



DAYANA ALVARENGA BOTREL

**FUNGOS SAPRÓBIOS COMO AGENTES DE
BIOCONTROLE DA MANCHA AUREOLADA
(*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) NO CAFEEIRO**

LAVRAS – MG

2013

DAYANA ALVARENGA BOTREL

**FUNGOS SAPRÓBIOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DA
MANCHA AUREOLADA (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) NO
CAFEEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Botrel, Dayana Alvarenga.

Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* / Dayana Alvarenga Botrel. – Lavras : UFLA, 2013.
57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Flavio H. Vasconcelos Medeiros.

Bibliografia.

1. Café - Bacteriose - Biocontrole. 2. *Coffea arabica*. 3. ISR. 4. SAR. 5. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.73932

DAYANA ALVARENGA BOTREL

**FUNGOS SAPRÓBIOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DA
MANCHA AUREOLADA (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) NO
CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 03 de setembro de 2013.

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA

Dra. Flávia R. A. Patrício

Instituto Biológico

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

LAVRAS – MG

2013

À minha família, que com muito amor e dedicação, cumpriu a missão de me educar para que hoje eu concluísse este trabalho, me tornando Mestre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A construção deste trabalho é fruto de dedicação diária, em que contei com apoio de amigos, familiares e grandes instituições.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), que desde meu primeiro dia de graduação, me proporcionou estrutura que pôde ser continuada na realização do mestrado.

À CAPES, por me confiar a bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros, pela orientação em que compartilhou comigo todo seu conhecimento, me ensinando a conseguir sempre o melhor de mim durante este trabalho.

Agradeço também ao Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende, por ceder seu laboratório para a realização dos trabalhos, espaço essencial para conquistar estes resultados.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico, pelo companheirismo durante o tempo de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, por me proporcionarem um ambiente de trabalho harmonioso, de onde levo boas lembranças de risadas e grandes amigos.

Luana, Larissa e Marie, agradeço pelas divertidas madrugadas de estudo, em que descobri em vocês não só companheiras acadêmicas, mas amigas que levo pra vida toda. Aos demais amigos e funcionários do departamento de Fitopatologia, pelos sinceros “Bom dia!”.

Por uma vida toda de apoio, compreensão e confiança, agradeço aos meus grandes e velhos amigos, que estiveram sempre comigo também durante esses dois anos. Às minhas cunhadas, pelo carinho e cuidados.

Enfim, como base de todo esse agradecimento, aos meus pais Edson e Sirlene pelo exemplo de amor, garra e educação e aos meus queridos irmãos Diego e Douglas, pela cumplicidade durante toda minha vida.

RESUMO

O cafeeiro é de importância social e econômica para o Brasil. Porém, muitas doenças acometem a cultura. Dentre elas, destaca-se a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, uma doença emergente que tem causado danos aos viveiros e lavouras. Ainda são poucas as estratégias de manejo disponíveis e o controle biológico pode representar mais uma ferramenta no manejo da doença, como já é observado para outras doenças bacterianas. Objetivou-se, neste trabalho, selecionar fungos sapróbios para o controle da mancha aureolada e determinar os mecanismos de ação envolvidos no controle. Foram utilizados fungos sapróbios oriundos da caatinga para o controle preventivo e curativo da doença, pelo tratamento de plantas já sintomáticas para a mancha aureolada e plantas inoculadas sete dias após o tratamento com o fungo sapróbio. Como controle positivo utilizaram-se os produtos comerciais Greenforce® (15mL pc/L) e Acibenzolar-S-metil – Bion® (0,05g/L) e como controle negativo a água. As plantas foram então avaliadas, semanalmente por quatro semanas, para a altura de plantas e severidade da doença. Os dados de severidade obtidos foram usados para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Para determinação dos mecanismos de ação envolvidos no controle, para o fungo selecionado como mais promissor para redução da AACPD, foi avaliada a contribuição da antibiose e indução de resistência. A antibiose foi medida pela inibição direta da bactéria por antibiograma, realizado com o sobrenadante do crescimento fúngico e pela produção de voláteis em placa bipartida. Para determinação da contribuição da indução de resistência, foi medida a atividade da fenilalanina amônia liase, peroxidase e ascorbato peroxidase. No ensaio curativo, os fungos *Memnoniella echinata* e *M. levispora* reduziram a AACPD (48 e 46%). No ensaio preventivo, tanto para redução (40-72%) da AACPD quanto para aumento (40%) da altura de plantas, o fungo *Phialomyces macrosporus* foi aquele que garantiu os resultados mais promissores. Aos dois dias após incubação, esse fungo produziu voláteis que reduziram o crescimento do patógeno, mas compostos não voláteis não foram capazes de inibir o crescimento da bactéria. A atividade da POX e PAL foi maior que a testemunha aos sete dias após o tratamento com o sapróbio e a APX foi maior aos 14 dias. Portanto, *P. macrosporus* tem potencial para ser usado no manejo integrado da mancha aureolada do cafeeiro na produção de mudas e o mecanismo de ação envolve possivelmente uma combinação da antibiose e indução de resistência.

Palavras-chave: Biocontrole. ISR. SAR. *Coffea arabica*. Bacteriose.

ABSTRACT

Coffee is of social and economic relevance in Brazil. However, many diseases interfere in the crop yield. Among them halo blight, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, is an emerging disease that has caused many damages in nurseries and in the field. Few are the strategies available for its management, and biological control may represent one more tool in managing this disease, as is already verified for other bacterial diseases. The objective of this work was to select saprobe fungi for controlling halo blight and determining the mechanisms involved in this control. Saprobes originated from the caatinga region were selected for the curative and preventive control of the diseases, by treating already symptomatic plants for the disease and inoculating the pathogen seven days after the saprobe treatment. As positive control, we used the commercial products Greenforce® (15mL cp/L) and Acibenzolar-S-methyl – Bion® (0.05g/L), and as negative control, water. The plants were then assessed weekly for four weeks for plant height and disease severity. The data obtained for severity were used to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC). In order to determine the action mechanisms involved in the control, for the fungus selected as most promising for AUDPC reduction, we evaluated the contribution of antibiosis and resistance induction. Antibiosis was measured by the direct inhibition of the bacterium through an antibiogram performed with the supernatant of the fungal growth and the production of volatiles in bipartite plate. In order to determine the contribution of resistance induction, we measured the activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX). In the curative trial, *Memnoniella echinata* and *M. levispora* reduced the AUDPC (48 and 46%). In the preventive trial, both for the reduction of AUDPC (40-72%) and the increase in plant height (40%), *P.macrosporus* guaranteed the most promising results. Two-day after incubation, this fungus produced volatiles which reduced pathogen growth. However, non-volatile compounds did not inhibit the bacteria. POX and PAL activities were higher than the witness at seven days after the treatment with the saprobe, and the APX was higher after 14 days. Therefore, *P. macrosporus* has the potential to be used in the integrated management of coffee halo blight in the production of seedlings, and the mechanism of action possibly involves a combination of antibiosis and resistance induction.

Keywords: Biocontrol. ISR. SAR. *Coffea arabica*. Bacteriosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos mecanismos de ataque de patógenos necrotróficos e da ação de sapróbios na decomposição de matéria orgânica morta, apresentando as semelhanças entre estes mecanismos de ação.....	22
Figura 2	Antibiograma com as concentrações de <i>P. macrosporus</i> e com os controles positivos e negativos.....	41
Figura 3	Teste de produção de voláteis.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro em função da aplicação de diferentes tratamentos	33
Gráfico 2	Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro em função da aplicação de diferentes tratamentos	34
Gráfico 3	Altura das mudas de cafeeiro. Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade	35
Gráfico 4	Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro em função da aplicação de diferentes tratamentos	36
Gráfico 5	Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro, em função da aplicação de diferentes tratamentos	37
Gráfico 6	Atividade enzimática da Fenilalanina amônia-liase, em função dos tratamentos e dos dias após a inoculação	38
Gráfico 7	Atividade enzimática da Peroxidase de guaiacol, em função dos tratamentos e dos dias após a inoculação	39
Gráfico 8	Atividade enzimática da Ascorbato peroxidase, em função dos tratamentos e dos dias após a inoculação.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	A cultura do cafeeiro	16
3.2	Mancha aureolada do cafeeiro	17
3.3	Controle Biológico	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Produção de mudas	24
4.2	Isolados de fungos sapróbios	24
4.3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	25
4.4	Controle Curativo	25
4.5	Controle Preventivo	26
4.6	Métodos de Inoculação	27
4.7	Antibiograma	27
4.8	Produção de Voláteis	28
4.9	Atividade enzimática	29
4.9.1	Ascorbato Peroxidase – APX	29
4.9.2	Peroxidase de guaiacol – POX	30
4.9.3	Fenilalanina Amônia-liase – PAL	30
4.9.4	Proteínas Totais	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Ensaio para controle curativo da doença	32
5.2	Ensaio para o controle preventivo da doença	33
5.3	Fenilalanina Amônia-liase – PAL	37
5.4	Peroxidase de Guaiacol – POX	38
5.5	Ascorbato peroxidase	39
5.6	Antibiograma	40
5.7	Produção de Voláteis	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro é um dos principais itens de exportação do agronegócio brasileiro. A estimativa da produção brasileira na safra de 2013 é de 48,59 milhões de sacas, representando uma redução de 4,4% em relação à temporada anterior. A queda na produção pode ser explicada pelo ciclo de baixa bianalidade na maioria das áreas de café arábica e do regime de chuvas irregular aliado às altas temperaturas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013).

Ainda não há uma quantificação das perdas decorrentes de doenças ou os gastos decorrentes de seu controle, mas sabe-se que uma diversidade de doenças acomete o cafeeiro, sendo as principais: ferrugem alaranjada causada por *Hemileia vastatrix* (VARZEA et al., 2002); a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* (SERA, 2001; SERA; ALTEIA; PETEK, 2002), a mancha de phoma, causada por *Phoma* spp. (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010) e, a antracnose, causada por *Colletotrichum* spp. (PARADELA FILHO et al., 2001) e mais recentemente a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (SERA, 2001; SERA; ALTEIA; PETEK, 2002). Para algumas delas como a ferrugem já está se obtendo controle satisfatório com o controle químico, mas para as doenças emergentes como a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) ainda são poucas as estratégias com comprovada eficiência para seu manejo (RODRIGUES et al., 2012).

Nos últimos anos, a mancha aureolada tornou-se fator limitante para o cultivo do café em regiões mais frias e expostas ao vento, em lavouras em formação ou recém-podadas, e em viveiros, principalmente nas regiões produtoras dos estados do Paraná e São Paulo e em Minas Gerais. Em Minas Gerais tem sido crescente o relato da doença associadas a perdas expressivas de

produção no Sul, Triângulo Mineiro, Alto do Parnaíba e Cerrado (MOHAN, 1976; PATRÍCIO et al., 1999; SERA; ALTEIA; PETEK, 2002; SERA et al., 2004; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

Dentre as estratégias que podem ser empregadas para o manejo de doenças de plantas, notadamente as bacterianas, que são de difícil controle, estão os indutores de resistência. A indução de resistência é definida como sendo a ativação de mecanismos que resultam na capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005). A resistência induzida (RI) em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas) (CAVALCANTI et al., 2005; RESENDE et al., 2004). Essa estratégia de controle pode ser uma alternativa de amplo espectro de ação que possa ser utilizada no manejo integrado de doenças do cafeeiro.

Dentre os indutores de resistência, o mais amplamente usado é o acibenzolar-S-metil (ASM). Ele foi também o primeiro indutor de resistência liberado para uso comercial (LYON; NEWTON, 1997). Desde então, muitos outros produtos foram desenvolvidos com mecanismo de ação semelhante, alguns deles baseados no uso de microrganismos vivos ou seus derivados. (RESENDE et al., 2006).

Os microrganismos usados para indução de resistência podem mobilizar várias estratégias para induzir a resistência de plantas, desde moléculas por ele produzidas ou até seus próprios componentes estruturais.

Além do mais, é um benefício do uso de microrganismos no manejo de doenças de plantas, o fato do mecanismo de ação poder funcionar como indução de resistência ou como uma diversidade de outros mecanismos, que culminam no controle da doença e maior vigor e produtividade da planta.

Outra importante vantagem no uso destes microrganismos é seu uso tanto para a agricultura orgânica quanto convencional, o que garante o sucesso comercial de um produto gerado a partir desses fungos usados isoladamente ou em combinação.

Em cafeeiro, um exemplo de fungo recentemente pesquisado gerou um produto comercial denominado Cladosporin®, cujo princípio ativo é o fungo sapróbio (*Cladosporium cladosporioides*), que tem a capacidade de preservar a qualidade de bebida de café e já está em fase de transferência de tecnologia da iniciativa pública (EPAMIG) para a privada (ANGELICO, 2012).

Portanto, há uma demanda pelo uso destes fungos sapróbios para o manejo de doenças em cafeeiro. Se esses fungos forem oriundos de regiões de mudanças bruscas de umidade de temperatura como a caatinga, aumentam as chances de estabelecimento do fungo na planta e a manutenção do controle de doenças importantes, como a mancha aureolada.

2 OBJETIVOS

Objetivou-se, neste trabalho, selecionar fungos sapróbios, obtidos da região semiárida nordestina, com atividade de biocontrole da mancha aureolada do cafeeiro e avaliar a contribuição da antibiose e indução de resistência como mecanismos de controle do fungo selecionado, como mais promissor agente de controle biológico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cultura do cafeeiro

O Cafeeiro é uma cultura amplamente cultivada no Brasil, com grande importância social e econômica. O gênero *Coffea* apresenta mais de 100 espécies botânicas conhecidas e entre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta) são as mais importantes economicamente. Segundo a CONAB (2013), a espécie *C. arabica* é responsável por mais de 74% da produção nacional, sendo o estado de Minas Gerais seu maior produtor.

As cultivares Mundo Novo, Catuaí e Bourbon são consideradas suscetíveis a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (CARDOSO; SERA, 1983; MOHAN; CARDOSO; PAIVA, 1978; MORAES et al., 1974), agente etiológico da mancha aureolada.

A cultivar Mundo Novo é resultante de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho, caracterizando-se por elevada produção de café beneficiado, aliada ao ótimo aspecto vegetativo. A cultivar Catuaí Vermelho originou-se como produto de recombinação, a partir do cruzamento artificial entre cafeeiros selecionados pela produtividade das cultivares Caturra Amarelo, IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19, de *C. arabica*, possuindo elevado vigor (CARVALHO et al., 2008). Ambas as cultivares são amplamente plantadas. A primeira tem sido preferida em áreas de colheita mecanizada pelo maior porte e a segunda tem sido mais indicada para áreas de colheita manual ou com auxílio de derriçadeira.

3.2 Mancha aureolada do cafeeiro

A doença é mais comumente atribuída a *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*, embora alguns relatos apontem para outras bactérias com sintomatologia semelhante, como *Pseudomonas cichori*. Iniciativas de pesquisa na Universidade Federal de Lavras (UFLA) estão buscando explicar a variabilidade do patógeno, em termos filogenéticos e epidemiológicos.

É empiricamente estabelecido que a mancha aureolada do cafeeiro (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) incide severamente em folhas e brotações jovens, já o crestamento bacteriano das folhas (*Pseudomonas cichorii*) incide com mais frequência em folhas velhas (OLIVEIRA, 1988). A resistência ou suscetibilidade poderia ser atribuída a diferentes teores de compostos fenólicos em folhas novas e velhas (GODMAN; KIRALY; WOOD, 1986; MISAGHI, 1980).

Os sintomas caracterizam-se por manchas de cores pardas, circundadas por um grande halo amarelo, o que caracteriza o nome de mancha aureolada. As áreas lesionadas, quando localizadas nas bordas das folhas, normalmente desprendem-se do limbo foliar dando um aspecto rendilhado (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

Até o momento, sabe-se que lavouras cafeeiras instaladas em locais de maiores altitudes e desprotegidas da ação dos ventos estão mais sujeitas à doença. Os ventos promovem ferimentos nas folhas e ramos novos, abrindo portas para a penetração da bactéria. A ocorrência de chuvas de granizo e o frio podem provocar lesões nas plantas, o que também facilita a entrada da bactéria. Na primavera (outubro a dezembro), junto com as novas brotações, as condições ambientais (temperatura, umidade relativa e precipitação) favorecem a ocorrência da doença (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

A disseminação da bactéria ocorre dentro da planta e de planta para planta, pela ação de respingos de chuva e chuvas finas (ZAMBOLIM et al., 1997).

De acordo com Paradela et al. (2000), para o controle da doença nas mudas devem ser realizadas aplicações quinzenais de produtos, contendo como princípio ativo, o antibiótico cloridrato de casugamicina, 300mL do produto

contendo 2% do P.A. em 100L de água, podendo ser intercaladas com pulverizações com oxiclureto de cobre (0,3%), evitando-se a seleção e proliferação de linhagens resistentes da bactéria ao antibiótico.

Em um estudo realizado no campo, foi avaliado o efeito de tratamentos químicos para o controle da mancha aureolada em região montanhosa (Caconde, SP). Os autores relataram redução da incidência da doença nas parcelas pulverizadas com casugamicina (1,5L/ha), casugamicina (1,5L/ha) + hidróxido de cobre (2,5kg/ha), entre outros tratamentos (óleos vegetais e minerais, adesivo siliconado e acibenzolar-S-methyl). Porém, nas parcelas expostas ao vento, a incidência da doença foi maior, independentemente dos produtos utilizados, demonstrando a importância da utilização de medidas de controle cultural, e também, principalmente de quebra-ventos (PATRICIO et al., 1999).

3.3 Controle Biológico

As culturas estão sujeitas a uma série de doenças que podem acarretar graves prejuízos. O manejo convencional de doenças de plantas, muitas vezes, leva ao uso abusivo e contínuo de produtos químicos, gerando seleção de patógenos resistentes (MEINERZ et al., 2008), além de ocorrerem desequilíbrios no agroecossistema e problemas na saúde humana (BETTIOL; GHINI, 2003).

Portanto, faz-se necessária a utilização de métodos alternativos no controle de doenças. Dentre esses métodos alternativos destacam-se a indução

de resistência em plantas (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005) e o controle biológico, podendo tanto aproveitar-se o controle biológico natural quanto for realizada a introdução de um agente de biocontrole (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O controle biológico de doenças de plantas é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983).

A atuação de microrganismos como agentes de biocontrole de fitopatógenos pode ser resultante de competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira (SCHARDL; PHILLIPS, 1997), produção de compostos antimicrobianos (STROBEL et al., 2002) e indução de resistência sistêmica (VANLOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

A indução de resistência em plantas contra patógenos representa um método no controle de doenças, que ativa os mecanismos de defesa latentes na planta. A resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um determinado patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Geralmente, essa indução ocorre pela ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina, como fenilalanina amônia-liase (PAL), além de peroxidases (REGLINSKI et al., 1997).

As peroxidases (EC1. 11.1.7) são glicoproteínas que têm a função básica de catalisar a oxidação do peróxido de hidrogênio, a partir de numerosas espécies de substratos orgânicos e inorgânicos.

Outras moléculas capazes de detoxificar espécies reativas de oxigênio são as peroxidases de ascobarto (APX, EC 1.11.1.11) que eliminam peróxido de hidrogênio às custas de ascorbato formado durante os processos bioquímicos

normais ou durante a imposição de estresses bióticos ou abióticos à planta. A atividade de APX está correlacionada positivamente ao mecanismo de defesa da planta, dada sua capacidade de atuar em um mecanismo de alívio oxidativo (MITTLER; ZILINSKAS, 1993; PEIXOTO et al., 1999).

A fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5) é uma importante enzima componente indireta do mecanismo de defesa da planta. Essa enzima é responsável pela conversão da fenilalanina, proveniente da rota do ácido shikímico, em ácido *trans*scinâmico, o qual representa um primeiro fenilpropanóide-chave nas vias de síntese de lignina e ácido salicílico (SHARMA, 1998). Além de fitoalexinas, a PAL participa, então, da síntese de compostos fenólicos que estão diretamente envolvidos na defesa da planta contra o ataque de patógenos, podendo participar tanto em defesa local, quanto na defesa sistêmica vegetal (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência através da utilização de agentes externos (indutores), sendo esses agentes bióticos ou abióticos (RESENDE et al., 2004). Dentre os agentes abióticos mais utilizados destacam-se o acibenzolar-S-metil e o ácido salicílico (BENATO, 2003; RESENDE et al., 2000), assim como o ácido jasmônico (OLIVEIRA et al., 2006) e o etileno (BOLLER, 1991).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é um produto utilizado como indutor químico que possibilita proteção às plantas contra uma ampla gama de patógenos, dentre eles fungos, vírus e bactérias (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; GÖRLACH et al., 1996). Foi demonstrado que as plantas de café respondem aos vários indutores de SAR (GUZZO et al., 1993).

O ácido salicílico, jasmonatos e etileno têm sido relatados como elementos envolvidos na transdução de sinais de eliciadores, convertendo sinais recebidos em respostas específicas celulares (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Os agentes bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) podem ativar mecanismos de defesa da planta (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994). O uso de extratos de fungos também reduz a severidade de diversas doenças em variadas culturas (CAMPOS et al., 2009; SILVA, 2007; VIECELLI et al., 2009). Esses microrganismos podem produzir moléculas eliciadoras, seus próprios componentes estruturais serem reconhecidos pela planta (DOW et al., 2009), ou uma enzima hidrolítica produzida pelo fungo pode liberar componentes estruturais da planta, esses por sua vez serem reconhecidos pela planta e disparada a resposta de defesa (RESENDE et al., 2010).

Para entender este último mecanismo, é importante lembrar que a parede celular, lamela média e cutícula possuem importantes funções nos processos vegetais contra patógenos em potencial. Os vários polissacarídeos presentes na parede celular (celulose, pectina e hemicelulose) podem servir como substrato para enzimas hidrolíticas, secretadas por vários patógenos (TUGAYÉ; BOUDART; BERNARD, 2000). Os oligossacarídeos derivados da degradação de polissacarídeos presentes na parede celular de plantas ou fungos constituem uma classe de eliciadores bem caracterizados que, em alguns casos, podem induzir respostas de defesa em concentrações muito baixas (SHIBUYA; MINAMI, 2001). Sabe-se que enzimas de fungos hidrolisam componentes da parede celular das plantas gerando oligofragmentos, que são reconhecidos por receptores transmembrânicos que desencadeiam a transdução de sinal, que culmina com a resistência de plantas. As pectatolases atuam, portanto como eliciadores de defesa de plantas contra patógenos (LAGAERT; BELIEN; VOLCKAERT, 2009). García et al. (2011) testaram a ação antagonista de fungos sapróbios contra o patógeno *Verticillium dahliae*. Como resultado, cinco dos fungos sapróbios testados podem ter hidrolizado componentes da parede celular de raízes de tomate, gerando compostos de baixo peso molecular que podem atuar como elicitores de defesa contra *V. dahliae*.

Os fungos sapróbios têm recebido recentemente uma atenção especial como potenciais indutores de resistência e agentes de controle biológico (YEDIDIA et al., 2003), pois, similarmente a patógenos, são capazes de secretar pectatoliases, induzir à liberação de oligogalacturonídeos e ativar a resposta de defesa de plantas. Como não produzem toxinas, não são capazes de causar doença e podem, portanto, atuar como indutores de resistência de plantas, conforme ilustrado na Figura 1.

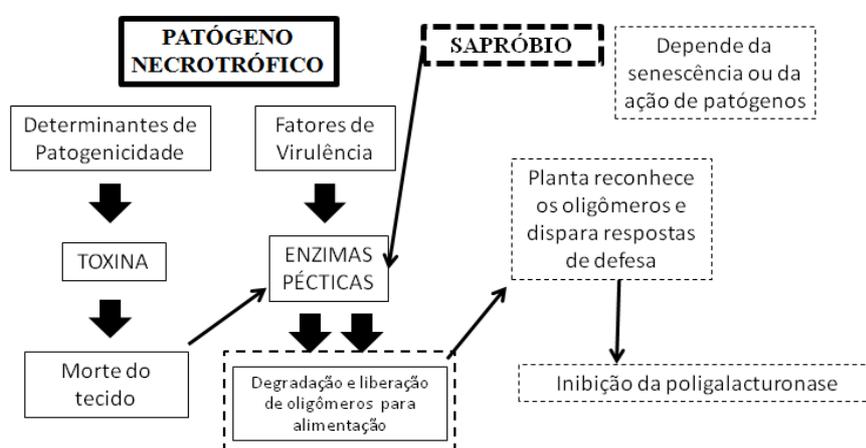


Figura 1 Representação esquemática dos mecanismos de ataque de patógenos necrotróficos e da ação de sapróbios na decomposição de matéria orgânica morta, apresentando as semelhanças entre estes mecanismos de ação

Conforme demonstrado, estes fungos sapróbios podem ser usados para indução de resistência de plantas contra patógenos. Para selecionar isolados com potencial antagonico é necessário que se trabalhe com um grande número de indivíduos nos testes de seleção, aumentando as chances de sucesso. Faz-se então, necessária a realização de ensaio em condições controladas, que torne possível a manipulação de um grande número de isolados com dispêndio de

pouco espaço físico (Guetskyl et al., 2002). Silva et al. (2012) selecionaram fungos e bactérias endofíticas para o controle da ferrugem e promoção de crescimento do cafeeiro através de folhas destacadas. A metodologia permite a rápida seleção de um grande número de isolados, mas nem sempre pode refletir o resultado *in vivo* devido à interação microrganismo benéfico-planta.

Os fungos sapróbios podem ser obtidos a partir de matéria orgânica em decomposição. Quanto mais hostil o ambiente de onde ele foi recuperado, maiores as chances de sobrevivência do agente de biocontrole no agroecossistema. Neste sentido, em um trabalho de prospecção da biodiversidade fúngicas do semiárido, um grupo de cientistas liderado pelo Professor Luís Fernando Gusmão identificou vários fungos sapróbios da serrapilheira de diversas florestas da caatinga do Nordeste (LEAO-FERREIRA et al., 2013). Estes fungos estão sendo agora testados no projeto SISBIOTA/FAPESP, coordenado pelo Professor Sérgio F. Pascholati para o controle de doenças em diversos patossistemas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de mudas

Sementes de café (Cultivar Mundo Novo IAC 376-4 ou Catuaí Vermelho) foram obtidas da EPAMIG e semeadas em bandejas contendo areia. Após o estágio de *orelha de onça*, foi feito o transplante das plântulas para saquinhos de cultivo. Para o substrato foram utilizados terra e areia, na proporção 3:1. Adicionaram-se os adubos Super Simples (300g) e o formulado 04-14-08 (900g) na mistura.

4.2 Isolados de fungos sapróbios

Os fungos sapróbios *Pithomyces chartarum*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia eragrostidis*, *Memnoniella echinata*, *Pseudobotrytis terrestris*, *Lappodochium lageniforme*, *Gonytrichum clamydosporium*, *Memnoniella levispora*, *Phialomyces macrosporus*, *Dictyochaeta heteroderae*, *Moorella speciosa*, *Volutella mínima*, *Myrothecium roridum*, *Stachylidium bicolor*, utilizados nesse estudo foram isolados do semiárido nordestino e estão depositados na CCMB (Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia), situada na Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

O fungo sapróbio foi primeiramente cultivado em CMA (Cenoura 30,0g - Milho 30,0g - Agar 20,0g - 1L de água). Após 7 dias, adicionou-se um disco, contendo micélio e esporo do fungo, em erlenmeyer, contendo 100mL de meio CM líquido (Cenoura 30,0g, Milho 30,0g, 1L de água). O erlenmeyer foi mantido por 10 dias em Shaker (25-27° C), em rotação de 120rpm. Após o

cultivo, todo o conteúdo do erlenmeyer foi triturado e homogeneizado em liquidificador. Foi feita a quantificação através da diluição em série de unidades formadoras de colônia, determinando-se uma concentração padrão para pulverização em mudas. A concentração padronizada para pulverização foi 3×10^4 ufc/mL.

4.3 *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

O isolado de *P. syringae* pv. *garcae* foi obtido da coleção de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da UFPA – Universidade Federal de Lavras. Antes de montar cada ensaio, as bactérias foram inoculadas e reisoladas de mudas de café, garantindo-se a patogenicidade. A bactéria foi preservada em água mineral.

O isolado de *P. syringae* pv. *garcae* utilizado nos ensaios foi cultivado em meio MB1 - Kado 523 (KADO; HESKETT, 1970).

4.4 Controle Curativo

Mudas naturalmente infectadas com *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* foram tratadas curativamente com os fungos sapróbios: *Pithomyces chartarum*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia eragrostidis*, *Memmoniella echinata*, *Pseudobotrytis terrestris*, *Lappodochium lageniforme*, *Gonytrichum clamydosporium*, *Memmoniella levispora*. Como controle positivo utilizaram-se os produtos comerciais Greenforce® (15ml pc/L) e Acibenzolar-S-metil – Bion® (0,05g/L) e como controle negativo utilizou-se a água. Os fungos sapróbios foram cultivados conforme descrito no item 4.1.2. As mudas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento. O delineamento experimental foi em

blocos casualizados, e esses foram separados por severidade das manchas foliares, em 3 blocos. Cada parcela continha 6 plantas. As avaliações de severidade e altura foram feitas a cada 7 dias. Para a avaliação da severidade, utilizou-se uma escala adaptada de Sidhu e Webster (1977), com nota 0 (ausência de sintoma), nota 1 (1 – 25% de lesões foliares), nota 2 (26 – 50% de lesões foliares), nota 3 (51 - 75% de lesões foliares), nota 4 (76 – 100% ; queda das folhas). Ao final do experimento (5 semanas), calculou-se a AACPD e avaliou-se o peso seco de folhas e de caule e o teor de clorofila. Para avaliar o teor de clorofila, utilizou-se o aparelho SPAD. Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa SISVAR®.

4.5 Controle Preventivo

Foram realizados 3 ensaios de seleção (*screenings*) em mudas de cafeeiro, visando selecionar fungos sapróbios com potencial ação de biocontrole contra o patógeno *P.syringae* pv. *garcae*. Os fungos estudados foram *Curvularia eragrostidis*, *Gonytrichum clamydosporium*, *Phialomyces macrosporus*, *Dictyochaeta heteroderae*, *Moorella speciosa*, *Volutella mínima*, *Pseudobotrytis terrestris*, *Myrothecium roridum*, *Stachylidium bicolor*. Como controle positivo utilizou-se Bion® e Greenforce®; e como controle negativo a água. O delineamento experimental foi em blocos casualizados. As mudas foram distribuídas em 3 blocos. Cada parcela continha 2 plantas. As avaliações de severidade e altura foram feitas a cada 7 dias. Para a avaliação da severidade, utilizou-se a escala adaptada de Sidhu e Webster (1977) descrita no item 4.2.1. Ao final do experimento (5 semanas) ,calculou-se a AACPD segundo fórmula proposta por Shaner e Finney (1977) ,de acordo com a Equação 1. Avaliou-se também o peso seco de folhas e de caule. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR®.

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i+1} - T_i)$$

Em que:

AACPD= área abaixo da curva de progresso da doença; Y_i = proporção da doença na i -ésima observação; T_i = tempo em dias na i -ésima observação; n = número total de observações.

4.6 Métodos de Inoculação

Foram feitos testes preliminares para adaptar uma metodologia para inoculação da *P. syringae* pv. *garcae*. Os métodos de injeção, tesoura, ferimento com areia e apenas pulverização foram testados em mudas da cultivar Mundo Novo e Catuaí. De forma a se obter infecção, nas condições mais próximas do campo, optou-se por testar o método de atomização em diferentes condições, adaptado de Patrício et al. (1999). Testaram-se diferentes concentrações de inóculo do patógeno em diferentes ambientes: câmara de crescimento com nebulização, casa de vegetação com temperatura amena (20-25 °C) e com temperatura elevada (25-30 °C). Em todos esses testes foi mantida câmara úmida 24 horas antes e 24 horas depois da inoculação.

Para os ensaios de avaliação da atividade de enzimas, foi utilizado um ambiente controlado tipo Fitotron (22-24 °C; UR±70%) sem câmara úmida.

4.7 Antibiógrama

O Antibiograma foi realizado para avaliar o efeito de antibiose direta do fungo sapróbio selecionado, *Phialomyces macrosporus*, sobre o patógeno *P. syringae* pv. *garcae*. O fungo foi selecionado devido a seu alto desempenho como agente de biocontrole, em 2 ensaios de seleção realizados.

O isolado *Phialomyces macrosporus* foi cultivado em erlenmeyer, contendo CMA líquido, por 10 dias, a 25°C e sob agitação de 120 rpm. A suspensão foi filtrada com papel filtro esterilizado e, posteriormente, utilizou-se o filtrado como tratamento.

O isolado de *P. syringae* pv. *garcae* foi cultivado em erlenmeyer, contendo meio MB1 líquido, por 48 horas a 24°C e sob agitação de 90 rpm. Após o cultivo, o inóculo foi adicionado a um frasco, contendo MB1 sólido com temperatura amena.

Em placas de petri foi adicionada uma fina camada de ágar-água, e por cima, adicionou-se uma alíquota padrão de MB1, contendo inóculo da bactéria. Após a solidificação do meio, os tratamentos foram pipetados na mesma placa, seguindo uma disposição circular. Os tratamentos foram Casugamicina, Estreptomicina, meio CMA, água, e 4 concentrações do fungo sapróbio (5, 10, 50 e 100%). Após 48 horas, avaliou-se a presença ou ausência de halo de inibição.

4.8 Produção de Voláteis

Para avaliar a produção de voláteis pelo sapróbio *Phialomyces macrosporus*, utilizaram-se placas de plástico estéreis e bipartidas. Em um dos lados da placa verteu-se o meio MB1 para o cultivo da bactéria. Foi feito um pequeno furo na região da tampa que estava sobre o meio MB1 e, posteriormente o furo foi tampado com fita adesiva, com o intuito de evitar a passagem de voláteis.

No outro lado da placa bipartida, verteu-se o meio para o cultivo de sapróbio. Os meios CMA e BDA foram testados. O antagonista foi repicado para as placas (disco de micélio), simultaneamente, 1 e 2 dias antes do patógeno.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. A bactéria foi cultivada em MB1, por 48 horas, e foi inoculada em um lado da placa (perfurada). Com uma seringa plástica descartável graduada (0,3mL), inseriu-se uma alíquota de 10 μ L, através do pequeno furo. As avaliações qualitativa e quantitativa foram feitas após 48 horas da inoculação da bactéria. A avaliação consistiu apenas em analisar macroscopicamente o crescimento da colônia bacteriana.

4.9 Atividade enzimática

Para avaliação da indução de resistência, assim como o efeito de pré-condicionamento (*priming*), as amostras de folhas jovens das plantas de cafeeiro foram coletadas aos 7 e 14 dias após a inoculação, com os tratamentos *Phialomyces macrosporus*, Bion® e Água. As amostras foram armazenadas em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N₂) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80°C, para posterior análise.

4.9.1 Ascorbato Peroxidase – APX

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas APX e POX, amostras de 0,2 g de tecido foliar foram maceradas com N₂ líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado com 1300 μ L de tampão de extração - fosfato de potássio 400mM, pH 7,8; EDTA 10mM; ácido

ascórbico 200mM; água. O homogeneizado foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 25 min a 4°C e o sobrenadante foi usado para as determinações enzimáticas.

Adicionaram-se 20 μ L do sobrenadante de cada amostra em três pocinhos da placa de Elisa (placa U.V). Acrescentou-se o tampão de incubação – Fosfato de Potássio 200mM, pH 7,0; Ácido Ascórbico 10mM; Peróxido de Hidrogênio 2mM; água. A absorbância foi medida a 290 nm, em Elisa, durante o período de 3 min (leitura de 15 em 15 min) após adição do extrato à mistura. A temperatura para a leitura foi de 25°C. O coeficiente de extinção molar de 1,4 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em mM produzida por min mg⁻¹ de proteína.

4.9.2 Peroxidase de guaiacol – POX

Para a obtenção do sobrenadante, seguiu-se o método de extração descrito no item 4.4.1.

Adicionaram-se 40 μ l do sobrenadante de cada amostra, em três pocinhos da placa de Elisa. Acrescentou-se o tampão de reação – Fosfato de Potássio 100mM, pH 7,0; Guaiacol 50mM; Peróxido de Hidrogênio 125mM. A absorbância foi medida a 420 nm, em Elisa, durante o período de 2 min (leitura de 15 em 15 min), após adição do extrato à mistura. A temperatura para a leitura foi de 30°C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ foi dividido por 2 (1,235) e usado para calcular a atividade da POX (CHANCE; MAEHLEY, 1955), a qual foi expressa em mM produzida por min mg⁻¹ de proteína.

4.9.3 Fenilalanina Amônia-liase – PAL

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) foi medida de acordo com Mori, Sakurai e Sakuta (2001). Para cada 1g de amostra macerada,

acrescentou-se 3ml do tampão de extração – Fosfato de Sódio 50mM, pH 6,5; 1mM PMSF; 1% PVP. Uma mistura de reação foi preparada adicionandose tampão Tris-HCl, pH 8,8; Fenilalanina 40mM e 5 μ l do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 20 min (leitura de 2 em 2 minutos) a 37°C. A leitura foi feita em 280nm. Os valores foram expressos em unidade de atividade por miligrama de proteína, por minuto.

4.9.4 Proteínas Totais

A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), conforme ensaio de Bradford (1976).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio para controle curativo da doença

As mudas que foram tratadas curativamente com *Memnoniella echinata*, *Memnoniella levispora* e com os produtos comerciais Greenforce® e Acibenzolar-S-metil (Bion®), apresentaram menores valores de AACPD, em relação à testemunha água. Ambos os fungos e produtos testados apresentaram resultado semelhante para todas as variáveis testadas e reduziram a AACPD (35-48%) e aumentaram o peso seco de folhas (31-62%), em relação à testemunha água. As outras variáveis testadas (peso seco e teor de clorofila) não tiveram efeito significativo.

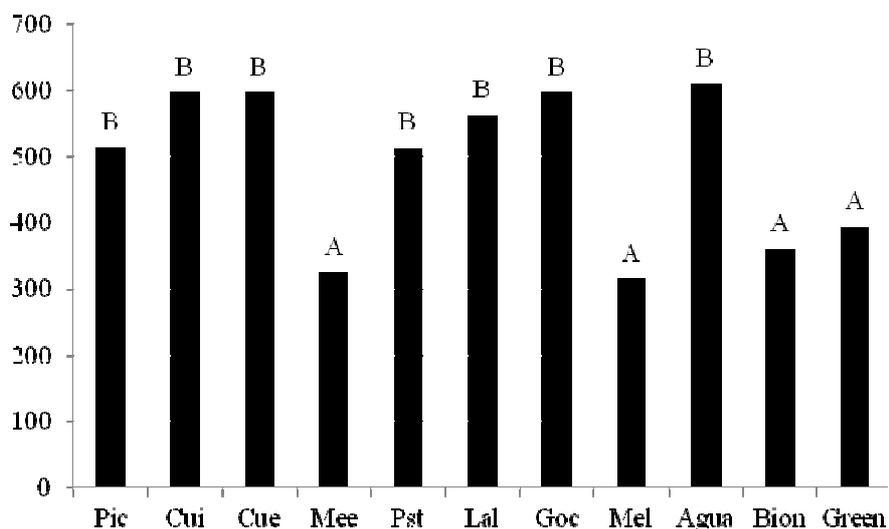


Gráfico 1 Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro em função da aplicação de diferentes tratamentos

Nota: Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Tratamentos: Cui – *Curvularia inaequalis*; Cue – *Curvularia eragrostidis*; Mee – *Memmoniella echinata*; Pst – *Pseudobotrytis terrestris*; Lal – *Lappodochium lageniforme*; Goc – *Gonytrichum clamidosporium*; Mel – *Memmoniella levispora*; (Pvalor = 0,0044).

5.2 Ensaios para o controle preventivo da doença

No primeiro *screening*, o efeito dos tratamentos foi significativo e o isolado *Phiamolyces macrosporus* diferenciou-se estatisticamente dos controles positivos (Bion e Greenforce). Ele reduziu a AACPDs em 42% e contribuiu para o aumento no tamanho das mudas na presença do patógeno em 40%, comparado à testemunha inoculada. Já os fungos sapróbios *Curvularia eragrostidis* e *Gonytrichum clamidosporium* aumentaram a área abaixo da curva

de progresso da severidade da doença em relação à testemunha água e reduziu o tamanho das mudas, favorecendo a doença.

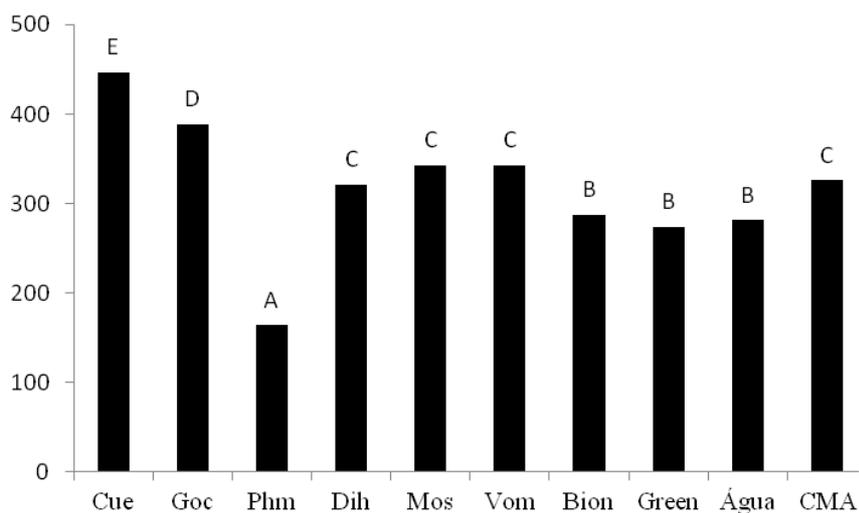


Gráfico 2 Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro em função da aplicação de diferentes tratamentos

Nota: Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Tratamentos: Cue – *Curvularia eragrostidis*; Goc – *Gonytrichum clamydosporium*; Phm – *Phialomyces macrosporus*; Dih – *Dictyochaeta heteroderae*; Mos – *Moorella speciosa*; Vom – *Volutella mínima*; Bion - Acibenzolar-S-meti - Bion®; Green - Greenforce®; Água; CMA – Meio cenoura-milho; (Pvalor = 0,0001).

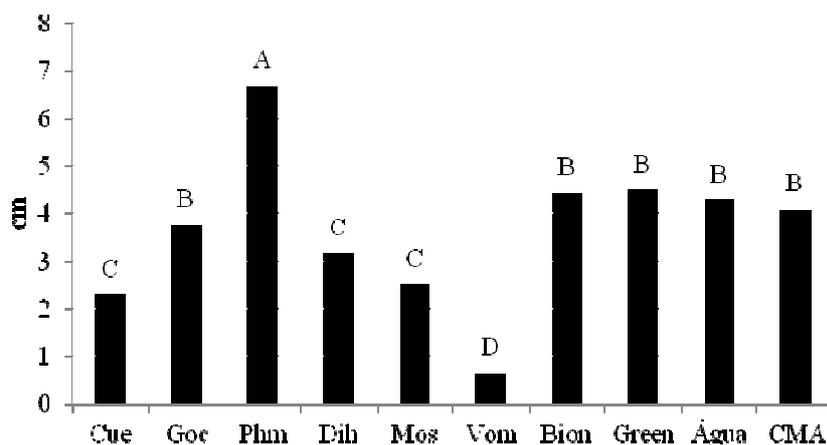


Gráfico 3 Altura das mudas de cafeeiro. Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade

Nota: Tratamentos: Cue – *Curvularia eragrostidis*; Goc – *Gonytrichum clamydosporium*; Phm – *Phialomyces macrosporus*; Dih – *Dictyochaeta heteroderiae*; Mos – *Moorella speciosa*; Vom – *Volutella mínima*; Bion - Acibenzolar-S-meti - Bion®; Green - Greenforce®; Água; CMA – Meio cenoura-milho; (Pvalor = 0,0001).

No segundo screening, os fungos sapróbios *Phialomyces macrosporus*, *Stachybotrys chartarum* e *Gonytrichum clamydosporium* diferenciaram-se significativamente da testemunha água, reduzindo 72%, 66% e 56% a AACPDS.

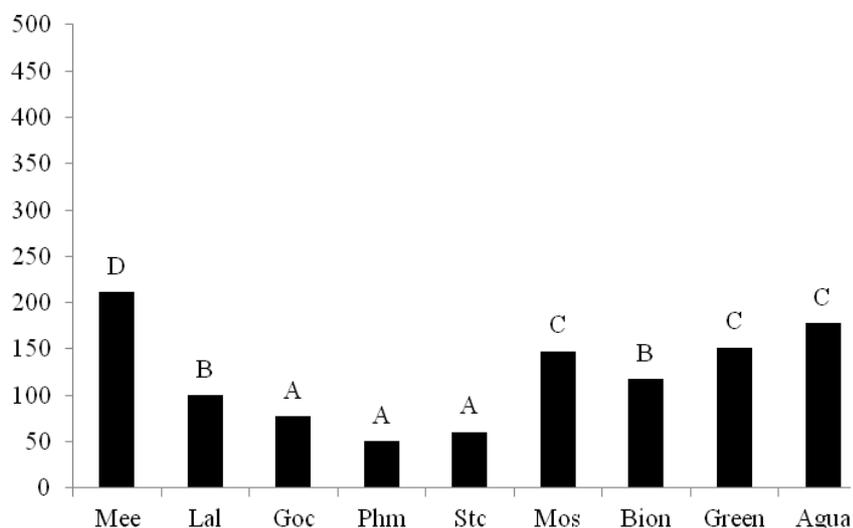


Gráfico 4 Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro em função da aplicação de diferentes tratamentos

Nota: Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Tratamentos: Mee – *Memnoniella echinata*; Lal – *Lappodochium lageniforme*; Goc – *Gonytrichum clamydosporium*; Phm – *Phialomyces macrosporus*; Stc – *Stachybotrys chartarum*; Mos – *Moorella speciosa*; Bion - Acibenzolar-S-meti - Bion®; Green - Greenforce®; Água; (Pvalor = 0,0001).

No terceiro screening, os fungos *Pseudobotrytis terrestris* e *Stachylidium bicolor*, não se diferenciaram estatisticamente dos controles positivos (Bion e Greenforce) nem da testemunha água e portanto nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir a severidade da doença.

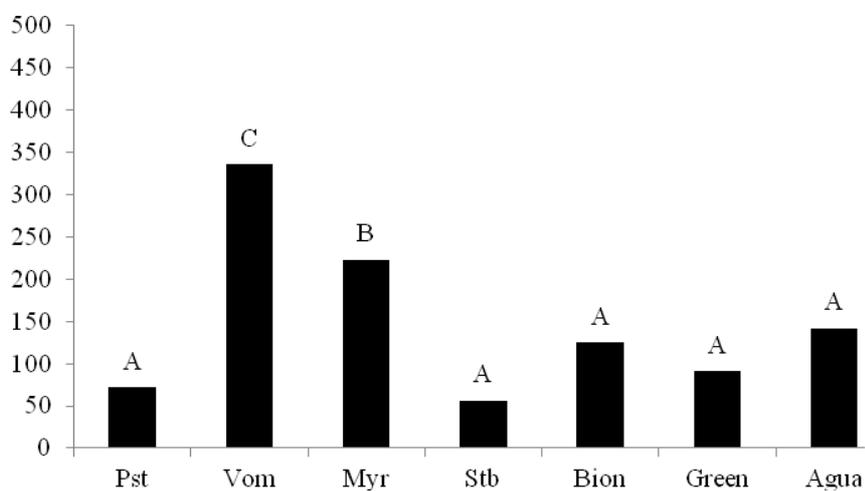


Gráfico 5 Área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada do cafeeiro, em função da aplicação de diferentes tratamentos

Nota: Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Tratamentos: Pst – *Pseudobotrytis terrestris*; Vom – *Volutella mínima*; Myr – *Myrothecium roridum*; Stb – *Stachylidium bicolor*; Bion - Acibenzolar-S-meti - Bion®; Green - Greenforce®; Água; (Pvalor = 0,0002).

5.3 Fenilalanina Amônia-liase – PAL

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi medida aos 7 e 14 dias, após o tratamento com o fungo sapróbio *Phialomyces macrosporus* e foi observada interação significativa (Pvalor = 0,0442) entre os tratamentos e o período de coleta. Para o desdobramento dos tratamentos dentro cada período amostrado, a atividade da enzima Fenilalanina Amônia-liase foi significativa aos 7 dias (Pvalor = 0,0284). Aos 14 dias, a atividade dessa enzima decresceu, para todos os tratamentos.

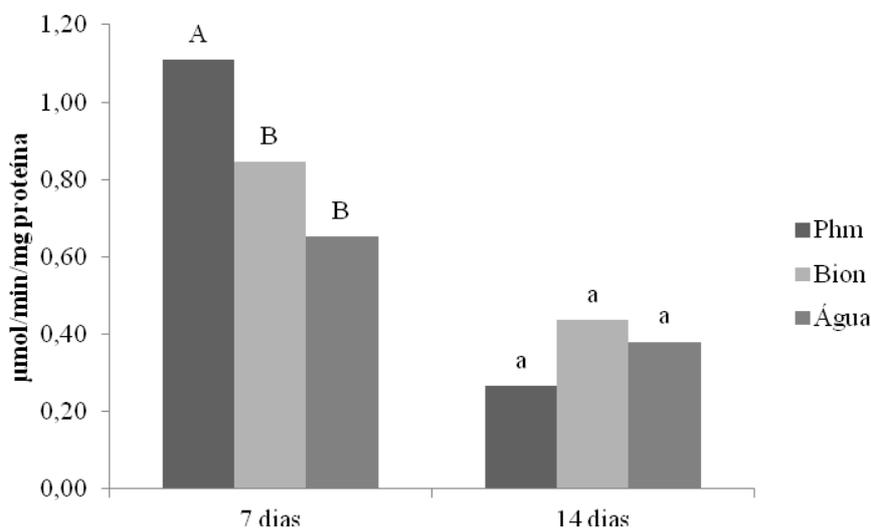


Gráfico 6 Atividade enzimática da Fenilalanina amônia-liase, em função dos tratamentos e dos dias após a inoculação

Nota: Os tratamentos seguidos de mesma letra maiúscula não diferem entre si aos 7 dias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os tratamentos seguidos de mesma letra minúscula não diferem entre si aos 14 dias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Tratamentos: Phm – *Phialomyces macrosporus*; Bion - Acibenzolar-S-meti - Bion®; Água; (Pvalor interação = 0,0442; Pvalor desdobramento tratamento dentro de coleta = 0,0284).

5.4 Peroxidase de Guaiacol – POX

A atividade da peroxidase (POX) foi medida aos 7 e 14 dias após o tratamento com o fungo sapróbio *Phialomyces macrosporus* e foi observada interação significativa (Pvalor = 0,0001), entre os tratamentos e o período de coleta. Para o desdobramento dos tratamentos dentro de cada período amostrado, a atividade da enzima peroxidase foi significativa aos 7 dias (Pvalor = 0,0001). Aos 14 dias, a atividade dessa enzima decresceu para os tratamentos

Phialomyces macrosporus e Bion®; e se manteve estável para a testemunha água.

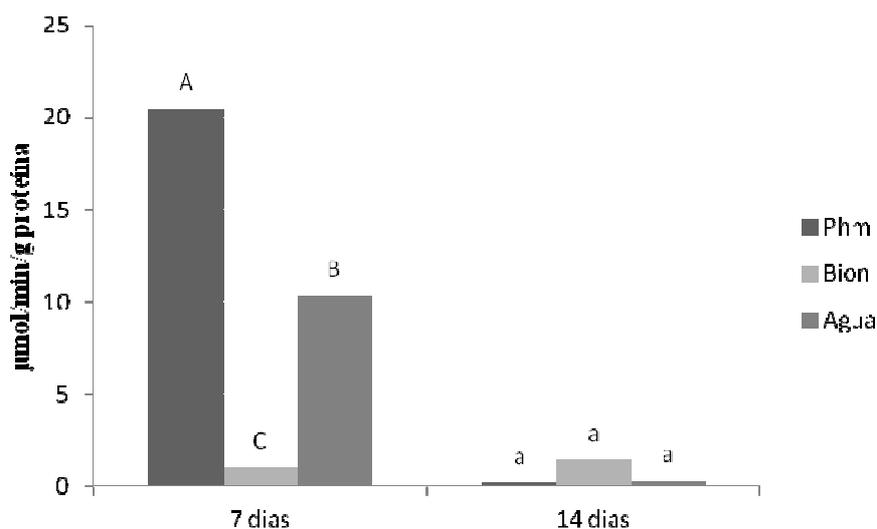


Gráfico 7 Atividade enzimática da Peroxidase de guaiacol, em função dos tratamentos e dos dias após a inoculação

Nota: Os tratamentos seguidos de mesma letra maiúscula não diferem entre si aos 7 dias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os tratamentos seguidos de mesma letra minúscula não diferem entre si aos 14 dias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Tratamentos: Phm – *Phialomyces macrosporus*; Bion - Acibenzolar-S-meti - Bion®; Água; (Pvalor interação = 0,0442; Pvalor desdobramento tratamento dentro de coleta = 0,0284).

5.5 Ascorbato peroxidase

A atividade da enzima Ascorbato peroxidase foi significativa aos 14 dias após o tratamento com o fungo sapróbio *P. macrosporus*.

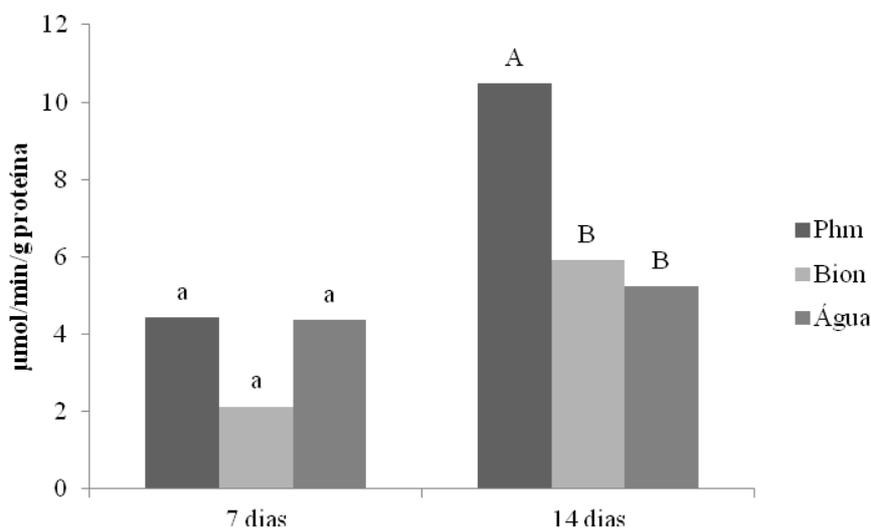


Gráfico 8 Atividade enzimática da Ascorbato peroxidase, em função dos tratamentos e dos dias após a inoculação

Nota: Os tratamentos seguidos de mesma letra minúscula não diferem entre si aos 7 dias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os tratamentos seguidos de mesma letra maiúscula não diferem entre si aos 14 dias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Tratamentos: Phm – *Phialomyces macrosporus*; Bion - Acibenzolar-S-meti - Bion®; Água; (Pvalor = 0,05).

5.6 Antibiograma

Para o teste de antibiose somente a testemunha positiva (sulfato de estreptomicina) teve ação direta contra o patógeno. Houve formação de um halo bem definido. Já no tratamento Casugamicina foi observado um halo tênue.

Na figura abaixo, podemos notar a presença dos halos somente nos tratamentos Estreptomicina e Casugamicina.



Figura 2 Antibiograma com as concentrações de *P. macrosporus* e com os controles positivos e negativos.

5.7 Produção de Voláteis

No teste de produção de voláteis, observa-se uma inibição no crescimento da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* quando inoculada na presença do fungo sapróbio *P. macrosporus*. Observou-se uma inibição tanto do *P. macrosporus* em meio BDA quanto em meio CMA. Em ambos os meios, o controle do patógeno foi maior quando esse foi inoculado dois dias após a inoculação do antagonista.

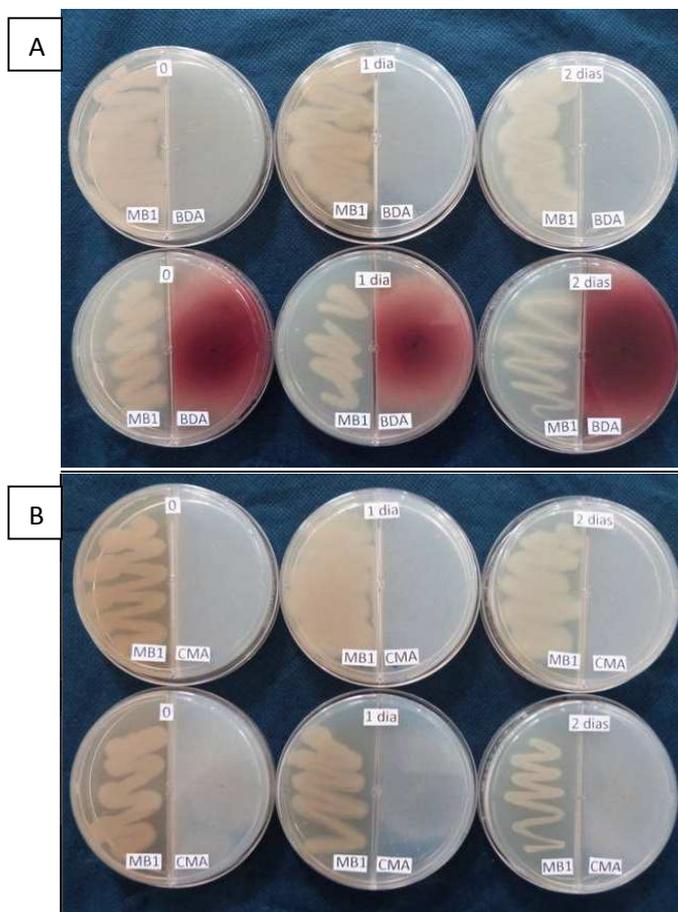


Figura 3 Teste de produção de voláteis

Nota: Figura A: Testemunha aos tempos 0, 1 dia e 2 dias (primeira linha); Antagonista desafiando patógeno (BDA) aos tempos 0, 1 dia e 2 dias (segunda linha). Figura B: Testemunha aos tempos 0, 1 dia e 2 dias (primeira linha); Antagonista desafiando patógeno (CMA) aos tempos 0, 1 dia e 2 dias (segunda linha).

6 DISCUSSÃO

No contexto da redução de uso de defensivos e sustentabilidade do agronegócio, os fungos sapróbios podem ser mais uma ferramenta para proteção de plantas contra a mancha aureolada, particularmente a proteção de mudas. No presente estudo, determinamos que diversos fungos sapróbios têm potencial de redução do progresso da doença em mudas.

O seu uso parece surtir efeito tanto em aplicações preventivas quanto curativas. Contudo, como controle biológico é uma estratégia cujo uso é recomendado preventivamente, a maior parte dos trabalhos de *screening* se concentraram nessa forma de aplicação. Supreendentemente, os fungos *M. levispora* e *M. equinata*, que apresentaram potencial para redução no progresso da doença curativamente (35 e 48%) e aumentaram o peso seco de folhas (31 e 62%) não foram capazes de proteger a planta contra a mancha aureolada.

Através da seleção para uso preventivo, conseguiu-se selecionar candidatos a agentes de biocontrole da mancha aureolada do cafeeiro. Dentre eles, *Phialomyces macrosporus* foi aquele que apresentou resultados mais consistentes de controle. Reduziu a AACPDS (42 a 72%) e aumentou a altura de plantas (40%).

O aumento do crescimento de plantas pode ser resultado da promoção de crescimento da planta, controle da doença ou resultado de ambos os mecanismos de ação. Estudos posteriores irão avaliar o potencial de promoção de crescimento da planta na ausência do patógeno. Isso pode representar uma razão a mais para o produtor adotar o uso desse fungo na lavoura cafeeira.

Um outro mecanismo que pode estar envolvido no controle da doença é a produção de compostos voláteis com ação inibitória. Uma inibição do desenvolvimento de colônias bacterianas foi observado quando se cultivou o

antagonista dois dias antes do patógeno. Em estudos recentes com esse fungo, está sendo observado que um aumento em diversidade e quantidade de metabólitos voláteis ocorre com maior intensidade com o aumento do tempo de cultivo do sapróbio, com pico máximo aparentemente do 5º para o 6º dia de cultivo.

Ainda em relação à inibição direta do patógeno, verificou-se também que compostos não voláteis não são capazes de inibir o patógeno. Contudo, faz-se necessário avaliar posteriormente se esse resultado se mantém para diferentes isolados do patógeno, pois o controle positivo casugamicina, relatado como inibidor do crescimento da bactéria (PARADELA et al., 2000; PATRÍCIO et al., 1999), teve uma inibição muito fraca, quando comparado à estreptomicina.

Um outro mecanismo de ação encontrado, e, muito provavelmente envolvido no controle da doença pelo *P. macrosporus* é a indução de resistência; Em outros estudos com indução de resistência, verificou-se que o indutor de resistência requer um tempo antes da aplicação para disparar as respostas de defesa (MEDEIROS et al., 2011). Diversos marcadores da resposta de defesa podem ser avaliados e quantificados. Neste trabalho, verificou-se que, aos sete dias, ou seja, no momento em que ocorreu a inoculação da bactéria nos ensaios de seleção (Gráfico 6 e 7), a planta tratada com o sapróbio obteve níveis mais altos de PAL e POX. Esse acúmulo cessa sete dias após, mas isso não significa que a planta não estaria pronta para responder a um novo ataque aos 14 dias após o tratamento, pois níveis mais altos de uma outra enzima envolvida na tolerância à estresse, a APX, teve seu nível mais alto no segundo período amostrado (Gráfico 8).

A aplicação do indutor de resistência ASM proporciona proteção contra *H. vastatrix* em mudas de cafeeiro das cultivares Mundo Novo e Catuaí Vermelho M-99 (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002) mas, em nossos estudos, não foi verificado

aumento na atividade das enzimas testadas (Gráficos 6-8), apesar de se observar controle da doença (Gráficos 1 e 4). Essa reposta pode ter ocorrido mais rapidamente, mas não ter sido duradoura, extinguindo-se o estímulo com absorção do produto.

Uma característica que pode garantir o efeito mais duradouro da atividade dessas enzimas após o tratamento com o sapróbio (uma atividade melhor que os indutores abióticos usados como controles positivos) é que esse fungo já foi relatado como endofítico de sementes de café (AHMAD; THARAPPAN; BONGIRWAR, 2003). Se o fungo sapróbio coloniza saprofiticamente ou simbioticamente a planta de café pode garantir uma proteção da planta mais duradoura que a simples aplicação de um indutor químico, explicando os resultados obtidos (HARMAN, 2000).

Além do mais, com o aumento da atividade de enzimas redutoras de espécies reativas de oxigênio pode-se esperar além da tolerância a estresse biótico, uma tolerância a estresse abiótico, em que espécies reativas de oxigênio são acumuladas, por exemplo, quando a planta está sujeita a estresse hídrico (MEDEIROS et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos das enzimas podemos também lançar perspectivas para estudos futuros avaliando a necessidade de reaplicação do produto. A atividade enzimática da PAL sofreu um decréscimo aos 14 dias em relação à atividade aos 7 dias, levando-nos a pensar que seria necessária uma reaplicação do fungo sapróbio a cada 7 dias para manutenção da proteção, protegendo-se as mudas contra possíveis infecções ou que não havendo inoculação aos 7 dias, como estratégia para poupar energia, a planta deixa de mobilizar repostas de defesa do metabolismo secundário.

Outros grupos de pesquisa estão avaliando a diversidade de metabólitos produzidos pelos fungos sapróbios que poderiam estar envolvidos no controle da doença. Uma estratégia que pode estar envolvida na eliciação de plantas é a

produção de pectatolases. Essas enzimas poderiam hidrolisar componentes da lamela média da planta liberando oligogalacturonídeos, que seriam reconhecidos pela planta e disparariam as respostas de defesa.

Portanto o *P. macrosporus* tem potencial para controle da mancha aureolada do cafeeiro, pelo menos na produção de mudas. O mecanismo de ação possivelmente envolve uma combinação de ação direta por compostos voláteis e a ativação de respostas de defesa da planta putativamente relacionadas à defesa de plantas contra patógenos; e até mesmo a promoção de crescimento de plantas.

7 CONCLUSÃO

Os fungos sapróbios *Memmoniella echinata* *M. levispora* podem reduzir o progresso da mancha aureolada, quando as mudas são tratadas curativamente.

Phialomyces macrosporus, quando usado preventivamente reduziu o progresso da mancha aureolada e aumentou o crescimento das plantas.

P. macrosporus produz compostos orgânicos voláteis com ação inibitória à *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

Este fungo, quando aplicado sobre plantas de café, induzem um aumento na atividade de fenilalanina amônia liase, peroxidase e ascorbato peroxidase.

Os fungos sapróbios *Curvularia eragrostidis* e *Gonytrichum clamidosporium* aumentaram a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença em relação à testemunha água e reduziu o tamanho das mudas, favorecendo a doença.

REFERÊNCIAS

AHMAD, R.; THARAPPAN, B.; BONGIRWAR, D. R. Impact of gamma irradiation on the monsooning of coffee beans. **Journal of Stored Products**, Elmsford, v. 39, n. 2, p. 149-157, 2003.

ANGELICO, C. L. **Aplicação do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries “Cladosporin” como bioprotetor da qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 321 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, 2005. p. 51-80.

BENATO, A. R. A. Indução de resistência no controle de doenças em pós-colheita: frutas e hortaliças. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 125-126, jan./mar. 2003.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003. p. 79-95.

BOLLER, T. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: MATTOO, A. K.; SUTTLE, J. C. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 293-314.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.).

Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, Â. D. et al. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 15-21, jan. 2009.

CARDOSO, R. M. L.; SERA, T. Obtenção de cultivares de *Coffea arabica* L. com resistência simultânea a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. e *Pseudomonas syringae* pv *garcae* Amaral et al. no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1., 1983, Oeiras. **Resumos...** Lisboa: SPC, 1983. p. 417-419.

CARVALHO, C. H. S. et al. Cultivares de café arábica de porte baixo. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações.** Brasília: CBP&D/Café; EMBRAPA Café, 2008. p. 157-226.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 2, p. 764-775, 1955.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: 2^a estimativa café, safra 2013.** Brasília, 2013. 19 p.

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

DOW, M. et al. Microbial glycosylated components in plant disease. In: MORAN, A. et al. (Ed.). **Microbial glycobiology: structures, relevance and application.** New York: Elsevier, 2009. p. 803-820.

EL-SHORA, H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from narrow cotyledons. **Plant Science, Clare**, v. 162, n. 1, p. 1-7, 2002.

GARCIA, M. et al. Are plant cell wall hydrolysing enzymes of saprobe fungi implicated in the biological control of the *Verticillium dahliae* pathogenesis? **Crop protection, Guildford**, v. 30, n. 1, p. 85-87, Jan. 2011.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease.** Columbia: University of Missouri, 1986. 443 p.

GÖRLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell, Rockville**, v. 8, n. 4, p. 629-643, 1996.

GUETSKYL, R. et al. Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guilhermondii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. **Biocontrol Science and Technology, Oxford**, v. 12, n. 6, p. 705-714, 2002.

GUZZO, S. D. et al. Crude Exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* and Commercial Xanthan Gum as inducers of protection in coffee plants against

Hemileia vastatrix. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 139, n. 2, p. 119-128, 1993.

GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with Hemileia vastatrix. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, 2009.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. responses to plant pathogenesis. In: BUCHANAN, B.; GUISSSE, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Helsinki: University of Helsinki, 2000. p. 1102-1156.

HARMAN, G. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Quebec, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

LAGAERT, S.; BELIEN, T.; VOLCKAERT, G. Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 20, n. 9, p. 1064-1073, 2009.

LEAO-FERREIRA, S. M. et al. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil: three new species and new records. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 96, n. 3/4, p. 479-494, May 2013.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, Honolulu, v. 46, n. 5, p. 636-641, Oct. 1997.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotiadiazole contra a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.

MEDEIROS, F. H. V. et al. Indução de tolerância à murcha biótica e abiótica em algodoeiro por rizobactérias. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA, NOVOS CONCEITOS E APLICAÇÕES, 10., 2010, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2010. p. 71-84.

_____. Transcriptional profiling in cotton associated with *Bacillus subtilis* (UFLA285) induced biotic-stress tolerance. **Plant and Soil**, The Hague, v. 347, n. 1/2, p. 1-11, Oct. 2011.

MEINERZ, C. C. et al. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 26-31, 2008.

MISAGHI, I. J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. New York: Plenum, 1980. 205 p.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-depedent reduction of nitroblue tetrazolium. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 212, n. 2, p. 540-546, Aug. 1993.

MOHAN, S. K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* Amaral et al. em cafeeiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1976. p. 56.

MOHAN, S. K.; CARDOSO, R. M. L.; PAIVA, M. A. Resistência em germoplasma de Coffea ao cretamento bacteriano incitado por *Pseudomonas garcae* Amaral et al. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 53-64, 1978.

MORAES, S. A. et al. Resistência de cafeeiros à *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIIRAS, 1., 1974, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1974. p. 183.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIO, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. E. Vectors of conditioned médium on activities on PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, London, v. 160, n. 2, p. 355-360, Jan. 2001.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", 2005. p. 139-153.

OLIVEIRA, J. R. **Idade da folha e suscetibilidade do cafeeiro à *Pseudomonas cichorii* e a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. 1988. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2006. 855 p.

PARADELA, A. et al. Eficiência do fungicida-bactericida Hokko Kasumin (kasugamicina) no controle de mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) em mudas de café (*Coffea arabica* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 26., 2000, Marília. **Anais...** Marília: PROCAFÉ, 2000. p. 247-248.

PARADELA-FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro.** Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 11 p. (Série Tecnológica APTA, Boletim Técnico IAC, 191).

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, dez. 1999.

PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum effects of lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas.** Lavras: UFLA, 2010. p. 69-101.

REGLINSKI, T. et al. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit leaves. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 46, n. 5, p. 716-721, 1997.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In:

THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Danish, 2004. p. 79.

_____. O papel dos MAMPs na imunidade em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 18, p. 1-50, 2010.

_____. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.

_____. Produtos comerciais à base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 361-380, 2006.

RODRIGUES, L. M. R. et al. Agressiveness of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* strains in *Coffea arabica* cvs. Mundo Novo and Borboun Amarelo. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 24., 2012, San José. **Proceedings...** San José: ASIC, 2012. p. 199.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, Dec. 1998.

SCHARDL, C. L.; PHILLIPS, T. D. Protective grass endophytes: where are they from and where are they going? **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 5, p. 430-438, May 1997.

SERA, G. H. et al. Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agronômicas em cafeeiros F2 segregantes para o gene *erecta*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 974-977, set./out. 2004.

SERA, T. Coffee genetic breeding at IAPAR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 179-190, 2001.

SERA, T.; ALTEIA, M. Z.; PETEK, M. R. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 217-251.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharides signaling for defence responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 223-233, 2001.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 117-127, 1977.

SILVA, H. S. A. et al. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, Orlando, v. 63, n. 1, p. 62-67, 2012.

SILVA, R. F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*)**. 2007. 109 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 1, p. 16-21, 1994.

STROBEL, G. et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 179-183, May 2002.

TUGAYÉ, M. T. E.; BOUDART, G.; BERNARD, D. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 157-163, Jan./Feb. 2000.

VANLOON, L. C.; BAKKER, P.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

VÁRZEA, V. M. P. et al. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 297-320.

VIECELLI, C. A. et al. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 87-96, 2009.

YEDIDIA, I. et al. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperillum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7343-7353, Dec. 2003.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV; Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. p. 120-122.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 843-849, 2011.