

ANTAGONISMO DE LEVEDURAS AO AGENTE ETIOLÓGICO DA MURCHA DE CERATOCYSTIS EM CACAUEIRO

Giselle de Souza Rodrigues¹, Antônio Pimenta Neto², Dilze Maria Argôlo Magalhães³, Andréa Miura da Costa⁴, Edna Dora Martins Newman Luz³

¹Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)/Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PPGPV), Rodovia Ilhéus/Itabuna, km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil, igisele@hotmail.com; ²Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Rua Manuel de Medeiros, s/n - Dois irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. pimenta_dm@yahoo.com.br; ³Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac)/Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec), Rod. Ilhéus-Itabuna, km 22, 45600-970, Ilhéus, Bahia, Brasil, dilze.argolo@yahoo.com.br, ednadora@yahoo.com.br; ⁴UESC/Departamento de Ciências Biológicas, amcosta@uesc.br.

Ceratocystis cacaofunesta é o causador da Murcha de Ceratocystis em cacaueiro, doença vascular de difícil controle. O tratamento de injúrias antes da penetração do patógeno utilizando leveduras como agentes de biocontrole (ABCs) pode ser promissor, pois são excelentes colonizadoras de ferimentos. Objetivou-se testar o potencial antagonista de onze leveduras isoladas do filoplano de cacaueiro contra *C. cacaofunesta*. Avaliou-se: i) confronto *in vitro* dos ABCs e patógeno e inibição da germinação de esporos do patógeno pelo secretoma dos antagonistas; ii) efeito dos ABCs na formação de peritécios do patógeno sobre discos de folhas; iii) tratamento de sementes e irrigação da rizosfera com suspensão de ABCs; iv) antagonismo em mudas estaqueadas. As leveduras 23, 92, 161, 165, 166, 169 e 174 paralisaram o crescimento do patógeno no 11º dia de avaliação. Os ABCs reduziram a germinação de esporos do patógeno. Em discos de folhas, as leveduras inibiram a formação de peritécios. No tratamento de sementes nenhum tratamento diferiu da testemunha inoculada e todos diferiram da testemunha absoluta. Em mudas estaqueadas, os isolados LEV034 e LEV101 foram superiores aos demais tratamentos apresentando menores percentuais de mortalidade de plantas. Os resultados demonstram possibilidade de utilizar as leveduras LEV034 e LEV101 (*Rhodosporidium paludigenum*) como ABCs para *C. cacaofunesta*.

Palavras-chave: *Ceratocystis cacaofunesta*, *Theobroma cacao*, controle biológico.

Antagonism of yeast isolates to the etiological agent of ceratocystis wilt in cocoa. *Ceratocystis cacaofunesta* is the causal agent of Ceratocystis Wilt in cocoa, a vascular disease difficult to control. There is the possibility of treating injuries with yeast as biocontrol agents (BCAs) prior to the pathogen arrival once yeasts, are excellent wound colonizers. The objective of this work was to test the antagonistic potential of eleven yeasts isolates obtained from cacao plants phylloplane against *C. cacaofunesta*. We evaluated: i) the antagonism by confronting BCAs with the pathogen *in vitro* and the germination inhibition of spores of pathogen by antagonist's secretoma; ii) the effect of BCAs on pathogen's perithecia formation over inoculated leaf discs; iii) the seeds treatment and irrigation of the soil surface with BCAs; iv) the yeast's performance in cacao cuttings inoculated with the pathogen. Yeasts isolates 23, 92, 161, 165, 166, 169 and 174 paralyzed the pathogen growth on the 11th day of evaluation. The BCAs reduced the pathogen spores germination and inhibited to perithecia formation over inoculated leaf discs. None of the yeasts isolates was effective when used to treat seeds, but when cutting roots were treated with BCAs suspensions before the inoculation the isolates LEV034 and LEV101 were superior to other treatments showing lower percentages of plants mortality. It was demonstrated that yeasts isolates LEV034 and LEV101 (*Rhodosporidium paludigenum*) have potential to control *C. cacaofunesta*.

Key words: *Ceratocystis cacaofunesta*, *Theobroma cacao*, biological control.

Introdução

Um dos principais fatores limitantes ao cultivo do cacaueteiro é a ocorrência de doenças, dentre as quais se destaca a Murcha de *Ceratocystis*, causada pelo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbr. & T.C. Harr., citado até 2005 como *C. fimbriata* Ellis & Halsted (1890). Esta enfermidade é uma doença letal (Oliveira; Luz, 2005) e o fungo possui penetração indireta, necessitando de aberturas para poder invadir a planta. Desta forma, ferimentos ocasionados pelos tratamentos culturais e pela abertura de galerias por coleobrocas são citados como vias de penetração na planta. As ferramentas, especialmente por ocasião da poda e da desbrota, podem introduzir o patógeno nas plantas e contribuem na disseminação dos propágulos do fungo de uma planta infectada para outra sadia (Sanches, 2007; Oliveira; Luz, 2005).

Métodos de controle desta doença tem sido baseados principalmente na utilização de plantas resistentes e manejo cultural, a fim de eliminar fontes de inóculo e disseminação da doença (Oliveira; Luz, 2012). O controle químico com uso de fungicidas protetores ou sistêmicos, até o momento, não propiciou resultados plenamente satisfatórios (Albuquerque et al., 2005). O controle biológico para esta doença, até o presente, não foi testado, todavia pode ser uma alternativa viável e promissora a ser inserida em programas de manejo da Murcha de *Ceratocystis* em cacaueteiro. O controle integrado é uma estratégia que tem sido recomendada, visto que combina dois ou mais métodos de tratamentos, objetivando superar o desempenho e aumentar a eficácia das técnicas existentes (Ferreira et al., 2015).

As leveduras são organismos adequados à utilização como agentes de biocontrole (ABC) devido à sua alta capacidade de colonizar superfícies vegetais e manterem-se viáveis durante longos períodos de tempo sob diferentes condições ambientais (Pimenta et al., 2009). Composto a microbiota epifítica e endofítica de plantas (Valdebenito-Sanhueza, 2000), podem ser extraídas para utilização no controle biológico, com a vantagem de que são fenotipicamente mais adaptadas ao meio (Fialho, 2004). *Sporobolomyces roseus* Kluyver & C.B. Niel e algumas leveduras dos gêneros *Rhodospiridium* e *Rhodotorula* têm demonstrado um elevado potencial

como agentes de biocontrole (Melo, 2012; Coelho et al., 2011; Alves, 2007), assim como *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman possui ampla faixa de ação contra fungos (Lu et al., 2014).

Mediante o potencial das leveduras no controle biológico de patógenos, objetivou-se testar leveduras extraídas do filoplano de cacaueteiro quanto ao antagonismo a *C. cacaofunesta*, a fim de oferecer novos subsídios para o controle da Murcha de *Ceratocystis* do cacaueteiro.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos na Seção de Fitopatologia da Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, 14°75'54,23"S, 39°23'11,35"W), município de Ilhéus - Bahia. O isolado do fitopatógeno *Ceratocystis cacaofunesta* testado foi o Cc20, na concentração de 3×10^4 UFC/mL. Os antagonistas utilizados foram oriundos do filoplano de folhas do cacaueteiro: como *Spodobolomyces roseus* (isolado LEV001), *Rhodotorula* sp. (isolado LEV161), *Rhodospiridium paludigenum* (isolados LEV023, LEV034, LEV092, LEV165, LEV166, LEV169, LEV170 e LEV174). Um único isolado, LEV101, foi oriundo da flor. No total foram obtidos 11 isolados de leveduras.

A concentração dos antagonistas utilizada nos experimentos foi de 1×10^8 UFC/mL.

Avaliação do potencial dos agentes de biocontrole em testes *in vitro*

No primeiro experimento exerceu-se a técnica de confronto direto em placas de Petri (Dennis; Webster, 1971), em que se utilizou um funil de vidro para dispor as leveduras circundando o disco de micélio do fitopatógeno pela borda da placa de Petri. Ambos, antagonista e patógeno, foram colocados no mesmo dia. O controle continha apenas o disco de micélio do Cc20 no centro da placa. Neste experimento testaram-se oito isolados de folhas: LEV023, LEV092, LEV161, LEV165, LEV166, LEV169, LEV170 e LEV174. As placas foram vedadas e incubadas a 28°C em BOD, no escuro. O crescimento médio radial das colônias do patógeno a cada 24 h foi utilizado para medir a inibição provocada pelo antagonista em função do crescimento nas placas sem o antagonista. O

experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições por tratamento.

Foram preparadas suspensões de leveduras na concentração de 1×10^8 UFC/mL e colocadas em meio de cultura líquido batata-dextrose. As suspensões foram incubadas em BOD com temperatura de 28°C, no escuro. Após o período de 48 h, as suspensões foram filtradas em gaze e papel filtro, centrifugadas a 7000 rpm por 15 minutos e retirado o sobrenadante, secretoma, para ser utilizado no experimento. Para avaliar a inibição da germinação de esporos do patógeno pelos antagonistas, foram testadas as mesmas oito leveduras do experimento anterior. Placas de Petri contendo ágar-água foram divididas em seis quadrantes. Alíquotas da suspensão do patógeno foram adicionadas ao secretoma do antagonista em seis concentrações do antagonista: 90, 75, 50, 25, 10 e 0%, colocadas em tubos de 2 mL, agitadas por 30 segundos e, posteriormente, colocou-se uma alíquota de 10 µL da mistura em cada quadrante. As placas foram incubadas em BOD, a 28°C, no escuro por 6 h, quando se colocou uma gota de lactofenol + azul de algodão. A contagem dos esporos de *C. cacaofunesta* germinados e não germinados foi realizada em microscópio ótico, perfazendo um total de 100 esporos por campo, utilizando a objetiva de 10x. Por fim, calculou-se o percentual de inibição aplicando-se a fórmula: Percentual de inibição (%) = [(Média das Testemunhas - Média do Tratamento)/Média das Testemunhas] × 100. Os valores foram comparados pelo teste de Scoot-knott ($p < 0,05$) no Sisvar® (Ferreira, 2011).

Efeito dos biocontroladores em testes *in vivo*.

Na avaliação *in vivo* utilizou-se o clone CCN51, susceptível à Murcha de Ceratocystis (Silva et al., 2004), e três métodos de inoculação: 1) discos de folhas (Magalhães et al., 2016); 2) tratamento de sementes com antagonistas e inoculação do patógeno em mudas de cacauero (Silva et. al., 2012) e; 3) tratamento de raízes de mini estacas.

No primeiro experimento *in vivo*, folhas coletadas de plantas saudáveis e sanitizadas com álcool 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e água estéril foram feridas na nervura central com um bisturi e discos de 1,5 cm de diâmetro foram cortados. Após, estes foram imersos nas suspensões dos antagonistas por cinco minutos e, posteriormente, arrumados com a nervura para cima

em caixas contendo espuma umedecida com água estéril, para simular uma câmara úmida, e incubadas a 28 °C em BOD, no escuro. Após 24 h, inoculou-se o Cc20, arrastando a gota pela nervura central do disco. Quatro dias depois se contou o número de peritécios formados na superfície dos discos. Os discos controle foram imersos em água estéril 24 h antes da inoculação com o Cc20. O experimento foi montado em DIC, com nove tratamentos (LEV023, LEV092, LEV161, LEV165, LEV166, LEV169, LEV170, LEV174 + testemunha) e 10 repetições contendo seis unidades experimentais.

No segundo experimento *in vivo*, sementes foram despeletizadas e colocadas para pré-germinação por 24 h em água corrente. Com a radícula emitida, as sementes foram mergulhadas nas suspensões dos antagonistas por 12 h e posteriormente plantadas em sacos contendo a mistura solo e substrato na proporção de 2:1, previamente esterilizada em autoclave por duas vezes consecutivas. Duas doses de 10 mL da suspensão de cada antagonista foram aplicadas aos 15 e aos 30 dias antes da inoculação do patógeno. Estando as mudas com 150 dias de idade, procedeu-se a inoculação de *C. cacaofunesta* no caule das plantas em incisão com bisturi, no sentido diagonal descendente acima do primeiro entrenó das plantas. A avaliação foi realizada 22 dias depois da inoculação do fitopatógeno, quantificando-se: número de plantas vivas; área da lesão nas plantas sobreviventes; peso da parte aérea e do sistema radicular e; altura e diâmetro das plantas. Este experimento foi disposto em blocos ao acaso, com oito tratamentos com antagonistas oriundos de folhas (LEV023, LEV092, LEV161, LEV165, LEV166, LEV169, LEV170 e LEV174), uma testemunha inoculada e uma testemunha absoluta, cada tratamento com nove repetições e cada repetição com cinco unidades experimentais.

Para o teste de antagonismo provocado por leveduras em mudas estaqueadas enraizadas em espuma fenólica, estacas coletadas de cacaueros dos clones CEPEC 2002, CCN51 e PS1319 foram colocadas para enraizar em espuma fenólica, sendo primeiro tratadas na base com ácido indol-butírico (AIB) e colocadas em câmara de nebulização para manter a atmosfera saturada a 100% de umidade relativa na superfície das folhas, por 15 segundos a

cada cinco minutos entre as 6 h e 18 h e por 15 segundos a cada hora das 18 às 6 h do dia seguinte (Sodré et al., 2012). Após 60 dias, quando se notava a presença de raízes, as mesmas foram cortadas rente à base da espuma fenólica com o auxílio de uma tesoura. O sistema radicular de 18 mudas de cada clone foi imerso por 24 h na suspensão de cada uma das leveduras. As suspensões de três diferentes isolados de leveduras: oriundos de folhas (LEV001, LEV034) e da flor (LEV101) foram calibradas em hemacitômetro à concentração de 1×10^8 UFC/ml. O sistema radicular das testemunhas foi imerso em água destilada esterilizada por igual período. No dia seguinte foram escorridas as suspensões das leveduras das bandejas e os sistemas radiculares foram imersos por 24 h em 1 litro da suspensão do isolado Cc20 de *C. cacaofunesta*, incluindo as testemunhas (Magalhães et al., 2015). Durante todo o processo de inoculação as plantas permaneceram em câmara úmida. O delineamento experimental consistiu de blocos casualizados (cinco) com 30 plantas de cada um dos quatro clones: JACA, CCN 51, PS1319 e CEPEC 2002. Cada clone foi inoculado com os três isolados de leveduras (LEV034, LEV101 e LEV001), sendo que para o isolado 101 houve dois tratamentos: em um deles a inoculação foi realizada apenas no sistema radicular, e no outro, além desta inoculação, foi borrifado o ABC sobre a parte aérea de igual número de mudas. O número de plantas mortas foi avaliado e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$) no software SAS® 2004.

Resultados e Discussão

No confronto com as leveduras, dos oito isolados testados, sete LEV23, LEV92, LEV161, LEV165, LEV166, LEV169 e LEV174 paralisaram completamente o crescimento do patógeno no 11º dia de avaliação, enquanto que ao 13º dia a testemunha (Cc20 sem confronto) tomou completamente a superfície da placa de Petri, com colônias de aproximadamente 80 mm de diâmetro – e destas, somente LEV165 e LEV174 controlaram o desenvolvimento das colônias de *C. cacaofunesta* a partir do décimo dia de avaliação. Todos os tratamentos foram estatisticamente iguais, mas diferiram significativamente da testemunha.

Analisando o aspecto das colônias, observou-se menor formação de peritécios e micélio nas colônias confrontadas quando comparadas à testemunha (Figura 1). Algum composto, volátil ou não, inibiu o desenvolvimento tanto vegetativo quanto reprodutivo do *C. cacaofunesta*. Sob esta perspectiva, pode-se dizer que houve inibição satisfatória por parte das leveduras testadas como antagonistas.

Mello et al. (2011) afirmam que, em seus experimentos, as leveduras apresentaram baixa eficiência para controle da podridão mole (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). Em testes *in vitro*, Mello (2012) concluiu que dos 60 isolados testados nenhum inibiu satisfatoriamente o crescimento de *Acidovorax citrulli*, causador da mancha aquosa em meloeiro.

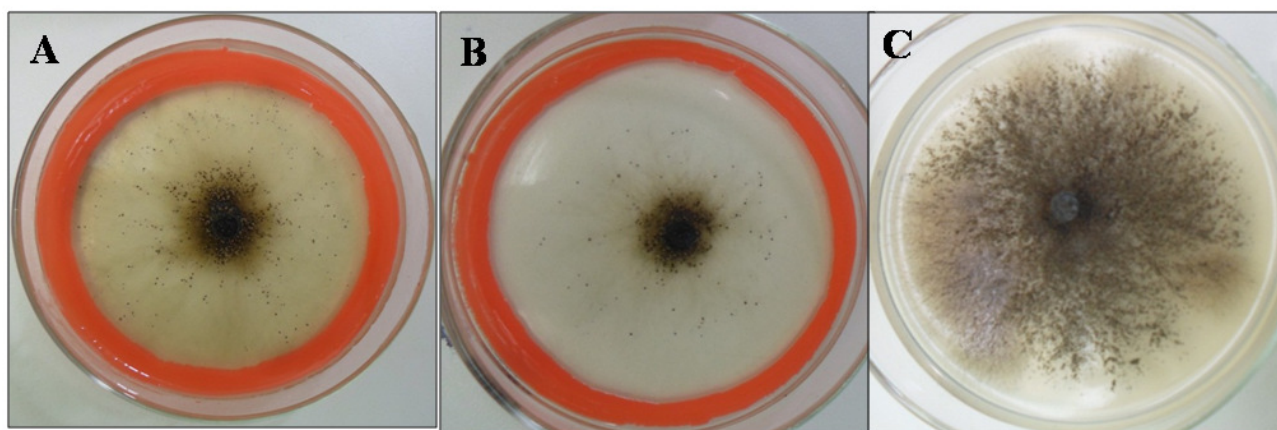


Figura 1 - Colônias de *Ceratocystis cacaofunesta* (isolado Cc 20) em confronto com isolados de leveduras no 13º dia de avaliação. Isolado LEV92 (A); isolado LEV170 (B); testemunha (C).

Todos os isolados de leveduras usadas como antagonistas inibiram, em maior ou menor porcentagem, a germinação de esporos do patógeno (Figura 2). Pode-se observar que a variação foi significativa para todos os isolados pela comparação de médias entre linhas. No entanto, não foi possível determinar qual concentração do secretoma seria ideal, uma vez que os resultados obtidos sugerem que cada isolado tem o seu melhor desempenho em concentrações específicas. A concentração de 90% dos secretomas das leveduras não foi a melhor para nenhum dos isolados e não deve ser usada em pesquisas posteriores, pois teve ação contrária ao esperado, diminuindo e não aumentando a inibição da germinação dos esporos do patógeno.

A porcentagem máxima de inibição em todo o experimento, 81,7% foi obtida pelo isolado LEV169 à concentração de 75% do secretoma, enquanto a menor foi de 32% com a LEV92 na concentração de 90% do secretoma. Cada isolado teve melhor atuação em determinada concentração do secretoma com destaque para o isolado de *Rhodospordium paludigenum* (LEV169) que em todas as concentrações esteve entre os isolados que causaram as mais altas porcentagens de inibição, variando de 81,7 (75% do secretoma) à 70% (90% do secretoma), demonstrando o alto potencial desta levedura para ser utilizada no controle biológico da Murcha de *Ceratocystis*.

Outra levedura que pode ser ressaltada é o isolado LEV170, também de *R. paludigenum*, que não foi distinto de LEV169 para as concentrações de secretoma entre 10 a 50%, causando inibições entre 73,3 e 76,8% da germinação de esporos de *C. cacaofunesta*. Portanto, estes dois isolados de *R. paludigenum*, entre os testados, são os que apresentam melhores potenciais para atuar como agente biocontrolador de *C. cacaofunesta*, pelo menos, atuando na redução da produção e germinação dos esporos deste patógeno.

As demais leveduras testadas tiveram o seu melhor desempenho a diferentes concentrações do secretoma. O isolado LEV92 foi o que menos inibiu a germinação do patógeno em todas as concentrações testadas, e seu melhor percentual de inibição foi de 60% à 50% de diluição do secretoma. Este isolado pertence à mesma espécie do LEV169 e ambos foram extraídos de folhas de cacauero, demonstrando haver variação na atuação de isolados da mesma espécie como agentes biocontroladores.

Souza et al. (2014) verificaram que as leveduras interferiram na produção de esporos de *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius* isoladas do café em duas concentrações de suspensão de esporos dos antagonistas a 40 e 80%. Quando *Pichia burtonii* foi utilizada na maior concentração, houve um melhor efeito inibitório sobre o crescimento e a esporulação do patógeno. No presente trabalho, verificou-se que

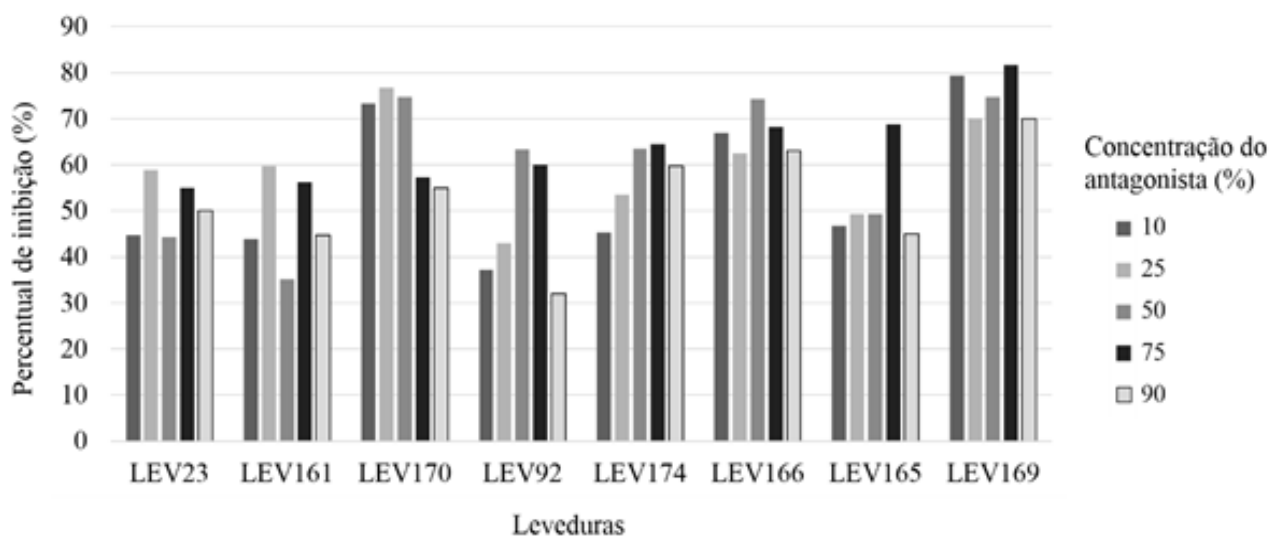


Figura 2 – Inibição da germinação de esporos de *Ceratocystis cacaofunesta* quando tratados com seis concentrações de secretoma das leveduras.

mesmo em baixas concentrações do antagonista houve inibição da germinação dos esporos, visto que a maior concentração não correspondeu aos melhores percentuais de inibição.

No experimento em discos de folhas o que apresentou melhor potencial biocontrolador entre as leveduras foi o isolado LEV170, que causou 89,7% de inibição na formação de peritécios pelo patógeno, seguido de LEV092, LEV174, LEV165, LEV23, LEV166, LEV161 e LEV169 que foram estatisticamente iguais, e apresentaram percentuais de inibição entre 68,3 e 84,7%. Portanto, todos os tratamentos diferiram da testemunha e inibiram o patógeno (Figura 3).

Fokkema e Meulen (1976) utilizando folhas de trigo, obtiveram reduções de 50% na infecção causada por *Septoria nodorum* com a aplicação de *Sporobolomyces roseus*, *Aureobasidium pullulans* e *Cryptococcus laurentii* var. *florescens*, residentes na filosfera de trigo. Enquanto em cacauieiro, no presente trabalho, o percentual de inibição do patógeno foi superior aos destes autores, variando entre 68,3 e 89,7%, provocado pelos isolados LEV169 e LEV170, respectivamente, da levedura *R. paludigenum*.

Três isolados de leveduras (LEV034, LEV101 e LEV001) foram aplicados nas raízes (todos) e

também pulverizados na planta (LEV101) de mudas enraizadas em espuma fenólica (Figura 4) e inoculadas posteriormente imergindo as raízes na suspensão de esporos e fragmentos de micélio do patógeno. Nestas condições, LEV034 e LEV101 (A - pulverizado e aplicado na raiz) foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos, com percentuais de mortalidade de 15 e 15,9%, respectivamente. Os isolados LEV001 e LEV101 (B - somente aplicado na raiz) foram semelhantes entre si, com 19,5 e 20,4% de mortes, respectivamente (Figura 5). Das 113 plantas mortas, 29,2% foram da testemunha, que foi diferente dos tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Estes valores indicam que houve redução da mortalidade das mudas em função do uso de leveduras.

O clone “Jaca” é resistente à Murcha de *Ceratocystis* (Silva et al., 2004), por este motivo, nenhuma das plantas morreu ao ser inoculada com o patógeno, quer tenham sido tratadas com leveduras ou não.

Em plântulas de meloeiro pulverizadas com isolados de *Rhodotorula aurantiaca* e *R. glutinis*, não foram observados sintomas da mancha aquosa provocada por *A. citrulli*, indicando 100% de controle da doença (Melo, 2012). Elencando que a pulverização de

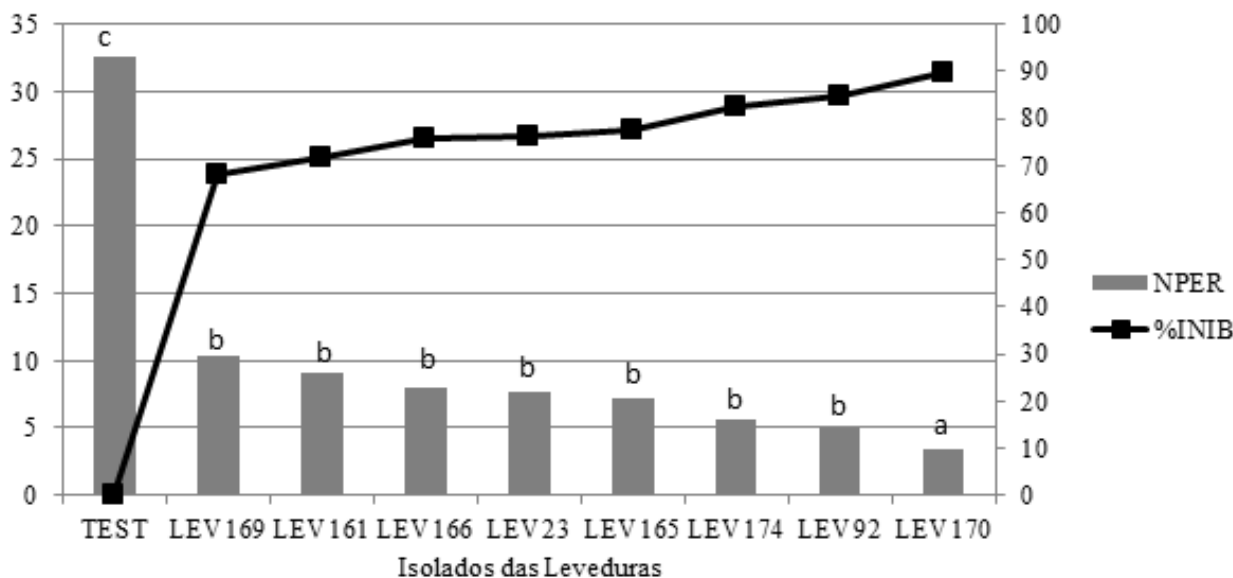


Figura 3 – Número médio de peritécios formados em 60 discos de folhas tratados com suspensão das leveduras na concentração de 1×10^8 UFC/mL 24 h antes da inoculação com *Ceratocystis cacaofunesta* e porcentagem de inibição dos antagonistas em relação à testemunha inoculada com o patógeno.



Figura 4 - Mudanças estaqueadas na câmara de nebulização para enraizamento.

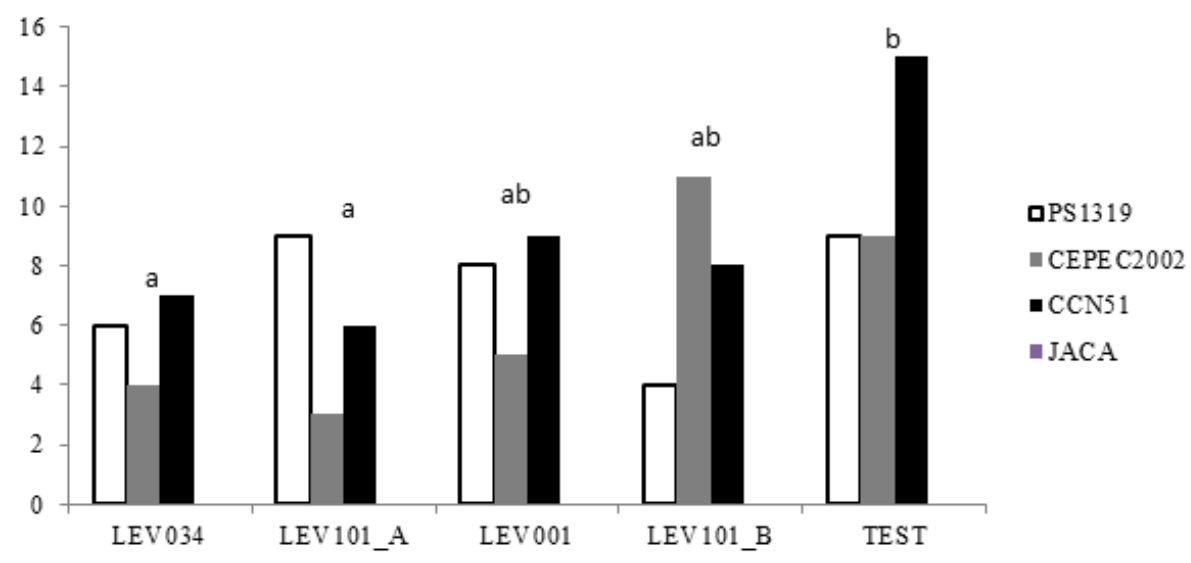


Figura 5 - Porcentagem de mudas enraizadas de quatro clones de cacau morto por *Ceratocystis cacaofunesta* mediante a presença dos isolados de leveduras, tendo como testemunha de resistência o cacau JACA.

leveduras é uma metodologia que apresenta bons resultados de controle de patógenos, pois as mesmas colonizam a superfície da planta e impede ou reduz o estabelecimento de patógenos, assim como ocorreu pulverizando a planta com o isolado LEV101, que foi melhor do que quando somente aplicado na raiz.

Quando aplicadas as leveduras em plantas de CCN51 aos 150 dias de idade em condições de casa de vegetação, houve uma grande mortalidade das plantas em todos os tratamentos, com exceção da testemunha absoluta; na qual todas as plantas permaneceram sadias, até o 22º dia após a inoculação, quando foi feita a avaliação do experimento. O mesmo ocorreu nas duas repetições do experimento, realizadas no intervalo de sete dias entre uma e outra. Nenhum dos tratamentos diferiu da testemunha inoculada em relação ao número e porcentagem de plantas mortas pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$) e todos diferiram da testemunha absoluta. A porcentagem de plantas vivas variou para os tratamentos entre 6 % (LEV161) e 14% (LEV92), enquanto para a testemunha inoculada e para o tratamento LEV166, nenhuma planta sobreviveu.

É provável que as plantas ainda não estivessem no estágio de desenvolvimento adequado para inocular, provavelmente pela baixa luminosidade na casa de vegetação onde foram cultivadas, o que não permitiu aos caules adquirirem o diâmetro necessário para suportar a inoculação com o patógeno. Müller e Valle (2012) discutem que em plântulas de cacau, sob condições de câmara úmida, as folhas se desenvolvem melhor em alta intensidade luminosa, apresentando maior capacidade fotossintética do que aquelas desenvolvidas em baixa irradiação, refletindo no desenvolvimento de outros tecidos da planta, a citar o espessamento do caule. Também se deve considerar que o clone CCN 51 é altamente suscetível ao isolado Cc20 de *C. cacaofunesta* e que o método de aplicação das leveduras não permitiu que elas colonizassem os tecidos da planta onde o patógeno foi aplicado, tecido interno.

Melo (2012) tratou sementes de meloeiro com isolados de *Rhodotorula aurantiaca* e *R. glutinis*, o que resultou em plântulas com menor severidade dos sintomas da macha aquosa. Contudo, entre o tratamento de sementes e a aplicação de patógeno

houve apenas seis dias de diferença, enquanto no presente experimento a diferença foi de 150 dias, podendo este longo período entre tratamento de sementes e inoculação do patógeno ter influenciado nos resultados.

Conclusões

Não é possível estabelecer uma concentração padrão do secretoma que abranja todos os isolados, sendo específica para cada um deles, alcançando os melhores percentuais de inibição com concentrações entre 10 e 75%. As leveduras testadas se mostraram eficientes em baixas concentrações do secretoma.

As leveduras não inibem o crescimento radial das colônias, mas, inibem a formação abundante de micélio e peritécios do patógeno.

Os isolados LEV034 e LEV101 da levedura *Rhodospiridium paludigenum* são promissores como agentes de controle biológico da Murcha de *Ceratocystis*.

Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsas ao primeiro e ao último autor, à CEPLAC pelo financiamento da pesquisa, ao PPGPV/UESC, ao matemático e estatístico Lindolfo Pereira dos Santos Filho (CEPLAC), bem como a todos os colegas e funcionários da CEPLAC/CEPEC/SEFIT que colaboraram nessa pesquisa.

Literatura Citada

- ALBUQUERQUE, P. S. B. et al. 2005. Doenças do cacau. In: Kimata, H. et al. Manual de fitopatologia. São Paulo, SP, Agronômica Ceres. pp. 156-195.
- ALVES, M. L. N. 2007. Avaliação do potencial de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Rhodospiridium* no controle biológico pós-colheita de bolores. Dissertação Mestrado. Lisboa, Universidade de Lisboa, Portugal. 121p.
- COELHO, A. R. et al. 2011. Avaliação do potencial antagonico de leveduras, visando biocontrole de

- deterioração por *Penicillium expansum*. Ciências Agrárias (Brasil) 32 (1):1879-1892.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society 57:368-369.
- FERREIRA, D. F. 2011. SISVAR versão 5.6: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia (Brasil) 35(6):1039-1042.
- FERREIRA, E. M. S. et al. 2015. Avaliação da resistência de leveduras biocontroladoras à substâncias “GRAS” - (Generally Regarded As Safe). Journal of Bioenergy and Food Science 2 (4):178-182.
- FIALHO, M. B. 2004. Efeito *in vitro* de *Saccaromyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. Dissertação Mestrado. Piracicaba, SP, USP. 70p.
- FOKKEMA, N. J.; MEULEN, V. D. 1976. Antagonism of yeast like phyllosphere fungi against *Septoria nodorum* on wheat leaves. Netherlands Journal of Plant Pathology 82:13-16.
- LU, L. et al. 2014. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodosporidium paludigenum* against *Penicillium expansum* in apple fruit. Postharvest Biology and Technology 92:9-15.
- MAGALHÃES, D. M. A. et al. 2015. Miniestaquia em espuma fenólica: nova ferramenta para avaliação de resistência a murcha de *Ceratocystis* em cacauero. Agrotropica (Brasil) 3:317-322.
- MAGALHÃES, D. M. A. et al. 2016. Leaf disc method for screening c vilt resistance in cacao. Tropical Plant Pathology 41:21-27.
- MELO, E. A. 2012. Eficácia de leveduras no biocontrole da mancha aquosa em meloeiro. Dissertação Mestrado. Recife, PE, UFRPE. 58p.
- MELLO, M. R. F. de. 2011. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. Horticultura Brasileira 29(1): 78-83.
- MÜLLER, M. W.; VALLE, R. R. 2012. Ecofisiologia do cultivo do cacauero. In: Valle, R. R. Ciência, tecnologia e manejo do cacauero. 2ed. Brasília, DF, CEPLAC. pp. 31-66.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. Ilhéus, BA, CEPLAC. 132p.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2012. Principais doenças do cacauero e seu manejo. In: Valle, R. R. Ciência, tecnologia e manejo do cacauero. 2ed. Brasília, DF, CEPLAC. pp. 187-275.
- PIMENTA, R. S. et al. 2009. Utilization of Yeasts in Biological Control Programs, Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Springer Science 1:200-212.
- SANCHES, C. L. G. 2007. Murcha-de-Ceratocystis (*Ceratocystis cacaofunesta*) no Sul da Bahia: Metodologia para seleção de genótipos de cacauero resistentes e estudos preliminares descritivos do patógeno. Dissertação Mestrado. Ilhéus, Bahia, UESC. 61p.
- SAS INSTITUTE. 2004. SAS/STAT 9.1 user's guide. 1ed. Sas Institute, Cary. 5136p.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2012. Resistência de progênies de cacauero à murcha-de-Ceratocystis. Tropical Plant Pathology (Brasil) 37 (3):191-195.
- SILVA, S. D. V. M.; PAIM, M. C.; CASTRO, W. M. 2004. Cacao “Jaca” Resistente a *Ceratocystis fimbriata* na Região Cacaueira da Bahia, Brasil. Fitopatologia Brasileira (Brasil) 29 (5):538-540.
- SODRÉ, G. A.; MARROCOS, P. C. L.; LEITE, J. B. V. 2012. Perspectivas para multiplicação do cacauero. In: Valle, R. R. Ciência, tecnologia e manejo do cacauero. 2ed. Brasília, DF, CEPLAC. pp. 391-406.
- SOUZA, M. L. et al. 2014. Fator pH e Inibição da Produção de Esporos de Fungos Toxigênicos em Co-Cultivo com Leveduras. In: Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, 12°. Anais. São Paulo, SP, Editora Blucher. pp. 541-542.

- VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. V. 2000. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. Controle biológico. Jaguariúna, São Paulo, SP, Embrapa Meio Ambiente. pp. 41-56. ●