliação de mecanismos antagônicos de leveduras sobre isolados de <i>C. paradoxa</i>	30
Identificação de leveduras e <i>C. paradoxa</i>	31
Análises estatísticas	33
Resultados	33
Discussão	39
Agradecimentos	42
Referências	42
CONCLUSÕES GERAIS	47

RESUMO GERAL

A ocorrência da resinose, causada por *Ceratocystis paradoxa* (Anamorfo: *Thielaviopsis paradoxa*), compromete a produtividade do coqueiro-anão-verde e representa ameaça para toda a cadeia produtiva do coco-verde. Não há registros no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) de fungicidas para o manejo dessa doença, o uso indiscriminado do fungicida tiofanato metílico pode resultar no surgimento de linhagens patogênicas resistentes, contaminação ambiental e à saúde humana. O controle biológico utilizando-se leveduras, promissores agentes de biocontrole, pode representar uma solução eficiente e aplicável quando agregada ao manejo da cultura. Não foram recuperados trabalhos sobre leveduras no controle do agente causal dessa enfermidade, assim como estudos referentes ao seu controle em campo. O trabalho teve por objetivo selecionar leveduras, obtidas de frutos do coqueiro-anão-verde, com potencial para o biocontrole da resinose do coqueiro, em mudas de coqueiro-anão-verde. Trinta e sete leveduras, isoladas de cocos imaturos, foram avaliadas *in vivo* quanto ao potencial de redução dos sintomas de resinose em mudas de coqueiro-anão-verde, acondicionadas em telado sob 40 ± 2 °C e 60% UR, por dois métodos de aplicação: aspersão (10 mL de 1×10^7 células mL⁻¹) e injeção (1 mL de 1×10^7 células mL⁻¹); e *in vitro* (28 ± 2 °C, 12 h fotoperíodo), quanto inibição de crescimento micelial, ação de metabólitos voláteis, parasitismo, antibiose e atividade “killer”. Quinze cepas de leveduras, reduziram *in vivo* o percentual de área lesionada por *C. paradoxa* isolado de Moju-PA. *In vitro*, os isolados identificados como *Pichia guilliermondii* (LEV 25) e *Candida dosseyi* (LEV 47), destacaram-se como os antagonistas potencialmente promissores, pois inibiram o diâmetro de crescimento micelial, competindo por espaço e nutrientes, e reduziram a produção de conídios, pela ação de metabólitos voláteis sobre os isolados patogênicos de Moju-PA, Neópolis-SE e da Sousa-PB. Este é o primeiro relato da redução dos sintomas de resinose em mudas de coqueiro-anão-verde pela ação antagônica de leveduras sobre *C. paradoxa*. Os isolados de *P. guilliermondii* e *C. dosseyi* apresentam potencialidade como componente do manejo integrado da resinose do coqueiro.

Palavras-chaves: *Candida dosseyi*, *Ceratocystis paradoxa*, coqueiro-anão-verde, manejo integrado, *Pichia guilliermondii*, *Thielaviopsis paradoxa*

GENERAL ABSTRACT

The occurrence of stem bleeding, caused by *Ceratocystis paradoxa* (Anamorphic: *Thielaviopsis paradoxa*), compromises the productivity of green dwarf coconut and poses a threat to the entire production chain of green coconut. There are no fungicides registered in the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) for the management of this disease, the indiscriminate use of the fungicide thiophanate methyl may result in the emergence of resistant pathogenic strains, environmental contamination and to human health. Biological control using yeast, promising biocontrol agents, may represent an efficient and applicable solution when aggregated to crop management. Work on yeasts not recovered in control of the causal agent of this disease, as well as studies related to its field control. The study aimed to select yeasts from fruits of the green dwarf coconut, with potential for biocontrol of stem bleeding coconut on the seedlings of green dwarf coconuts. Thirty-seven yeasts, isolated from immature coconuts, were evaluated *in vivo* for their potential to reduce the symptoms of stem bleeding in seedlings of green dwarf coconuts, packed in a greenhouse under 40 ± 2 ° C and 60 % RH, for two methods of application: spray (10 mL de 1×10^7 cells mL^{-1}) and injection (1 mL de 1×10^7 cells mL^{-1}); and *in vitro* (28 ± 2 °C, 12 h photoperiod), as for inhibition of mycelial growth, volatile metabolic action, parasitism, antibiosis and "killer" activity. Fifteen yeast strains *in vivo* reduced the percentage of the area damaged by *C. paradoxa* isolated Moju - PA. *In vitro*, the isolates identified as *Pichia guilliermondii* (LEV 25) and *Candida dosseyi* (LEV47), stood out as potentially promising antagonists, because of the diameter of the inhibited mycelial growth, competing for space and nutrients, and reduced production of conidia by the action of volatile metabolites on pathogenic isolates of Moju - PA, Neópolis- SE and Sousa -PB. This is the first report of reduction of the symptoms of stem bleeding in seedlings of green dwarf coconuts by the antagonistic action of yeast on *C. paradoxa*. The isolates of *P. guilliermondii* and *C. dosseyi* have potential as a component of integrated management of coconut stem bleeding

Keywords: *Candida dosseyi*, *Ceratocystis paradoxa*, green dwarf coconut, integrated management, *Pichia guilliermondii*, *Thielaviopsis paradoxa*

CAPÍTULO I

Introdução Geral

TÍTULO DO TRABALHO: POTENCIAL DE LEVEDURAS NO BIOCONTROLE DA RESINOSE DO COQUEIRO, CAUSADA POR *Ceratocystis paradoxa*

INTRODUÇÃO GERAL

1. IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO COQUEIRO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L) é uma planta de clima tropical, de origem Asiática, que foi introduzida ao Brasil pelos portugueses em 1553 (GOMES, 1977). Os primeiros exemplares foram da variedade gigante, oriundos da Ilha de Cabo Verde, e se disseminaram a partir do litoral baiano para toda a faixa costeira nordestina. A partir de 1925 e 1939 foram introduzidos coqueiros da variedade anã, provenientes de Java e do norte da Malásia respectivamente (SIQUEIRA et al., 1997).

Essa planta é considerada uma das fruteiras mais importantes do mundo por desempenhar elevado papel social e econômico para os países da faixa tropical do globo, especialmente para as populações de baixa renda. A produção contínua do coqueiro é fator estabilizador no tocante à geração de emprego e renda nos três segmentos da cadeia produtiva do coco, abastecendo ininterruptamente o mercado consumidor (FONTES; WANDERLEY, 2006; WARWICK; PASSOS, 2009).

Em 2008, a produtividade mundial de coco foi de 60,7 milhões de toneladas em uma área cultivada de 11,2 milhões de hectares, sendo cerca de 80% situada na Ásia e o restante distribuída entre África, América Latina, Oceania e Caribe. A Indonésia é o maior produtor mundial de coco, seguido por Filipinas e Índia, com produção de 19.500.000, 15.319.500 e 10.894.000 mil toneladas de coco respectivamente (FAO, 2011).

No Brasil, grande parte da produção de coco está direcionada para o consumo *in natura* e/ou industrialização de alimentos, com mais de 100 produtos e subprodutos, tais como o leite de coco e coco ralado (HOLANDA et al., 2008), diferentemente de outros países, em que o principal produto é o óleo de coco (CUENCA, 1997).

A potencialidade da exploração econômica do coqueiro não se resume ao aproveitamento da água e do albúmen. Outras partes do coqueiro também são utilizadas, para as mais diversas finalidades, como por exemplo: a casca dos frutos para a extração de fibras de diferentes comprimentos utilizadas na fabricação de diversos artigos que variam desde vestuário, peças decorativas a componentes de bancos utilizados na indústria automobilística (CUENCA, 1997) e mesocarpo, raízes, estipe, inflorescência e folhas, como subprodutos ou

derivados de interesse econômico, empregados no mercado paisagístico (FERREIRA et al., 1998).

A produção nacional, em 2011, foi da ordem de dois bilhões de frutos em 271.633 ha de área plantada (IBGE, 2011a), ou seja, 4,54% da produção mundial de coco, produção que confere ao Brasil o 4º lugar no ranking mundial (FAO, 2011). As regiões Norte e Nordeste do país participam na formação do valor bruto da produção agrícola nacional (FONTES; WANDERLEY, 2006; WARWICK; PASSOS, 2009), representadas pelos estados da Bahia (529.464.000 frutos/ano), maior produtor, seguido por Ceará (274.092.000 frutos/ano), Sergipe (239.373.000 frutos/ano) e Pará (229.080.000 frutos/ano) (IBGE, 2011b).

O coqueiro-anão-verde é recomendado preferencialmente para a produção de água (FERRAZ et al., 2009a), pois possui maior precocidade produtiva e qualidades sensoriais superiores em relação à água proveniente de frutos das demais cultivares. Além disso, também é empregado, em menor escala, nas agroindústrias alimentícias.

Para Fontes e Wanderley (2006), o aumento de áreas de plantio e a implantação de novas áreas, são reflexo do crescente aumento na demanda do mercado de água de coco. Esta, por sua vez, é impulsionada pela inclusão de hábitos saudáveis na população brasileira, haja vista que esta bebida natural possui inúmeras propriedades como de repositores eletrolítico, vitamínica, energética e proteica (CARVALHO et al., 2006; MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011).

Segundo Martins e Jesus Júnior (2011), o mercado informal de água de coco no Brasil é responsável por 80% do volume deste produto consumido no país. Nas áreas de medicina, biotecnologia, nutrição e outras tem-se o registro de consumo em torno de 100 a 350 milhões de litros/ano. Para Carvalho et al. (2006), o emprego desta demanda engloba os estudos voltados à conservação de sêmen; longevidade de células; cultura de tecidos; meios artificiais para microrganismos, células vegetais como embriões e pólen e obtenção de vacinas.

Referindo-se a dados da Associação das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas (ABIR), em 2004, Martins e Jesus Júnior (2011) informam que o consumo nacional de água de coco envasada industrialmente foi de, aproximadamente, 22 milhões de litros. Segundo Silva (2006), o consumo nacional foi da ordem de 70 milhões de litros de água de coco envasada industrialmente e Carvalho et al. (2006), acusa o progressivo aumento no interesse e investimento de produtores nesse cultivo devido ao constante aumento da demanda desse produto pelos países importadores, principalmente nos períodos mais quentes.

Entre os anos de 2005 e 2009, os maiores importadores de coco brasileiro - Turquia, Egito e Argentina, importaram uma média de 262,56; 220,76 e 127,40 toneladas, respectivamente, de coco fresco e seco (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011).

No Brasil, apesar de fatores favoráveis à produção de água de coco, esta tem sido limitada para cerca de 3.400 frutos por hectare, devido aos baixos índices pluviométricos e à incidência de pragas e doenças (WARWICK; PASSOS, 2009). Este cenário contrasta com o potencial de produção superior a 200 frutos/planta/ano do coqueiro-anão, quando se dispensa ao coqueiral, irrigação e manejos adequados, podendo assim ultrapassar 300 frutos/planta/ano (FERRAZ et al., 2009^a, 2009b), com isto, alcançando mais de 40.000 frutos/ha/ano.

O Nordeste, apesar de representar a maior contribuição na produção bruta nacional de coco, possui a menor produtividade em relação às demais regiões produtoras. Em número de cocos/ha, os estados da Bahia (5.810), Ceará (5.970) e Sergipe (6.640) apresentam a menor produtividade, quando comparados aos do Pará (10.100), Espírito Santo (14.830) e Rio de Janeiro (16.190). Este reflexo da baixa produtividade nordestina e, conseqüentemente, da redução da qualidade de frutos colhidos, advém do déficit hídrico, da baixa fertilidade natural dos solos, não adoção de práticas de manejo cultural e incidência de pragas e doenças (FONTES; WANDERLEY, 2010; MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011).

2. A RESINOSE DO COQUEIRO

São várias as doenças que acometem a cultura do coqueiro, como a lixa grande e lixa pequena, causadas respectivamente por *Camarotella costaricensis* (F. Stevens) K.D. Hyde e P.F. Cannon, 1999) (Sinônimo: *Sphaerodothis acrocomiae* (Mont.) Arx e E. Müll. 1954) e *Camarotella torrendiella* (Bat.) J.L. Bezerra e Vitória, 2008 (Sinônimo *Phyllachora torrendiellae* (Bat.) Subileau, Renard e Denet. 1993) (LEAL; WARWICK, 2000), anel-vermelho e murcha-de-fitomonas, causados respectivamente pelo nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, 1989 (WARWICK, 2005) e pelo protozoário *Phytomonas staheli* McGhee e McGhee (ARAÚJO et al., 2003), queima das folhas, causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl, 1909 (CORREIA; COSTA, 2005) e a resinose do coqueiro, também conhecida como “stem bleeding”, causada pelo fungo *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Höhn, teleomorfo de *Thielaviopsis paradoxa* (NAMBIAR et al., 1986, 1989).

A resinose é uma das principais doenças do coqueiro no mundo. Esta assertiva está associada à sua letalidade para o coqueiro e as mais diversas formas de disseminação, como

por exemplo: água proveniente de chuvas e irrigação por aspersão; pragas como as brocas, principalmente *Rhynchophorus palmarum*; mudas, solo e ferramentas infestadas; entre outras (COSTA-CARVALHO, 2011). A resinose foi primeiramente relatada no Sri Lanka, em 1906, onde se observou a incidência sobre 80.000 plantas afetadas em uma área plantada com 440.000 coqueiros (PETCH, 1907). Posteriormente, disseminou-se para diversos países produtores (LILY, 1984) tais como Índia e Filipinas, em 1922; Ilhas Adaman, em 1929; Flórida, em 1959; Norte de Miami, em 1966; Palm Beach, em 1967; China, em 2009; entre outros (ALFIERI JR., 1967; TZENG; SUN, 2010; YU et al., 2012a). Além do coqueiro, a doença é citada como incidente em outras palmeiras no Havaí, Filipinas, Tailândia, Itália, Colômbia e México (ÁLVAREZ et al., 2012; FONTES et al., 2009a; POLIZZI et al., 2007).

Apesar de constituir grave problema para coqueirais de outros países, a resinose não chegava a preocupar os produtores de coco brasileiros. Lira (1990), em levantamento da micoflora do coqueiro no Nordeste, não registrou a presença desse patógeno em coqueirais de Pernambuco, em especial na Zona da Mata do estado. Todavia, atualmente, essa enfermidade tem estado no topo das preocupações desses agricultores e dos órgãos de pesquisa e extensão rural do Brasil, devido ao aumento da incidência sobre coqueiro-anão e a sua velocidade de expansão (COSTA-CARVALHO et al., 2011b; WARWICK; PASSOS, 2009) e registro recente nessa microrregião (FERRAZ et al., 2012).

Em fevereiro de 2004, a resinose foi registrada infectando mais de 50 coqueiros, no platô de Neópolis – Sergipe, que apresentavam sintomatologia de exsudação no tronco, até então não registrada (WARWICK; PASSOS, 2009). A partir deste momento, a doença tem se disseminado rapidamente com registros de ocorrência nos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco (FONTES et al., 2009a), Ceará (FREIRE; MARTINS, 2010), Paraíba, Rio Grande do Norte (FERREIRA et al., 2007) e Pará (TREMACOLDI; LINS, 2011), provocando forte queda na produção nacional e prejuízos para os produtores de coco.

A fase imperfeita ou assexual do patógeno é *T. paradoxa* (COSTA-CARVALHO et al., 2011a, 2011b; NAMBIAR et al., 1986; NAMBIAR et al., 1989), que apresenta a produção de dois tipos de esporos, os aleuriosporos e fialosporos (BACHILLER; ILAG, 1998a; BARNETT; HUNTER, 1999) e de estrutura de sobrevivência no solo chamada de clamidósporos (COSTA-CARVALHO et al., 2011a, 2011b; ELLIOTT, 2006). A fase sexual ou perfeita é denominada de *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau, (1952) (Ascomycetes, Microascales, família Ophiostomatacea), raramente encontrada na natureza, no entanto relatada por Ferraz et al. (2012), que constataram, por meio de observação microscópica,

estruturas de *C. paradoxa*, tanto em fragmentos de amostras sintomáticas quanto em cultivo *in vitro* proveniente do isolamento indireto dessas mesmas amostras.

A sintomatologia da doença é caracterizada pela exsudação de um líquido marrom-avermelhado, evoluindo para uma coloração marrom escuro ou enegrecida, que escorre entre as rachaduras presentes no estipe. Internamente, observam-se lesões provenientes do apodrecimento do tecido (COSTA-CARVALHO et al., 2011b; WARWICK; PASSOS, 2009). Além destes sintomas, ocorre redução da frequência de emissão e tamanho de folhas; estreitamento do estipe na região próxima à copa, e folhas amarelo-pardacentas frágeis, sujeitas a quebra (COSTA-CARVALHO et al., 2011a; FERREIRA et al., 2007; HOLANDA et al, 2008; TREMACOLDI; LINS, 2011; WARWICK; PASSOS, 2009). Tzeng e Sun (2010) e Pinho et al. (2013), relataram a ocorrência da podridão basal de cocos, no Taiwan, e podridão pós-colheitas em frutos imaturos, no Brasil, causada por *T. paradoxa*.

As palmeiras, em geral, são susceptíveis à doença, favorecendo o aumento da fonte de inóculo (ELLIOTT, 2006; FERREIRA et al., 2007). Fatores como a ocorrência de chuvas fortes após longos períodos de estiagem; precipitação elevada; excesso de umidade na base do estipe da planta; desequilíbrio nutricional da planta; excesso de salinidade no solo; tipo de manejo quanto a adubação orgânica e sistema de irrigação; a incidência de pragas, principalmente as brocas como a broca-do-olho (*R. palmarum*), inseto este envolvido tanto na disseminação da resinose como do “anel-vermelho do coqueiro” (COSTA-CARVALHO et al., 2011b; FONTES, et al., 2009b; WARWICK; PASSOS, 2009), são considerados agravantes quanto à incidência e/ou severidade neste patossistema.

Segundo Nambiar et al. (1989), o efeito sazonal sobre a ocorrência da resinose, temperaturas amenas e a prevalência de alta umidade favorecem a incidência da doença em plantas mais jovens e o maior declínio de plantas sintomáticas, independentemente da idade da planta.

No estudo realizado por Mathew e Ramanandan (1980), verificou-se que não houve correlação direta entre o pH e a condutividade elétrica de solos, provenientes de áreas afetadas pela resinose, com a incidência da doença em coqueiros. No entanto, isso não significa que estes fatores não possam influenciar a sobrevivência do patógeno no solo, uma vez que o fungo *T. paradoxa* pode sobreviver por longos períodos no solo, nos restos de cultura em decomposição e pode causar infecção por meio de ferimentos e das fissuras naturais de crescimento do tronco, disseminando-se principalmente por meio de insetos vetores, como *R. palmarum*, do contato entre raízes, solo e ferramentas contaminadas (COSTA-CARVALHO

et al., 2011a, 2011b; FONTES et al., 2009b; HOLANDA et al., 2008; NAMBIAR et al., 1986; WARWICK; PASSOS, 2009).

3. MANEJO E CONTROLE DA RESINOSE DO COQUEIRO

3.1. MEDIDAS PREVENTIVAS

As medidas de prevenção observadas no Brasil e demais países incidentes, a fim de evitar a disseminação do patógeno, inclui monitoramento, por meio do uso de armadilhas atrativas (isca vegetal + feromônio), e controle químico de insetos vetores (WARWICK; PASSOS, 2009); evitar ferimentos no estipe das palmeiras durante os manejos; evitar deposição e acúmulo de tecido vegetal contaminado no solo (por ocasião do corte ou raspagens de áreas lesionadas); não utilizar irrigação tipo aspersão direcionada ao estipe; evitar podas desnecessárias (ELLIOTT, 2006); efetuar assepsia de material utilizado na retirada de tecidos sintomáticos, de plantas afetadas pela resinose, com imersão por 10 minutos em solução de cloro a 25%, álcool a 50% ou amônia quaternária a 5% e posterior lavagem com água limpa (NELSON, 2005).

3.2. MEDIDAS CURATIVAS

O controle da doença, no estágio inicial, consiste na raspagem e/ ou corte circular dos tecidos afetados, seguido de aplicação do fungicida tiofanato metílico (330 g i.a./100 L de água, adicionado de 500 g de uréia, 200 g de cloreto de potássio e 200 g de cloreto de sódio) (FERREIRA et al., 2007; TREMACOLDI; LINS, 2011). As áreas do estipe tratadas devem ser cobertas com piche ou alcatrão vegetal, para evitar a liberação de odores fermentativos que possam atrair insetos vetores e/ou disseminadores, bem como auxiliar na cicatrização do tecido (FERREIRA et al., 2007). Em casos de infecção severa, as plantas devem ser erradicadas, mecanicamente ou quimicamente, para evitar pontos de proliferação de inóculo (FONTES et al., 2009a; WARWICK; PASSOS, 2009).

O fungicida tiofanato metílico, pertencente ao grupo do benzimidazóis, possui ação sistêmica e seletiva. Especificamente, atuam no processo de divisão celular de fungos, interrompendo a formação da placa metafásica durante o processo mitótico (REIS et al., 2007). Por possuir esta ação seletiva, os fungicidas pertencentes a este grupo, quando utilizados inadequadamente e de forma contínua, resultam em uma forte pressão de seleção da

população patogênica e, conseqüentemente, o surgimento de linhagens resistentes (SILVA; MELO, 1997).

Alguns trabalhos *in vitro* têm sido realizados objetivando verificar a eficiência de fungicidas, com princípios ativos como tebuconazol, tiofanato metílico, fluazinam, tiabendazole, difeconazole e azoxistrobina, capazes de promover o controle de *T. paradoxa* (TREMACOLD; LINS, 2011; TALAMINI et al., 2012). No entanto não há relatos de estudos avaliando a eficiência desses produtos na resinose em campo.

Não existem defensivos químicos registrados para o controle e/ou cura da resinose em plantas com sintomas avançados (MAPA: AGROFIT, 2012) ou impedir a disseminação do patógeno (FONTES et al, 2009a). Desta forma, o uso indiscriminado de agroquímicos, na tentativa de controle da doença, pode acarretar diversos problemas ambientais e na saúde humana em virtude da contaminação dos alimentos, água e solo, além de onerar os custos de produção do coco, acarretando mais prejuízos aos produtores. Assim, métodos alternativos de prevenção e controle da doença, tais como o controle biológico e controle alternativo, agregados ao manejo adequado da cultura, podem representar uma solução eficiente e aplicável e ambientalmente sustentável (MORAIS, 2009).

3.3. CONTROLE ALTERNATIVO

Extratos brutos ou óleos essenciais, obtidos de uma gama de plantas medicinais, têm sido amplamente estudados acerca de seu potencial antifúngico, seja pela inibição de crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos, seja pela indução de fitoalexinas que indicam a presença de compostos elicitores, como no caso das espécies botânicas do gênero *Lipia*, que propiciam óleos essenciais com atividade antimicrobiana em virtude da presença de compostos como timol e carvacrol (COSTA-CARVALHO, 2011). Além disso, esses metabólitos secundários, com atividade antifúngica, podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos defensivos naturais ou como precursores na síntese de produtos químicos (MORAIS, 2009)

Em trabalhos *in vitro* com óleos de *L. gracillis*, arbusto silvestre pertencente à família Verbenaceae, em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) sobre o crescimento micelial e esporulação *in vitro* de *T. paradoxa*, verificou-se efetivo controle a partir de 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (COSTA-CARVALHO et al, 2013).

3.4. CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico desempenhado por organismos antagonistas tem sido considerado promissor no manejo de inúmeras doenças (YU et al., 2012b). Atualmente, muitos são os agentes fúngicos, disponíveis em formulações registradas, que atuam como agentes de biocontrole nos mais diversos patossistemas (FRAVEL et al., 1998; BUTT et al., 2001).

Sánchez et al. (2007), estudando o antagonismo *in vitro* de *Trichoderma longibrachiatum* sobre *Thielaviopsis paradoxa*, verificaram que houve micoparasitismo por meio de produção de enzimas extracelulares que degradaram células do patógeno e pela produção de metabólitos não voláteis, difundidos no meio de cultura.

As leveduras são consideradas promissoras agentes de biocontrole, principalmente a fungos fitopatogênicos por apresentarem diversos mecanismos antagônicos aos mesmos tais como: competição por nutrientes e espaço, ação micoparasítica, produção de substâncias antibióticas e/ou degradadoras da parede celular do patógeno, além de apresentarem possível atuação como indutoras de resistência nas plantas (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

4. LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

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) (FUENTEFRÍA, 2007). São integrantes da microbiota epifítica, endofítica, que ocupam, comumente, a superfície das folhas, casca, frutas, flores, tecidos necróticos, solo e a rizosfera. São considerados promissoras agentes de biocontrole, pois podem competir por nutrientes, colonizar ferimentos, desempenhar ação micoparasítica, produzir substâncias antibióticas e/ou degradadoras da parede celular e induzir resistência nas plantas contra agentes patogênicos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000; VIANA et al, 2012).

Para El-tarabily e Sivasithamparam (2006), em estudos sobre leveduras que apresentam mecanismos de biocontrole, se destacam os gêneros *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Metschnikowia*, *Tilletiopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Pichia* e *Candida*. Pertencentes a estes,

destacam-se as espécies *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud; *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner e *Metschnikowia fructicola* Kurtzman e Droby) que são registradas, em muitos países, como agentes de biocontrole de fitopatógenos como *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Sclerotinia* e *Erwinia amylovorai* (Burrill) Winslow.

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 (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Diversos autores demonstram que, além da ação competitiva em relação a fungos fitopatogênicos, principalmente no biocontrole preventivo de frutos em pré-colheita (ZHAO et al., 2011) e em pós-colheita (BELLO et al., 2008; CHANCHAICHAOVIVAT et al, 2008; COELHO et al. 2011; HAÏSSAM, 2011; LAHLALI et al., 2011; MASIH et al., 2001; YU et al., 2012b; ZHANG et al., 2011), certos gêneros de leveduras podem se manter viáveis em diversas condições de estresse (ROBIGLIO et al., 2011; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

Apesar de não haver relatos minuciosos sobre a gama e natureza da maioria das substâncias antibióticas produzidas por leveduras, sabe-se que esses compostos desempenham importante papel no estabelecimento e manutenção de comunidades de leveduras em diversos ambientes, como por exemplo, acetato de etila, produzido por *Pichia anomala* (E.C. Hansen) Kurtzman 1984, capaz de reduzir o crescimento micelial e germinação de esporos de diversos fungos fitopatogênicos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). Os ácidos heptadecenoic e metil-heptadecenoic, substâncias produzidas por fungos filamentosos como o *Sporothrix flocculosa* Traquair, L.A. Shaw e Jarvis 1988, também promovem a redução da produção e germinação de esporos de *Botrytis cinerea* Pers. 1794, e *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* W.C. Snyder e H.N. Hansen 1940 (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

Para El-Tarabily e Sivasithamparam (2006) e Coelho et al. (2003), determinadas cepas de leveduras, de vários gêneros tais como *Candida*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* e *Zygosaccharomyces*, podem apresentar o fator “killer”, proteínas ou glicoproteínas tóxicas, de baixa massa molecular (FUENTEFRÍA, 2007), liberadas no meio de cultivo capaz de inibir fungos filamentosos fitopatogênicos, tais como *Rhizoctonia fragariae* S.S. Husain e W.E. McKeen 1963, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1884 e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. 1947 (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006), *Fusarium oxysporum* Schldl. 1824 e *B. cinérea* (ROSA et al., 2010). Estas substâncias tóxicas atuam na membrana

de células sensíveis, por meio da redução do pH intracelular e extravasamento de íons potássio e ATP.

Quanto à produção de enzimas degradadoras, algumas espécies como *P. anomala*, *P. membranifaciens* (E.C. Hansen) E.C. Hansen 1904, *R. glutinis* (Fresen.) F.C. Harrison 1928, *C. laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner 1950, *A. pullulans* (de Bary) G. Arnaud 1918, *Tilletiopsis albescens* Gokhale 1973, e *T. pallescens* Gokhale 1973, têm sido relatadas β-1,3- glucanase, na ação antagonica contra *B. cinerea*, *Penicillium expansum* Link 1809, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. 1902, *Aspergillus niger* Tiegh. 1867, *Sphaerotheca fuliginea* (Schltld.) Pollacci 1911, e *P. xanthii*. A produção de quitinases foi observada por isolado de *A. pullulans*, *T. albescens* e *C. saitoana* Nakase e M. Suzuki 1985, contra isolados de *P. expansum*, *P. xanthii* e *B. cinerea*, respectivamente (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA et al., 2010; URQUHART; PUNJA, 2002).

Além das substâncias antibióticas e tóxicas, há relatos de produção de sideróforos, compostos quelantes de íons de ferro, por espécies dos gêneros *Candida* e *Rhodotorula*, promovendo a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos e conferindo, aos isolados produtores, vantagens competitivas (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; ROSA et al., 2010).

A ação parasítica de isolados de leveduras contra fungos fitopatogênicos pode ser observada pela ocorrência de adesão e fixação das células leveduriformes em hifas e/ou esporos do patógeno, indicando uma relação hiperparasítica. Este tipo de interação foi observado em isolados dos gêneros *Candida* sobre *P. digitatum* e *Pichia* sobre *P. italicum* e *B. cinerea*, onde se verificou, além de atividades líticas, a atuação da degradação da parede micelial, dilatação do diâmetro das hifas, lesões e degeneração do protoplasma (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; MASIH, et al., 2001).

Os relatos sobre a produção de quitinases por *C. saitoana* e peroxidases por *A. pullulans*, em fermentos no tecido de maçãs, sugerem que, indiretamente, isolados de levedura podem reduzir a incidência de doenças atuando como agentes indutores de resistência (HAÏSSAM, 2011) por meio da indução da produção de substâncias, tais como fenilalanina amônia liase, fitoalexinas, peroxidases e etileno, em tecidos vegetais (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Essa ativação de resistência pode ocorrer em tecidos de folhas e frutos e, possivelmente, em outros tecidos como os de raízes.

Diversas são as características que conferem às leveduras papel importante, útil e eficiente no biocontrole de doenças em plantas. Ainda, são de fácil produção e manutenção em condições *in vitro*; podem ser manipuladas a fim de melhorar a utilização e eficácia;

possuem fácil adaptação nutricional, em condições prevalecentes desfavoráveis; bem como, alta capacidade de proliferação, até mesmo em baixas temperaturas; capacidade de colonizar ferimentos em tecidos de plantas (ROBIGLIO et al., 2011). Além disso, não produzem esporos alergênicos como os fungos filamentosos; podem colonizar superfícies secas por longos períodos e são capazes de crescer em várias fontes de carbono (GOUVEA, 2007).

Por todas essas características e pelo surgimento de produtos comerciais tais como Aspire® e Nexy®, que têm como princípio ativo a levedura *Candida oleophila*, têm sido largamente estudadas quanto a prospecção de agentes de biocontrole. O gênero *Pichia* é um dos agentes de biocontrole mais estudados e o gênero *Saccharomyces* é considerado e denominado pelo Food and Drug administration (FDA) como “seguro” (GRAS) (VIANA et al., 2012).

Mesmo consideradas promissoras agentes de biocontrole, não foram observados trabalhos utilizando-se leveduras no controle do agente causal da resinose do coqueiro, assim como referentes ao controle da doença em campo. Portanto pesquisas nesse sentido são necessárias, bem como o desenvolvimento de metodologias eficientes de aplicação e avaliação da eficiência *in vivo*.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo selecionar isolados de leveduras, obtidos de frutos de coco imaturos, com potencial para o biocontrole da resinose do coqueiro, causada pelo fungo *C. paradoxa*, em mudas de coqueiro-anão-verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFIERI JR., S. A. **Stem bleeding disease of coconut palm, *Cocos nucifera* L.** Flórida: Florida Department of Agriculture Division of Plant Industry, jan. 1967. 2 p. (Circular, 53).

ÁLVAREZ, E.; ILANO, G. A.; LOKE, J. B.; CHACON, M. I. Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* Isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil. **Journal of Phytopathology**. Berlin, v. 160, p. 690-700, 2012

ARAÚJO, J. C. A. de; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. **Murcha-de-*Phytophthora* do Coqueiro no Amazonas**. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 2003. 6 p. (Circular Técnica, 17).

BACHILLER, N. C. S. J.; ILAG, L. L. Etiology of stem bleeding disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in the Philippines. In: Annual Scientific Conference of the Federation of Crop Science Societies of the Philippines, 14. 1998, Philippines. **Annals...** Philippines: Philippine Journal of Crop Science, 1998a, v. 23 (Supplement no. 1) p. 42.

BACHILLER, N. C. S. J.; ABAD, R. G. Distribution and disease mapping of stem bleeding disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in the Philippines. In: Annual Scientific Conference of the Federation of Crop Science Societies of the Philippines, 14. 1998, Philippines. **Annals...** Philippines: Philippine Journal of Crop Science, 1998b, v. 23 (Supplement no. 1) p. 43.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4^aed. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1998. 218p.

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.

BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Introduction: fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: _____. **Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential**. London: British Library, 2001, p. 1-8.

CARVALHO, J. M. de; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. de; MAIA Jr, G. A. Água-de-coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p.437-452, jul./set.2006.

COSTA-CARVALHO, R. R. da. **Epidemiologia e controle da resinose do coqueiro e transmissibilidade por meio de vetor**. 2011, 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

COSTA-CARVALHO, R. R. da. WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 7, n. 9, p. 1-5, 2011a.

COSTA-CARVALHO, R. R. da. WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 7, n. 4, p. 1-6, 2011b.

COSTA-CARVALHO, R. R. da. LARANJEIRA, D.; CARVALHO FILHO, J. L. S. de; SOUZA, P. E. de; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; JESUS, H. C. R. de; WARWICK, D. R. N. In vitro activity of oils of *Lippia gracillis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 241-244, 2013.

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

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 337-358, jul./dez.2003.

COELHO, A. R.; NÓBREGA, G. M. de A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, supl. 1, p. 1879-1892, 2011.

CORREIA, M. S.; COSTA, J. L. DA S. Dispersão Anemófila do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* em Plantações de Coqueiro. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 150-154, 2005.

CUENCA, M. A. G. Importância econômica do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 1997. cap.4, p. 73-98.

ELLIOTT, M. L. **Thielaviopsis trunk rot of palm**. 2006. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pp143>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

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 2011. **World Production**. Disponível em: <<http://www.faostat.org.br>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

FERRAZ, L. G. B.; ARAGÃO, W. M.; SILVA, D. A. da; NASCIMENTO, J. C. B.; SILVA FFILHO, J. S. da. Coqueiro ‘anão-verde’ (*Cocos nucifera* L.). In: Instituto Agrônômico de Pernambuco. **Cultivares recomendadas pelo IPA para a Zona da Mata de Pernambuco**. Recife: Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco, 2009a. p. 99-106.

FERRAZ, L. G. B.; SILVA, A. B. da.; NUNES FILHO, J.; SOUSA, A. R. de.; SANTOS, V. F. dos. Sugar cane cake and mineral fertilizers on coconut (*Cocos nucifera* Linn.) seedlings. **Cord**, Jakarta, v.25, n.2, p.45-55, 2009b.

FERRAZ, L. G. B.; ASSIS, T. C.; GONÇALVES, A. P. S.; ANDRADE, D. E. G. T. Resinose em coqueiro na faixa litorânea de Pernambuco. In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus. **Anais...** Tropical Plant Pathology, 2012, v. 37 (suplemento).

FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F.; SANTANA, D. L. Q.; MOURA, J. I. L.; Pragas do Coqueiro. In: WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A.; (eds.). **Cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1998. p. 205-280.

FERREIRA, J. M. S.; FONTES, H. R.; PROCÓPIO, S. O. **Resinose do coqueiro: como identificar e manejar**. Aracaju: EMBRAPA-CPATC, 2007. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/365232>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: EMBRAPA-CPATC, 2006. 16 p.

FONTES, H. R.; PROCOPIO, S. O.; CARGNELUTTI FILHO, A.; FERREIRA, J. M. S. FERNANDES, M. F. Avaliação de diferentes herbicidas para a erradicação química de coqueiros infectados com resinose. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 849-857, 2009a.

FONTES, H. R.; PROCOPIO, S. O.; CARGNELUTTI FILHO, A.; FERREIRA, J. M. S. FERNANDES, M. F. Eficácia do herbicida MSMA na erradicação de coqueiros infectados com resinose. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 859-865, 2009b.

FONTES, H. R.; WANDERLEY, M. **Novos cenários para a cultura do coqueiro gigante no Brasil**. 2010. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/agropag/212960.htm>. Acesso em: 10 mai. 2013.

FRAVEL, D. R.; CONNICK, W. J.; LEWIS, J. A. Formulation of microorganisms to control plant diseases. In: BURGESS, H.D. (Ed.) **Formulation of microbial pesticides**. Kluwer Academic Publishers, Norwell, p. 187-202, 1998.

FREIRE, F. DAS C. O.; MARTINS, M. V. V. Confirmação da ocorrência do sangramento do caule do coqueiro no estado do Ceará. **Essentia**, Sobral, v. 12, n. 1, p. 31-39, jun./nov. 2010.

FUENTEFRIA, A. M. **Bioprospecção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

GOMES, R.P. **O coqueiro-da-baía**. 2^a ed., São Paulo: Nobel, 1977. 111 p.

GOUVEA, A. **Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 85 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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.

HOLANDA, J. S. de; ALVES, M. C. S. CHAGAS, M. C. M. das. **Cultivo do coqueiro no Rio Grande do Norte**. Natal: EMPARN, 2008. 27 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2003**: sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011a. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 mai. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática** [on line]. Banco de dados agregados. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011b. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 22 mai. 2013.

LAHLALI, R.; HAMADI, Y.; EL GUILLI, M.; JIJAKLI, M. H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus mold in Morocco

under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**, Orlando, v. 56, p. 217-224, 2011.

LEAL, M. de L. da S.; WARWICK, D. R. N. A amostragem na avaliação das lixas-do-coqueiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1717-1723, 2000.

LILY, V. G. Record of *Phomopsis cocoina* (Cooke) punith in stem bleeding affected coconut palm. **Current Science**, Bangalore, v. 53, n. 13, p. 705-706, 1984.

LIRA, R. V. F. de. **Levantamento da micoflora do filoplano do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em diferentes áreas do nordeste do Brasil**. 1990. 170f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010**. Aracaju: EMBRAPA-CPATC, 2011. 28 p. (Documentos, 164)

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

MATHEW, A. S. ; RAMANANDAN, P. L. Incidence of stem bleeding disease of coconut palm in relation to pH and electrical conductivity of soils. **Journal of Plantation Crops**. Kasaragod, v. 8, n. 1, p. 40-42, jun. 1980.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: AGROFIT**. Brasília, 2012. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 jun. 2012.

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.

NAMBIAR, K. K. N. ; JOSHI, Y. ; VENUGOPAL, M. N. ; MOHAN, D. R.C. Stem bleeding disease of coconut: reproduction of symptoms by inoculation with *Thielaviopsis paradoxa*. **Journal of Plantation Crops**, Kerala, v. 14, n. 2, p. 130-133, 1986.

NAMBIAR, K. K. N.; KUMAR, A.; SASTRY, K.; JOSHI, Y. Seasonal effect on infestation by coconut stem bleeding pathogen. *Thielaviopsis paradoxa*. **Current Science**, Bangalore, v. 58, n. 1, p. 34-35, 1989.

NELSON, S. **Stem bleeding of coconut palm**. 2005. Disponível em: <<http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-30.pdf>>. Acesso em: 10.jan.2013.

PETCH, T. The bleeding-stem disease of the coconut tree in Ceylon. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 3, p. 108 -109, 1907.

PINHO, D. B.; DUTRA, D. C. ; PEREIRA, O. L. Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasilia, v. 38, n. 2, p. 152-157, 2013.

POLIZZI, G.; CASTELLO, I.; AIELLO, D.; VITALE, A. First report of stem bleeding and trunk rot of Kentia palm caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 8, p. 1057, aug.2007.

REIS, E. M.; FORCELINI, C. A.; REIS, A. C. Classificação de fungicidas: uma nova abordagem. In: _____. **Manual de fungicidas**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2007. 5 ed., cap.5, p. 20-46.

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**. Amsterdam, v. 147, p. 211-216, 2011.

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

SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G. In vitro antagonismo of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, p. 49-58, 2007.

SILVA, C.M.M. da; MELO, I.S. de. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997, p.141-165.

SILVA, G. G. da. **Desenvolvimento e qualidade da água de frutos de cultivares de coqueiro anão**. 2006. 124 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal da Paraíba, Areia.

SIQUEIRA, E. R. de; RIBEIRO, F. E.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 1997. cap.4, p. 73-98.

TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; OLIVEIRA, F. A. de. Avanços no conhecimento sobre a resinose do coqueiro no Brasil. In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus. **Anais.... Tropical Plant Pathology**, 2012, v. 37 (suplemento).

TREMACOLDI, C. R.; LINS, P. M. P. **Inibição do crescimento micelial in vitro de *Thielaviopsis paradoxa* com a utilização de fungicidas sistêmicos e de contato.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 12 p. (Boletim Técnico, 75).

TZENG, S. J.; SUN, E. J. First report of fruit basal rot by *Ceratocystis paradoxa* on coconut in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 4, p. 487, apr.2010.

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

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.

VIANA, F. M. P.; LIMA, J. R.; LIMA, J. S. Leveduras no controle de doenças pós-colheita de frutas. In: FARINA, R. S. I.; ARAÚJO, B. L. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo: RAPP, 2012. p.125-140.

WARWICK, D. R. N. **Principais Características do Anel-vermelho e Murcha-de-fitomonas.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 8 p. (Comunicado Técnico, 38).

WARWICK, D. R. N.; PASSOS, E. E. M. Outbreak of stem bleeding coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n. 3, p.175-177, jul./set.2009.

YU, F. -Y.; NIU, X. -Q.; TANG, Q. -H.; ZHU, H.; SONG, W. -W.; QIN, W. -Q. First report stem bleeding in coconut caused by *Ceratocysts paradoxa* in Hainan, China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 290, feb.2012a.

YU, T.; YU, C.; CHEN, F.; SHENG, K.; ZHOU, T.; ZUNUN, M.; ABUDU, O.; YANG, S. Integrated control of blue mold in pear fruit by combined application of chitosan, a biocontrol

yeast and calcium chloride. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 49-53, 2012b.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, Orlando, v. 57, p. 193-201, 2011.

ZHAO, Y.; WANG, R. TU, K.; LIU, K. Efficacy of preharvest spraying with *Pichia guilliermondii* on postharvest decay and quality of cherry tomato fruit during storage. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 47, p. 9613-9622, 2011.

CAPÍTULO II

Seleção de leveduras com potencial biocontrolador da resinosidade do coqueiro

Seleção de leveduras com potencial biocontrolador da resinose do coqueiro

Iwanne Lima Coelho⁽¹⁾ . Luiz Gonzaga Bione Ferraz⁽²⁾ . Rejane Pereira Neves⁽²⁾ .

Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho⁽¹⁾ . Tereza Cristina de Assis⁽²⁾ . Sabrina Stefanne Barboza⁽²⁾ . Alessandra de Jesus Boari⁽⁴⁾ . Célia Regina Tremacoldi⁽⁴⁾ . Delson Laranjeira⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil.

⁽²⁾ Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bongi, CEP: 50761-00, Recife-PE, Brasil.

⁽³⁾ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

⁽⁴⁾ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CPATU), Trav. Dr. Enéias Pinheiro, s/n, Montese, CEP: 66095-100, Belém- PA, Brasil.

T. C. Assis

IPA,

50761-00 Recife, Brasil

e-mail: cristina.assis@ipa.br

S. S. Barboza

UFPE,

50670-901 Recife, Brasil

e-mail: stbarboza@gmail.com

A. J. Boari

EMBRAPA-CPATU,

66095-100 Belém, Brasil

e-mail: ajboari@cpatu.embrapa.br

I. L. Coelho

UFRPE,

52171-900 Recife, Brasil

e-mail: coelho.iwanne@yahoo.com.br

tel.: +55 (81) 98259561

R. R. Costa-Carvalho
UFPE,
50670-901 Recife, Brasil
e-mail: rejanecosta@yahoo.com.br

L. G. B. Ferraz
IPA,
50761-00 Recife, Brasil
e-mail: luiz.gonzaga@ipa.br

D. Laranjeira
UFPE,
50670-901 Recife, Brasil
e-mail: delson@depa.ufrpe.br

R. P. Neves
UFPE,
50670-901 Recife, Brasil
e-mail: rejadel@yahoo.com.br

C. R. Tremacoldi
EMBRAPA-CPATU,
66095-100 Belém, Brasil
e-mail: tremacol@cpatu.embrapa.br

Resumo A resinose, causada por *Ceratocystis paradoxa* (Anamorfo: *Thielaviopsis paradoxa*), compromete a produtividade do coqueiro-anão-verde e ameaça a cadeia produtiva do coco-verde. Não há fungicidas registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o manejo dela. O biocontrole utilizando-se leveduras pode representar uma solução eficiente e aplicável ao manejo da cultura. Objetivou-se selecionar leveduras, obtidas de cocos imaturos, potencialmente biocontroladoras da resinose do coqueiro sobre mudas de coqueiro-anão-verde. Isolados de *Ceratocystis paradoxa* de Moju-PA (TMOJ), Neópolis-Se (TSE) e Sousa-PB (TPB) foram avaliados quanto a patogenicidade e severidade. Na seleção *in vivo*, testou-se o potencial de redução dos sintomas da resinose em mudas de coqueiro aplicando-se suspensão de 37 leveduras (1×10^7 células mL⁻¹) por aspersão e injeção. Ambos os testes sob telado a 40 ± 2 C° e 60% UR, com avaliação ao final de 30 e 40 dias, respectivamente. No antagonismo *in vitro*, (28 ± 2 C°, 12h de fotoperíodo), avaliou-se inibição do crescimento micelial, ação de metabólitos voláteis, parasitismo, antibiose e

atividade “killer”. Das 37 leveduras testadas, 15 reduziram os sintomas causados por TMOJ, que foi o isolado mais agressivo e, destas *Pichia guilliermondii* (LEV 25) e *Candida dosseyi* (LEV 47) reduziram o crescimento micelial e a produção de conídios, por competição e ação de metabólitos voláteis. Ambos os antagonistas apresentam potencialidade como componente do manejo integrado da resinose coqueiro. Ainda, este é o primeiro relato de ação antagônica e do biocontrole da resinose, em mudas de coqueiro-anão-verde, por estas leveduras.

Palavras-chave Ação antagônica . *Candida dosseyi* . *Ceratocystis paradoxa* . Coqueiro-anão-verde . Controle biológico . *Pichia guilliermondii* . *Thielaviopsis paradoxa*

Abreviações

MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

TMOJ *Ceratocystis paradoxa* oriundo de Moju-PA, Brasil

TPB *Ceratocystis paradoxa* oriundo de Sousa-PE, Brasil

TSE *Ceratocystis paradoxa* oriundo de Neópolis-SE, Brasil

LEV 25 *Pichia guilliermondii*, isolado número 25

LEV 47 *Candida dosseyi*, isolado número 47

Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L) é considerado uma das fruteiras mais importantes do mundo por desempenhar elevado papel social e econômico aos países da faixa tropical do globo, especialmente para as populações de baixa renda. Grande parte da produção de coco está direcionada para o consumo *in natura* ou indústria alimentícia, obtendo-se mais de 100 produtos e subprodutos (Carvalho et al. 2006).

A produção brasileira de coco em 2001 foi da ordem de dois bilhões de frutos, com produtividade de 7.362 frutos/ha (IBGE 2011a). Isso confere ao país o 4º lugar no ranking mundial (FAO 2011).

As regiões Norte e Nordeste têm maior participação na formação da produção nacional, representadas pelos estados da Bahia, maior produtor (529.464.000 frutos/ano), seguido por Ceará (274.092.000 frutos/ano), Sergipe (239.373.000 frutos/ano) e Pará (229.080.000 frutos/ano) (IBGE 2011b).

O coqueiro-anão-verde é recomendado preferencialmente para a produção de água (Ferraz et al. 2009a), pois possui maior precocidade produtiva e qualidades sensoriais superiores em relação à água proveniente de frutos dos demais cultivares. O aumento de áreas

de plantio e a implantação de novas áreas dessa variedade reflete o crescente aumento na demanda do mercado de água de coco (Fontes e Wanderley 2006).

Apesar de representar a maior contribuição na produção bruta nacional de coco, o Nordeste possui a menor produtividade em relação às demais regiões em decorrência dos baixos índices pluviométricos e da incidência de pragas e doenças (Warwick e Passos 2009).

A resinose ou “stem bleeding” é uma das principais doenças do coqueiro no mundo, por ser letal às plantas e contar com as mais diversas formas de disseminação do patógeno *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Höhn (*Thielaviopsis paradoxa*). Registrada no Brasil, em 2004 no estado de Sergipe (Warwick e Passos 2009), disseminou-se rapidamente pelo país, com registros progressivos de ocorrência nos estados da Ceará (Freire e Martins 2010), Bahia, Alagoas (Fontes et al. 2009), Paraíba, Rio Grande do Norte (Ferreira et al. 2007), Pará (Tremacoldi e Lins 2011) e Pernambuco (Ferraz et al. 2012), provocando forte queda produtiva e prejuízos aos nucicultores.

No Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) não existem produtos registrados a este patossistema. O manejo da doença é realizado por meio da raspagem e/ou corte circular dos tecidos afetados, seguido de aplicação do tiofanato metílico (330 g i.a./100 L de água, adicionado de 500 g de uréia, 200 g de cloreto de potássio e 200 g de cloreto de sódio) e cobertura de piche ou alcatrão vegetal (Ferreira 2007; Tremacoldi e Lins 2011).

Métodos alternativos de prevenção e controle da doença, como o controle biológico, agregado ao manejo adequado da cultura, podem representar solução aplicável e eficiente (MORAIS, 2009).

As leveduras são consideradas promissoras agentes de biocontrole para fungos fitopatogênicos por apresentarem diversos mecanismos antagônicos como competição por nutrientes e espaço, ação micoparasítica, produção de substâncias antibióticas e/ou degradadoras da parede celular do patógeno, além de apresentarem possível atuação como indutoras de resistência em plantas (El-Tarabily e Sivasithamparam 2006; Valdebenito-Sanhueza 2000).

No entanto, trabalhos utilizando agentes biocontroladores no manejo de *C. paradoxa* são escassos e não foram recuperados registros de leveduras no controle do agente causal da resinose do coqueiro, assim como estudos referentes ao controle da doença em campo. Portanto faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias eficientes de aplicação e avaliação da eficiência *in vivo*.

O objetivo desse estudo foi selecionar isolados de leveduras, obtidos de frutos de coco imaturos, com potencial para o biocontrole da resinose do coqueiro, causada pelo fungo *C. paradoxa*, em mudas de coqueiro-anão-verde.

Materiais e métodos

Obtenção e cultivo de leveduras

No Laboratório de Fungos do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) as leveduras foram obtidas a partir da superfície de cocos imaturos coletados em municípios dos estados brasileiros de Alagoas, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e Rondônia. Cinco fragmentos de 0,5 cm², retirados da região equatorial do fruto e debaixo do perianto do mesmo, em seguida adicionados a tubos de ensaio contendo 10 mL de água de torneira esterilizada + clorafenicol (50 mg L⁻¹) e submetidos a banho de ultra-som por 25 minutos. Após agitação dos tubos em “vórtex”, procedeu-se plaqueamento de 0,1 mL em placas de Petri, contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura (1,5 g L⁻¹) (SDA) e adicionado de cloranfenicol (50 mg L⁻¹), uniformizado com o auxílio de alça de Drigalski. Após 72 horas de incubação, à temperatura de 25 ± 2° C, as colônias emergentes foram repicadas para placas com meio SDA e selecionadas apenas as colônias que não apresentaram crescimento a 37° C.

Patogenicidade de *C. paradoxa*

Em telado (40±2 °C, 50 a 60% de umidade relativa) do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA (Recife, PE), três isolados de *C. paradoxa*, obtidos por isolamento indireto de tecidos de plantas com resinose oriundas de cultivos comerciais de Neópolis-SE (TSE), Moju-PA (TMOJ) e Sousa-PB (TPB), foram testados quanto ao potencial patogênico em mudas de coqueiro-anão-verde, com três meses produzidas em bolsas plásticas (FERRAZ et al., 2009b), pelo método adaptado da inoculação de cilindros de cultivos artificiais contendo crescimento micelial do patógeno.

Um disco de meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (0,7 cm de diâmetro), contendo estruturas do patógeno foi sobreposto na região do tecido peciolar da muda, previamente ferido com agulha hipodérmica estéril e recoberto por fita Parafilm, retirada quatro dias após a inoculação.

Na testemunha, utilizou-se apenas disco do meio BDA e após 30 dias, avaliou-se incidência (presença ou não de sintomas típicos) e severidade (percentagem de área do tecido lesionado - ATL), com auxílio do programa Assess 2.0. A seleção do isolado patogênico de *C. paradoxa*, utilizado nos testes posteriores, baseou-se na maior severidade observada e no reisolamento indireto do tecido sintomático das plantas inoculadas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (uma muda inoculada/repetição).

Seleção *in vivo* e *in vitro* de leveduras com potencial antagonico a *C. paradoxa*

No experimento *in vivo* 37 isolados de leveduras foram testados quanto à capacidade de reduzir a incidência e/ou severidade da resinose em mudas de coqueiro-anão-verde (aproximadamente três meses), por dois métodos de inoculação: aspersão (10 mL de suspensão a 1×10^7 células mL^{-1}) e injeção (1 mL de suspensão a 1×10^7 células mL^{-1}) de suspensão de células. Após um dia da inoculação das suspensões de leveduras, efetuou-se a inoculação do isolado selecionado de *C. paradoxa* patogênico, segundo descrito no método de avaliação patogênica. Nas testemunhas relativa e absoluta procedeu-se aspersão e injeção de água destiladas esterilizadas (ADE) e inoculação do patógeno, apenas na relativa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições/tratamento (uma muda inoculada/repetição) e as mudas foram mantidas em telado (40 ± 2 °C, 50 a 60% de umidade relativa) com rega manual diária. Após 40 dias, avaliou-se a percentagem de área do tecido lesionado (ATL) como descrito para o teste de patogenicidade.

Para a seleção *in vitro*, no Laboratório de Fitopatologia do IPA, 37 leveduras foram cultivadas, uma a uma, simultaneamente ao patógeno em placa de Petri contendo meio BDA. As leveduras, cultivadas inicialmente em meio DAS foram inoculadas em tubos de ensaio com 5 mL de caldo glicosado a 2% e, após 48h de incubação a 28 ± 2 °C, semeadas em BDA, pelo método adaptado de semeio em riscas com o auxílio de Swab estéril. Disco de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro (retirado de cultivo de seis dias de idade em meio BDA), contendo estruturas do patógeno foi depositado no centro da placa de Petri semeada com a levedura. Na testemunha, repicou-se o patógeno em meio BDA previamente tratado com água destilada autoclavada (ADE). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições/tratamento. Após quatro dias de incubação (28 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas) foram aferidos os valores médios do diâmetro de crescimento micelial do patógeno.

Os isolados que proporcionaram maior redução da porcentagem da área lesionada e maior redução do diâmetro de crescimento micelial nos testes *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, foram selecionados e submetidos aos testes de avaliação de mecanismos antagônicos.

Avaliação de mecanismos antagônicos de leveduras sobre isolados de *C. paradoxa*

Os testes para a avaliação da atividade “killer” e os mecanismos antagônicos dos isolados de leveduras selecionados (LEV 25 e LEV 47) sobre os isolados patogênicos de *C. paradoxa* (TSE, TPB e TMOJ) foram realizados, respectivamente, nos Laboratórios de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE e de Fitopatologia do IPA.

Na avaliação de ação por antibiose, patógeno e antagonista foram cultivados simultaneamente em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. O isolado de levedura foi semeado, por meio de risca contínua de uma extremidade a outra com “Swab estéril”, no centro da placa de Petri, e o patógeno, por meio de deposição de discos de meio de cultura, de 0,5 cm de diâmetro contendo estruturas do patógeno, nas extremidades da placa paralelas ao antagonista e a 0,5 cm dos bordos da placa. Para as testemunhas relativa e absoluta, houve a substituição da levedura por tiofanato metílico (20 mg i.a. mL⁻¹) e ADE, respectivamente. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições. As placas foram incubadas por quatro dias a 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após este período, foi avaliada a presença e/ou o diâmetro do halo de inibição entre o crescimento do patógeno e do antagonista.

A avaliação da ação de metabólitos voláteis consistiu em posicionar bases de placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, umas sobre as outras, onde na face inferior depositou-se disco de meio de cultura, de 0,5 cm de diâmetro contendo estruturas do patógeno, no centro da placa e na face superior, pelo método de Swab estéril, a levedura antagonista. Após posicionamento das bases, estas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 28 ± 2 °C por quatro dias, sob fotoperíodo de 12 horas. A testemunha consistiu da substituição da levedura por ADE. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições em arranjo fatorial 3x3. Por meio de mensuração de diâmetro micelial e contagem do número de conídios, foram avaliados, respectivamente, diâmetro de crescimento micelial e a esporulação.

O potencial de produção de toxinas *killer* foi avaliado através do cultivo de células dos antagônicos (48 h a 22 ± 2 °C) em meio SDA, e posterior ressuspensão em ADE até à

concentração de 10^5 células mL^{-1} e semeio, um isolado por placa com auxílio de “Swab estéril”, em placas de Petri contendo meio tamponado (pH 4,3-4,7) de extrato de levedura peptona dextrose (YEPD), acrescido de azul de metileno (0,005%). Leveduras potencialmente produtores do fator “killer” (sete isolados por placa) foram depositadas, uma a uma, com auxílio de alça de platina, em pontos determinados e equidistantes da placa de Petri, semeada anteriormente com suspensão de levedura sensível ao fator “killer”. Após incubação a 22 ± 2 °C por 72 h, as colônias que apresentaram zona de inibição (onde não ocorre o crescimento da cepa sensível) foram consideradas positivas quanto à produção do fator *killer* e os isolados, semeados que apresentaram zona azul adjacente (onde há evidências da morte celular) a zona de inibição.

Para constatar possível ação parasítica, buscou-se verificar perfuração e extravasamento citoplasmático nas hifas do patógeno, em virtude da interação deste com as células dos isolados antagonistas, por meio de observação de preparações microscópicas, após sete dias de incubação (28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas) de cultivos simultâneos (3 repetições), como descrito no método de seleção *in vitro*. Na testemunha, houve a substituição da levedura por ADE.

Identificação de leveduras e *C. paradoxa*

Para a identificação molecular dos três isolados patogênicos, foram alinhados 435 pares de bases das sequências amplificadas da região de Transcrição do Espaço Interno (ITS 1 e 2, e 5.8 rDNA), com os primers ITS4 e ITS5 (TMOJ e TSE) e ITS1 e ITS4 (TPB), e de 34 sequências de espécies relatadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabela 1) e comparadas no programa PAUP 4.0® (versão beta 10) por análise de máxima parcimônia e de *bootstrap* (1000 repetições). Após preservação em óleo mineral, os isolados identificados foram depositados na Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos Prof.^a. Maria Menezes – CMM/UFRPE sob os códigos CMM 1353 (TSE), CMM 1354 (TPB) e CMM 1355 (TMOJ).

Tabela 1 Procedência de isolados de *Thielaviopsis* spp. e *Ceratocystis* spp. utilizados para agrupamento filogenético, com ênfase ao hospedeiro, local e número de acesso das sequências gênicas das regiões ITS-1, ITS-2 e 5.8 rDNA no National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Isolados	Local	Hospedeiro	ISOLADO	Acesso NCBI
<i>Thielaviopsis australis</i> ^a	Austrália	<i>Nothofagus cunninghamii</i>	CMW 2333	FJ411325 ^d
<i>Thielaviopsis australis</i> ^a	Austrália	<i>Nothofagus cunninghamii</i>	CMW 2653	FJ411326 ^d
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Austrália	Algodão	BRIP40192	HM031125 ^e
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Austrália	Cenoura	WAC10715	HM031128 ^e
<i>Thielaviopsis ceramica</i>	-	-	CMW15245	EU245022 ^f
<i>Thielaviopsis ceramica</i>	-	-	CMW15248	EU245024 ^f
<i>Ceratocystis eucalypti</i> ^a	Austrália	<i>Eucalyptus sieberi</i>	CMW 3254	FJ411327 ^d
<i>Ceratocystis eucalypti</i> ^a	Austrália	<i>Eucalyptus sieberi</i>	CMW 4453	FJ411328 ^d
<i>Ceratocystis neocaledoniae</i> ^a	EUA	-	CMW 3270	FJ411329 ^d
<i>Ceratocystis neocaledoniae</i> ^a	EUA	<i>Coffea robusta</i>	CMW 6392	FJ411330 ^d
<i>Thielaviopsis ovoidea</i>	-	<i>Quercus</i>	C1376	AF275484 ^g
<i>Thielaviopsis ovoidea</i>	-	Lenha	C1375	AF275483 ^g
<i>Ceratocystis paradoxa</i> ^a	Indonésia	Coqueiro	CMW 8779	FJ411324 ^d
<i>Ceratocystis paradoxa</i> ^a	Indonésia	Coqueiro	CMW 8790	FJ411323 ^d
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Brasil	Coqueiro	CMM 1739	JQ963886 ^h
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Indonésia	Óleo de palma	B116	HM770737 ⁱ
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Indonésia	Óleo de palma	B125	HM770738 ⁱ
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Colômbia	Óleo de palma	PCC.01	HQ248204 ^j
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Colômbia	Óleo de palma	PCC.02	HQ248205 ^j
<i>Ceratocystis paradoxa</i> ^c	Brasil	Coqueiro	TMOJ	KF612474
<i>Ceratocystis paradoxa</i> ^c	Brasil	Coqueiro	TPB	KF612475
<i>Ceratocystis paradoxa</i> ^c	Brasil	Coqueiro	TSE	KF612476
<i>Thielaviopsis populi</i>	-	<i>Populus</i>	C1368	AF275479 ^g
<i>Thielaviopsis populi</i>	-	<i>Populus</i>	C1369	AF275480 ^g
<i>Ceratocystis fagacearum</i>	EUA	<i>Quercus</i> sp.	CMW 2039	FJ411344 ^d
<i>Ceratocystis fagacearum</i>	EUA	<i>Quercus</i> sp.	CMW 2658	FJ411345 ^d
<i>Thielaviopsis thielavioides</i>	-	Plantas remanescentes	C1630	AF275491 ^g
<i>Thielaviopsis thielavioides</i>	-	<i>Lupinus</i>	C1377	AF275485 ^g
<i>Ceratocystis coerulescens</i> ^a	EUA	<i>Picea</i> sp.	CMW 26364	FJ411321 ^d
<i>Ceratocystis coerulescens</i> ^a	Alemanha	<i>Picea abies</i>	CMW 26365	FJ411322 ^d
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	EUA	<i>Ipomoea batatas</i>	CMW 15049	DQ520629 ^d
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Papua New Guinéa	<i>Ipomoea batatas</i>	CMW 1547	AF264904 ^d
<i>Ceratocystis laricicola</i>	Escócia	<i>L. decídua</i>	CMW4522	AY233908 ^l
<i>Ceratocystis laricicola</i>	Escócia	<i>L. decídua</i>	CMW1016	AY233915 ^l
<i>Ceratocystis polonica</i> ^a	Austria	<i>Picea abies</i>	CMW 7152	AY233902 ^l
<i>Ceratocystis polonica</i> ^a	Japão	<i>Picea jezoensis</i>	CMW 2272	AY233893 ^l
<i>Fusarium oxysporum</i> ^b	EUA	Solo	F36	HQ379660 ^m

^a Proveniente de coleção de cultura

^b Isolados outgroup

^c Isolados identificados no trabalho

^d Van Wyk et al. 2009

^e Coumans et al. 2011

^f Heath et al. 2009

^g Paulin-Mahady et al. 2002

^h Pinho et al. 2013

ⁱ Suwandi et al. 2012

^j Navia et al. 2010

^l Marin et al. 2005

^m Rajmohan, et al. 2011

As leveduras potenciais ao controle da resinose do coqueiro, após testes de viabilidade e caracterização bioquímica, foram submetidas a extração e amplificação de fragmentos de DNA, com os primers ITS1 e ITS4 para a região ITS. A identificação foi realizada por comparação das sequências desses isolados com e sequências disponíveis no banco de dados NCBI usando software BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após preservação em óleo mineral, os isolados identificados foram depositados na Micoteca URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE sob os códigos 7044 (LEV 25) e 7041 (LEV 47).

Análises estatísticas

Os dados de percentagem de ATL, obtidos no teste de patogenicidade e seleção *in vivo* foram transformados para $\log x$ e os obtidos no teste de ação de metabólitos voláteis foram transformados por \sqrt{x} para atenderem aos pressupostos da análise de variância (ANOVA). Eles e os dados não transformados foram submetidos ao teste de Tukey ($P < 0,05$), com auxílio do programa Assistat 7.6 beta®.

Resultados

Das 44 leveduras isoladas, 37 foram utilizadas nos testes de seleção visto que sete delas não apresentaram características adequadas quanto à viabilidade de cultivo *in vitro* e produção de inóculo. Em relação às leveduras utilizadas, a proporção de isolados provenientes da região equatorial do fruto e debaixo do perianto dos mesmos foram 56,8% e 43,2%, respectivamente.

Os três isolados de *C. paradoxa*, testados quanto a patogenicidade, foram considerados patogênicos, pois provocaram lesões marrons necróticas e levemente deprimidas no tecido peciolar de mudas de coqueiro-anão-verde (Figura 1). O TMOJ apresentou maior severidade (Tabela 2) e por isso foi utilizado nos testes para seleção *in vivo e in vitro* de leveduras potencialmente biocontroladoras.

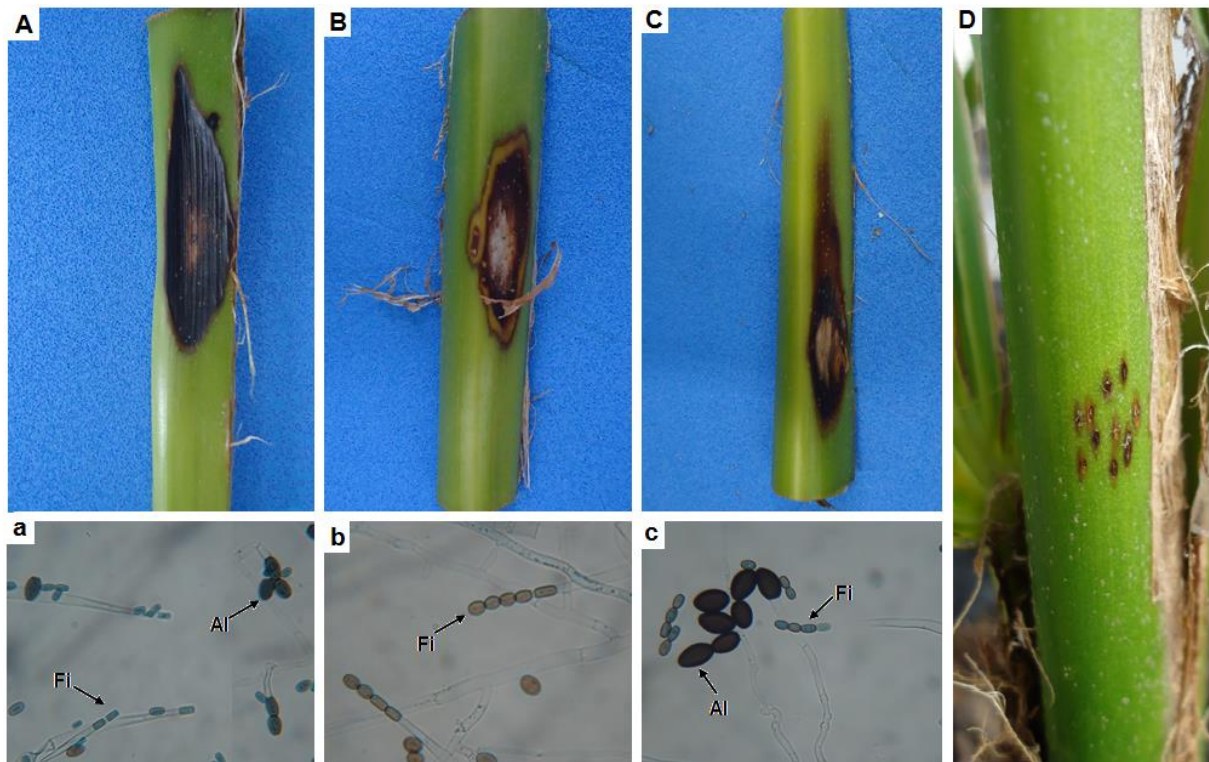


Figura 1 Necrose em tecido peciolar de mudas de coqueiro-anão-verde (A,B,C), causado por conídios: aleuriosporos (Al) e fialosporos (Fi) de *Ceratocystis paradoxa*, de isolados de Moju-PA (a), Neópolis-SE (a) e Sousa-PB (c). À direita, testemunha (D) com tecido peciolar sadio.

Tabela 2 Área de tecido lesionado- ATL (%) por *Ceratocystis paradoxa*, isolados de Moju-PA (TMOJ), Neópolis-SE (TSE) e Sousa-PB (TPB), em pecíolo de folhas de mudas de coqueiro-anão-verde

Tratamento	ATL % ^a
Testemunha	2,77 c
TSE	16,42 b
TPB	14,47 b
TMOJ	44,68 a
CV% = 10,88	

^a Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

No teste de seleção *in vivo*, houve diferença significativa para tratamento e para a interação método e tratamento (Tabela 3). No método de injeção, 36 leveduras reduziram a percentagem de área do tecido lesionado - ATL; a exceção foi a LEV 28. Na aspersão, 22 dos isolados apresentaram redução na percentagem de ATL. Na interação inoculação *versus* tratamento, verificou-se que 33 isolados apresentaram desempenho semelhante entre si e superior a testemunha relativa.

Tabela 3 Área do tecido lesionado- ATL (%) no pecíolo de folhas de mudas de coqueiro-anão-verde (tratadas com aspersão e injeção de suspensão de leveduras), por *Ceratocystis paradoxa* isolado de Moju-PA (TMOJ)

Tratamento	ATL (%) ^a			
	Aspersão		Injeção	
Testemunha Absoluta	4,70	A d	6,84	A b
Testemunha Relativa	44,68	A a	44,68	A a
LEV 04	9,85	A bcd	12,14	A b
LEV 08	12,47	A bc	10,40	A b
LEV 13	9,81	A bcd	12,11	A b
LEV 14	9,28	B bcd	15,41	A b
LEV 15	7,59	B bcd	14,53	A b
LEV 16	11,57	A bcd	9,41	A b
LEV 21	16,23	A b	11,88	A b
LEV 25	10,28	A bcd	16,33	A b
LEV 28	10,62	B bcd	19,60	A a
LEV 29	10,51	A bcd	9,73	A b
LEV 30	9,27	A bcd	8,70	A b
LEV 34	11,76	A bc	9,83	A b
LEV 36	8,63	A bcd	13,16	A b
LEV 37	14,75	A bc	13,07	A b
LEV 38	11,15	A bc	15,03	A b
LEV 39	11,37	A bc	8,63	A b
LEV 40	11,56	A bc	11,31	A b
LEV 41	12,30	A bc	9,27	A b
LEV 42	16,60	A b	14,06	A b
LEV 43	11,45	A bc	10,23	A b
LEV 44	13,95	A bc	13,40	A b
LEV 46	9,06	A bcd	11,61	A b
LEV 47	10,97	A bcd	11,610	A b
LEV 48	11,46	A bc	8,63	A b
LEV 50	12,20	A bc	15,96	A b
LEV 51	11,24	A bc	14,47	A b
LEV 52	12,75	A bc	6,88	B b
LEV 55	9,53	A bcd	14,02	A b
LEV 57	13,03	A bc	12,66	A b
LEV 58	15,39	A b	11,60	A b
LEV 62	9,86	A bcd	8,47	A b
LEV 66	14,30	A bc	10,240	A b
LEV 67	12,01	A bc	10,936	A b
LEV 69	9,14	A bcd	9,340	A b
LEV 70	13,58	A bc	10,550	A b
LEV 73	12,40	A bc	12,213	A b
LEV 76	14,60	A bc	11,770	A b

CV% = 10,90

^a Médias seguidas da mesma letra maiúscula, entre colunas, e minúscula, entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Na seleção *in vitro*, verificou-se que LEV 25, LEV 47 e LEV 58 reduziram a média do diâmetro micelial em relação à testemunha. As duas primeiras reduziram o equivalente a 88,33% e 86,60%, respectivamente superando até mesmo o tratamento com tiofanato metílico, que já havia apresentado resultados satisfatórios (Tabela 4).

Tabela 4 Crescimento micelial - MCM (cm) de *Ceratozystis paradoxa*, isolados de Moju-PA (TMOJ), cultivados *in vitro* sob ação antagonista de leveduras

Tratamentos	MCM ^a	Tratamentos	MCM ^a
Teste	9,00 A	LEV 42	9,00 a
Tiofanato	2,25 c	LEV 43	9,00 a
LEV 04	9,00 a	LEV 44	9,00 a
LEV 08	9,00 a	LEV 46	9,00 a
LEV 13	9,00 a	LEV 47	1,02 d
LEV 14	9,00 a	LEV 48	9,00 a
LEV 15	9,00 a	LEV 50	9,00 a
LEV 16	9,00 a	LEV 51	9,00 a
LEV 21	9,00 a	LEV 52	9,00 a
LEV 25	1,05 d	LEV 55	9,00 a
LEV 28	9,00 a	LEV 57	9,00 a
LEV 29	9,00 a	LEV 58	6,48 b
LEV 30	9,00 a	LEV 62	9,00 a
LEV 34	9,00 a	LEV 66	9,00 a
LEV 36	9,00 a	LEV 67	9,00 a
LEV 37	9,00 a	LEV 69	9,00 a
LEV 38	9,00 a	LEV 70	9,00 a
LEV 39	9,00 a	LEV 73	9,00 a
LEV 40	9,00 a	LEV 76	9,00 a
LEV 41	9,00 a		
CV% = 4,39			

^aMédias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Os fragmentos do epicarpo da região equatorial de cocos verdes provenientes de Goiana-PE e do grupo dos 15 isolados que apresentaram melhores resultados quanto à redução da percentagem de ATL no experimento de seleção *in vivo*, LEV 25, identificado como *Pichia guilliermondii* Wick. 1966 (teleomorfo: *Candida guilliermondii* Langeron & Guerra 1938), e LEV 47, identificado como *Candida dossey* (Nguyen et al. 2007), demonstraram maior potencial biocontrolador e foram avaliados quanto aos possíveis mecanismos de ação antagonista.

Os testes desenvolvidos *in vitro* demonstraram que não houve ação antibiótica de LEV 25 e LEV 47 sobre os isolados patogênicos TMOJ, TSE e TPB (Figura 2). No entanto, a

ação de compostos voláteis reduziram o número de conídios produzidos pelos isolados de *C. paradoxa* (Tabela 5).

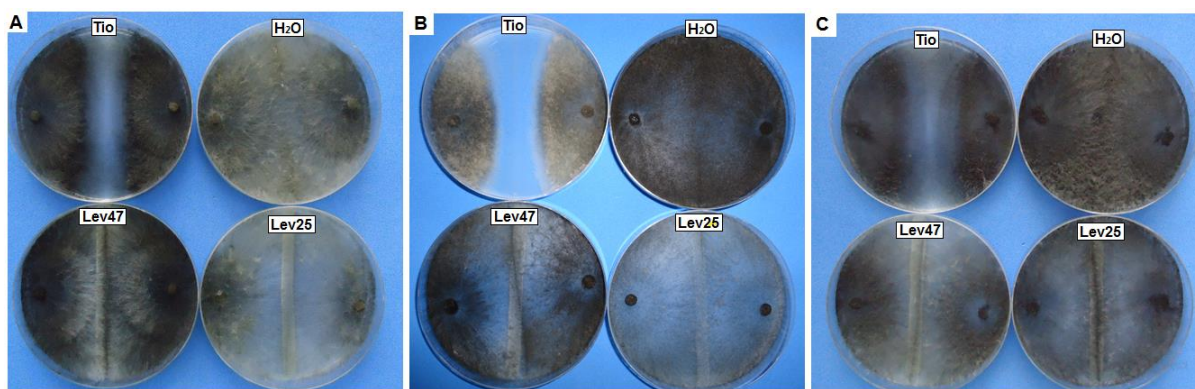


Figura 2 Crescimento micelial de *Ceratocystis paradoxa*, isolados de Moju-PA (A), Neópolis-SE (B) e Sousa-PB (C) sob a ação do fungicida tiofanato metílico (Tio), água destilada autoclavada (H₂O) e isolados de *Pichia guilliermondii* (Lev25) e *Candida dosseyi* (Lev 47)

Tabela 5 Ação de metabólitos voláteis, produzidos por *Pichia guilliermondii* (LEV 25) e *Candida dosseyi* (LEV 47) sobre o número de conídios - NC (1×10^5 esporos mL⁻¹) produzidos por *Ceratocystis paradoxa*, isolados de Moju-PA (TMOJ), Neópolis (TSE) e Sousa-PB (TPB)

Tratamentos	NC ^a					
	TMOJ		TSE		TPB	
Teste	12,50	A a	5,80	B a	9,00	A a
LEV 25	1,75	A b	1,80	A b	1,45	A b
LEV 47	1,30	A b	1,45	A b	1,95	A b
CV% = 10,90						

^a Médias seguidas por mesma letra maiúscula, entre colunas, e minúscula, entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Não foram verificadas relações parasíticas entre os antagonistas LEV 25 e LEV 47 e os isolados patogênicos. Contudo, testes bioquímicos comprovaram a presença de atividade “killer” no LEV 25.

Na árvore filogenética gerada a partir das regiões ITS-1, ITS-2 e 5.8 rDNA (Figura 3) dos 37 táxons avaliados (Tabela 1) todos os isolados de *Ceratocytis* sp. e *C. paradoxa* foram agrupados separadamente (100% de suporte) do isolado de *Fusarium oxysporum* utilizado como *outgroup*.

A partir do isolado de coqueiro da Colômbia, formaram-se três ramificações (99% bootstrap) num mesmo subclado. Nestas, os isolados de *C. paradoxa* provenientes de

coqueiros da Indonésia, agruparam-se separadamente (71% bootstrap) aos demais isolados que formaram um grupo monofilético com 78% de bootstrap, o que conferem aos isolados TMOJ, TSE e TPB identidades moleculares compatíveis à espécie *C. paradoxa*.

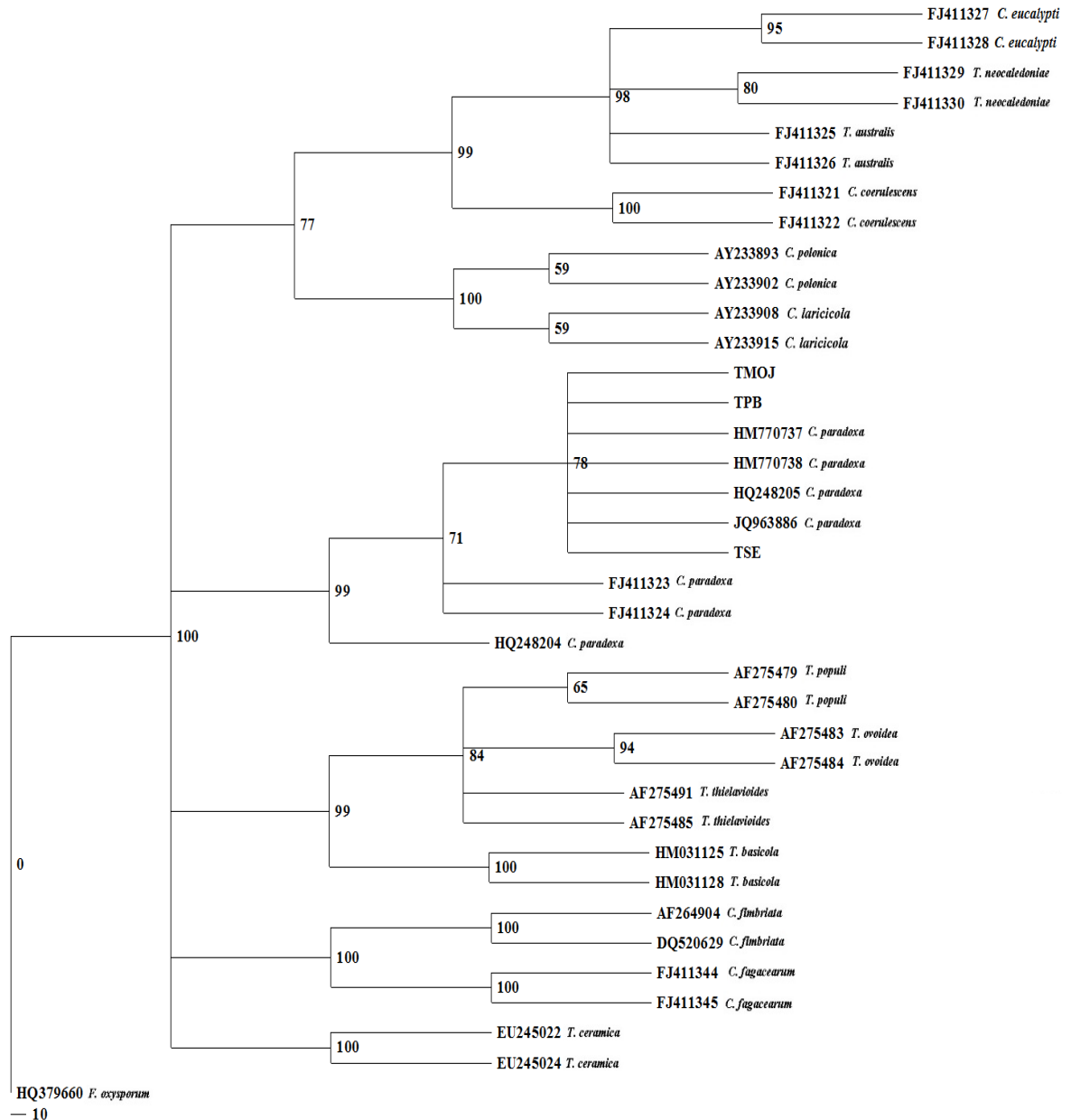


Figura 3 Filograma obtido pela análise de Máxima Parcimônia (MP) e Bootstreep (BO), com 100 repetições, de alinhamento de seqüências gênicas com 435 pb das regiões ITS-1, ITS-2 e 5.8 rDNA de *Thielaviopsis* spp. e *Ceratocystis* spp. em relação ao *Fusarium oxysporum* como *outgroup* (CI=0,699, HI=0,301, RI=0,879)

Discussão

Por serem microrganismos que fazem parte da microbiota epifítica e endofítica (Viana et al. 2012), em virtude da sua habilidade em colonizar a superfície dos diferentes tipos de planos vegetais, leveduras podem ser encontradas na superfície de frutos, independentemente do estágio de maturação. Além disso, o carpoplano é considerado substrato apropriado ao desenvolvimento delas (Valdebenito-Sanhueza 2000).

Álvarez et al. (2012) e Yu et al. (2012), na inoculação de *T. paradoxa* em mudas de palma de óleo e coqueiro, respectivamente, observaram sintomatologia necrótica semelhante à causada pelos isolados patogênicos TMOJ, TSE e TPB.

Para Costa-Carvalho et al. (2011), a temperatura é uma das variáveis climáticas fundamentais mais correlata no processo epidemiológico da resinose e a temperatura ótima para o crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *C. paradoxa* situa-se em torno de 28°C.

A relação patogênica observada entre os isolados de *C. paradoxa* e mudas de coqueiro-anão-verde, sob condições de temperatura superiores à considerada ótimas, pode estar relacionada a outros fatores ambientais como a umidade relativa e/ou fatores biológicos como a adaptabilidade deles às condições adversas, no entanto estudos minuciosos são necessários para elucidar essa questão.

A ação diferenciada observada na comparação dos métodos de aplicação ocorre porque, mesmo apresentando as capacidades citadas, leveduras podem se comportar diferentemente quanto a adaptação, colonização e ao potencial biocontrolador nesses nichos (Robiglio et al. 2011).

Segundo El-Tarabily e Sivasithamparam (2006), este comportamento é previsível em função da capacidade que antagonistas, provenientes da microbiota epifítica e endofítica vegetal, possuem quanto à colonização da superfície de folhas, frutos, flores e ferimentos em tecidos de plantas bem como de alta proliferação e adaptação nutricional mesmo em condições prevaletentes desfavoráveis.

Apesar de não ter havido diferença entre os métodos de inoculação, a aspersão, devido a sua praticidade, apresenta maior potencialidade de uso no manejo integrado da resinose do coqueiro do que a injeção. Além disso, ele evidenciou com maior intensidade leveduras potencialmente biocontroladoras com capacidade de colonização e sobreviverem no filoplano.

Resultados semelhantes de ação antagônica *in vitro* foram observados por Rosa et al. (2010) avaliando a ação antagônica *in vitro* de *Torulaspora globosa* sobre *Colletotrichum sublineolum* e Rosa-Magri et al. (2011) na avaliação da ação antagônica *in vitro* de *T. globosa* sobre *C. sublineolum* e *C. graminicola*. No primeiro desses trabalhos, além de inibir o crescimento do patógeno, *T. globosa* promoveu a deterioração das hifas próximas à área de atuação do halo de inibição. No segundo, o antagonista reduziu em 60,3% e 52,7% os crescimentos de *C. sublineolum* e *C. graminicola* respectivamente.

O tiofanato metílico, fungicida pertencente ao grupo do benzimidazóis, possui ação sistêmica-seletiva e atua no processo de divisão celular de fungos, interrompendo a formação da placa metafásica durante o processo mitótico (Reis et al. 2007). Por esta razão, quando utilizados inadequadamente e de forma contínua, além de representarem altos riscos ambientais e à saúde humana, resultam em uma forte pressão de seleção da população patogênica e, conseqüentemente, o surgimento de linhagens extremamente resistentes (Silva e Melo 1997).

Para Bettiol (1997), a seleção de antagonista é relativa a cada tipo de patossistema, ou seja, as chances de eficiência aumentam quando há seleção de organismos provenientes do mesmo ambiente onde são utilizados. Essa eficiência está relacionada, principalmente, ao mecanismo de competição por nutrientes e espaço, já que leveduras apresentam capacidades de rápida reprodução e assimilação de nutrientes no meio em que se encontram e desenvolvem-se inibindo outros microrganismos (El-Tarabily e Sivasithamparam 2006; Rosa et al. 2010). As leveduras também podem ter atuado por ação antibiótica, micoparasítica, produção de toxinas e participar na sucessão dos organismos nos quais desenvolvem suas populações, por ocasião da colonização de tecidos internos (Viana et al. 2012).

A ausência de ação antibiótica e presença da ação de metabólitos voláteis divergem dos resultados observados por e Rosa et al. (2010) que confirmou a redução do crescimento micelial do patógeno e da formação de halo na zona de inibição, mas não constatou semelhante ação inibitória de metabólitos voláteis por ação de leveduras.

Contrariando os resultados obtidos por El-Tarabily e Sivasithamparam (2006), que relataram a ocorrência de atividades líticas, degradação da parede micelial, inchaço, lesões e degeneração do protoplasma causados por isoaldos do gênero *Pichia* sobre *P. italicum* e *B. Cinerea*, não foi observada nenhuma ação parasítica de *P. guilliermondii* (LEV 25) e *C. dosseyi* (LEV 47) sobre os isolados patogênicos.

Segundo Coelho et al. (2003), o fator “killer” é a capacidade que determinadas cepas de leveduras, de vários gêneros incluindo *Candida* spp., possuem para a produção e liberação de peptídeos tóxicos no meio de cultivo que inibem o crescimento de outros microrganismos.

A atividade “killer” constatada em *P. guilliermondii* (LEV 25) diverge dos resultados obtidos por Chanchaichaovivat et al. (2008), que não constataram a presença desse fator em isolados de *P. guilliermondii* sobre *Colletotrichum capsici*, confirmando a particularidade das leveduras de mesma espécie quanto ao modo de ação antagônica.

Leveduras são consideradas promissores agentes de biocontrole e o gênero *Pichia* é um dos mais estudados (Viana et al. 2012). Vários trabalhos demonstram o potencial e a eficiência de *P. guilliermondii* no controle de doenças pós-colheita em frutos (Chanchaichaovivat et al. 2008; Lahlali et al. 2011; Zhang et al. 2011). A espécie *C. dosseyi*, por sua vez, foi recentemente descoberta associada a insetos da ordem Neuroptera (Nguyen et al. 2007) e possui registro de um produto para fins de pesquisa (*Candida dosseyi* (ATCC® MYA4359™). Contudo, não foram recuperados trabalhos de leveduras no controle do agente causal da resinose do coqueiro, assim como estudos referentes ao controle da doença em campo, sendo este o primeiro relato dessas espécies de leveduras aplicadas ao biocontrole dessa enfermidade.

Na identificação filogenética dos isolados patogênicos, nos isolados que se apresentaram em ramos separados verifica-se uma distância filogenética que pode ser decorrente da adaptabilidade deles em relação ao hospedeiro por meio de mutações gênicas. Resultados semelhantes foram observados por Álvarez et al. (2012) e Pinho et al. (2013), nos quais os isolados avaliados também apresentaram ramificações num mesmo subclado. Os primeiros desses autores sugerem que estudos sobre isolados patogênicos, provenientes de hospedeiros de diferentes genótipos, devem ser realizados para que se possa avaliar as resistências decorrentes dessa interação. Os segundo deles, por sua vez, ressaltam a necessidade de ampliar os estudos utilizando sequências de regiões gênicas, pois sequências de regiões gênicas de isolados de *C. paradoxa*, provenientes de coqueirais brasileiros, são escassas e tornam laboriosa a avaliação da variabilidade e o agrupamento dos isolados dessa espécie.

Com base nos resultados observou-se que tecidos de coco imaturo são adequados à obtenção de leveduras potencialmente biocontroladoras à resinose e estas comportam-se diferentemente quanto a adaptação, colonização e ao potencial biocontrolador em mudas de coqueiro-anão-verde; Os métodos de aplicação de suspensão de leveduras por aspersão e

injeção, permitem selecionar isolados antagonistas promissores; Os isolados de *P. guilliermondii* (LEV 25) e *C. dosseyi* (LEV 47) são biocontroladores de *C. paradoxa* em mudas de coqueiro-anão-verde e apresentam potencialidade de uso no manejo integrado da resinose do coqueiro; Este é o primeiro relato da redução dos sintomas de resinose em mudas de coqueiro-anão-verde pela ação antagônica de leveduras sobre *C. paradoxa*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa; à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia e ao Instituto Agronômico de Pernambuco, pela disponibilização de estrutura para realização do trabalho; à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e à Embrapa Amazônia Oriental (EMBRAPA-CPATU) pelo auxílio nos processos de identificação morfológica e molecular.

Referências

- Álvarez, E., Ilano, G. A., Loke, J. B. & Chacon, M. I. (2012). Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* Isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil. *Journal of Phytopathology*, 160(1), 690-700.
- Bettiol, W. (1997). Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: W. C. da Luz (Org.). (Ed), *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas.
- Carvalho, J. M. de, Maia, G. A., Sousa, P. H. M. de & Maia Jr., G. A. (2006). Água-de-coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. *Semina: Ciências Agrárias*, 27(3), 437-452.
- Chanchaichaovivat, A., Panijpan, B. & Ruenwongsa, P. (2008). Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biological Control*, 47(1) 207-215.
- Coelho, A. R., Hoffmann, F. L. & Hiporooka, E. Y. (2003). Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. *Semina: Ciências Agrárias*, 24(2), 337-358.

- Costa-Carvalho, R. R. da., Warwick, D. R. N., Souza, P. E. & Carvalho Filho, J. L. S. (2011). Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. *Scientia Plena*, 7(9) 1-5.
- Coumans, J. V. F., Harvey, J.; Backhouse, D., Polijak, A.; Raftery, M. J., Nehl, D., Katz, M. E. & Pereg, L. (2011). Proteomic assessment of host-associated microevolution in the fungus *Thielaviopsis basicola*. *Environmental Microbiology*, 13(3), 576-588.
- El-Tarabily, K. A. & Silvasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plants growth promoters, *Mycoscience*, 47(1), 25-35.
- FAO (2011). *World Production*. <http://www.faostat.org.br>. Accessed 10 January 2013.
- Ferraz, L. G. B., Aragão, W. M., Silva, D. A. da, Nascimento, J. C. B. & Silva Filho, J. S. da. (2009a). Coqueiro ‘anão-verde’ (*Cocos nucifera* L.). In: A. C. L. Mello. *Cultivares recomendadas pelo IPA para a Zona da Mata de Pernambuco* (pp. 99-106). Recife: Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco.
- Ferraz, L. G. B., Silva, A. B. da, Nunes Filho, J., Sousa, A. R. de & Santos, V. F. dos. (2009b) Sugar cane cake and mineral fertilizers on coconut (*Cocos nucifera* Linn.) seedlings. *Cord*, 25(2), 45-55.
- Ferraz, L. G. B., Assis, T. C., Gonçalves, A. P. S. & Andrade, D. E. G. T. (2012). Resinose em coqueiro na faixa litorânea de Pernambuco. In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus. *Tropical Plant Pathology*, 37 (suplemento).
- Ferreira, J. M. S., Fontes, H. R. & Procópio, S. O. (2007). *Resinose do coqueiro: como identificar e manejar*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/365232>. Accessed 10 January 2013.
- Ferreira, J. M. S., Fontes, H. R. & Procópio, S. O. (2007). *Resinose do coqueiro: como identificar e manejar*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/365232>. Accessed 10 January 2013.
- Fontes, H. R., Procópio, S. O., Cargnelutti Filho, A., Ferreira, J. M. S. & Fernandes, M. F. (2009) Avaliação de diferentes herbicidas para a erradicação química de coqueiros infectados com resinose. *Planta Daninha*, 27(4), 849-857.
- Fontes, H. R. & Wanderley, M. (2006). Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil. Documentos, 64. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2006/doc-94.pdf. Accessed 10 January 2013.
- Freire, F. das, C. O; Martins, M. V. V. (2010). Confirmação da ocorrência do sangramento do caule do coqueiro no estado do Ceará. *Essentia*, 12(1), 31-39.

- Heath, R. N., Wingfiel, D. M. J., Wingfield, B. D., Meke, G., Mbagi, A. & Roux, J. (2009) *Ceratocystis* species on *Acacia mearnsii* and Eucalyptus spp. in eastern and southern Africa including six new species. *Journal Fungal Divers*, 34(1), 41-67.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011a). Sidra 2003: sistema IBGE de recuperação automática. <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Accessed 22 May 2013.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011b). Sistema IBGE de recuperação automática. <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>. Accessed 22 May 2013.
- Lahlali, R., Hamadi, Y., El Guilli, M. & Jijakli, M. H. (2011). Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus mold in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. *Biological Control*, 56(1) 217-224.
- Marin, M., Preising, O., Wingfield, B. D., Kirisits, T., Yamaoka, Y. & Wingfield, M. J. (2005). Phenotypic and DNA sequence data comparisons reveal three discrete species in the *Ceratocystis polonica* species complex. *Mycological Research*, 109(10), 1137-1148.
- Morais, L. A. S. de. (2009). Óleos essenciais no controle fitossanitário. In W. Bettiol & M. A. B. Morandi (Ed.), *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva* (pp. 139-141). Jaguariúna: EMBRAPA CNPMA.
- Navia, M., Romero, H. M., Rodriguez, J., Velez, D. C. & Martinez, G. (2010). Molecular identification of microorganisms associated with oil palm bud rot disease. Abstracts. Caribbean Division Meeting, <http://www.apsnet.org/members/divisions/carib/meetings/Pages/2010MeetingAbstracts.aspx>. Accessed 10 April 2013.
- Nguyen, N. H.; Suh S. & Blackwell, M. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and other insects. *Mycologia*, 99(6), 842-858.
- Paulin-Mahady, A. E., Harrington, T. C. & McNew, D. (2002). Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. *Mycologia*, 94(1), 62-72.
- Pinho, D. B., Dutra, D. C. & Pereira, O. L. (2013). Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38(2), 152-157.
- Rajmohan, N., Gianfagna, T.J., Meca, G., Moretti, A. & Zhang, N. (2011). Molecular identification and mycotoxin production of *Lilium longiflorum*-associated fusaria isolated from two geographic locations in the United States. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 631-642.

- Reis, E. M., Forcelini, C. A. & Reis, A. C. (2007). Classificação de fungicidas: uma nova abordagem. In: E. M. Reis, C. A. Forcelini, & A. C. Reis. (Ed.), *Manual de fungicidas* (pp.20-46) Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo.
- Robiglio, A., Sosa, M. C., Lutz, M. C., Lopes, C. A. & Sangorrín, M. P. (2011). Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1) 211-216.
- Rosa, M. M., Tauk-Tornisielo, S. M., Rampazzo, P. E. & Ceccato-Antonini, S. R. (2010). Evaluation of the biological control by yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorgum. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 26(1) 1491-1502.
- Rosa-Magri, M. M., Tauk-Tornisielo, S. M., & Ceccato-Antonini, S. R. (2011). Bioprospection of yeast as biocontrol agents against phytopathogenic molds. *Brazilian Archives of Biology Technology*, 54 (1), 1-5.
- Silva, C. M. M. da & Melo, I. S. de. (1997). Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. In: I. S. de Melo & J. L. de Azevedo (Ed.), *Microbiologia ambiental* (pp. 141-165). Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA.
- Suwandi, S., Akino, S. & Kondo, N. (2012). Common Spear Rot of Oil Palm in Indonesia. *Plant Disease*, 96(4), 537-543.
- Tremacoldi, C. R. & Lins, P. M. P. (2011). Inibição do crescimento micelial in vitro de *Thielaviopsis paradoxa* com a utilização de fungicidas sistêmicos e de contato. Boletim Técnico, 75. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/921229/1/OrientalBPD75.pdf>. Accessed 10 January 2013.
- Valdebenito-Sanhueza, R.M. (2000). Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: I. S. de Melo & J. L. Azevedo (Ed.). *Controle biológico* (pp. 41-55). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Van Wyk, M., Wingfield, B. D., Clegg, P. A. & Wingfield, M. J. (2009). *Ceratocystis larium* sp. nov., a new species from *Styrax benzoin* wounds associated with incense harvesting in Indonesia. *Persoonia*, 22 (1), 75-82.
- Viana, F. M. P., Lima, J. R. & Lima, J. S. (2012). Leveduras no controle de doenças pós-colheita de frutas. In: R. S. I. Farina & B. L. Araújo (Ed.), *Revisão Anual de Patologia de Plantas* (pp. 125-140). Passo Fundo: RAPP.
- Warwick, D. R. N. & Passos, E. E. M. (2009) Outbreak of stem bleeding coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 175-177.

- Yu, F. -Y., Niu, X. -Q., Tang, Q. -H., Zhu, H., Song, W. -W. & Qin, W. -Q. (2012). First report stem bleeding in coconut caused by *Ceratocysts paradoxa* in Hainan, China. *Plant Disease*, 96(2), 290-290.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M. L. (2011). Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biological Control*, 57(1), 193-201.

Conclusões gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- O tecido do epicarpo do coco imaturo é adequado à obtenção de leveduras antagonistas a *C. paradoxa*.
- Os métodos de aspersão e injeção de suspensão de células de leveduras são eficazes para evidenciar isolados antagonistas.
- Leveduras comportam-se diferentemente quanto a adaptação, colonização e ao potencial biocontrolador em mudas de coqueiro-anão-verde.
- Os isolados *P. guilliermondii* (LEV 25) e *C. dosseyi* (LEV 47) inibem o crescimento micelial, a esporulação e reduzem sintomas de resinose em mudas de coqueiro-anão-verde causada por *C. paradoxa*.
- Os isolados *P. guilliermondii* (LEV 25) e *C. dosseyi* (LEV 47) apresentam potencialidade de uso no manejo integrado da resinose do coqueiro.
- Este é o primeiro relato da redução dos sintomas de resinose em mudas de coqueiro-anão-verde pela ação antagônica de leveduras sobre *C. paradoxa*.