



**GILVANE APARECIDA DE CARVALHO RESENDE**

***Phialomyces macrosporus* COMO AGENTE  
BIOPROTETOR CONTRA *Colletotrichum  
gloeosporioides* E ESTIMULANTE DO  
CRESCIMENTO EM CAFEIEIRO**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**GILVANE APARECIDA DE CARVALHO RESENDE**

***Phialomyces macrosporus* COMO AGENTE BIOPROTETOR CONTRA  
*Colletotrichum gloeosporioides* E ESTIMULANTE DO CRESCIMENTO  
EM CAFEIEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Mário Sobral de Abreu

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Resende, Gilvane Aparecida de Carvalho.

*Phialomyces macrosporus* como agente bioprotetor contra  
*Colletotrichum gloeosporioides* e estimulante do crescimento em  
cafeeiro/ Gilvane Aparecida de Carvalho Resende. – Lavras : UFLA,  
2015.

105 p. : il.

Tese (doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Mário Sobral de Abreu.

Bibliografia.

1. Mancha manteigosa. 2. *Colletotrichum gloeosporioides*. 3.  
Controle biológico. 4. *Phialomyces macrosporus*. 5. Promotor de  
crescimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**GILVANE APARECIDA DE CARVALHO RESENDE**

***Phialomyces macrosporus* COMO AGENTE BIOPROTETOR CONTRA  
*Colletotrichum gloeosporioides* E ESTIMULANTE DO CRESCIMENTO  
EM CAFEIEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de julho de 2015.

Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dr. Samuel Pereira de Carvalho	UFLA
Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG

Dr. Mário Sobral de Abreu  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2015**

Aos meus pais, Roberto e Inê;

Ao meu irmão, Gilmar;

Aos meus sobrinhos, Vinícius e Ana Flávia;

Ao meu esposo, Álvaro pela compreensão,

amor e apoio em todos os momentos,

**OFEREÇO.**

À minha fonte de inspiração,

minha filha Letícia,

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela proteção, força e guia de todas as horas.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo acolhimento e oportunidade da obtenção de conhecimento.

Ao departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e à pessoa do Dr. Mário Sobral de Abreu, pela dedicada orientação, incentivo, amizade e convivência.

Ao professor Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, pelas valiosas sugestões e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende e ao Dr. José da Cruz Machado, por terem disponibilizados os seus laboratórios para execução deste trabalho.

Aos professores Dr. José da Cruz Machado, Dr. Samuel Pereira de Carvalho, Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza e Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães, pelas valiosas sugestões e por participarem da banca de defesa da tese.

A todo corpo docente, discente e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA que, de alguma maneira, colaboraram para a concretização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do curso de pós-graduação, pelos momentos compartilhados e aprendizado mútuo.

Às queridas amigas Cecília e Fernanda e aos amigos Cláudio, Helon e Felipe pelo apoio, incentivo e a ótima convivência no laboratório de Diagnose.

Aos amigos Vinícius Gouvêa de Carvalho e a Ana Cristina Andrade Monteiro, pela valiosa ajuda na realização dos experimentos.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, participaram desta etapa em minha vida. Meu sincero agradecimento.

## RESUMO GERAL

O desenvolvimento de métodos biológicos de controle de doenças vem ganhando importância na busca por formas mais sustentáveis de manejo da cultura do cafeeiro. A indução de resistência na planta é um dos modos de ação de microrganismos antagonistas no controle biológico de fitopatógenos. Alguns antagonistas exibem também a capacidade de estimular o crescimento da planta hospedeira. O presente trabalho consiste de dois estudos complementares. No primeiro, objetivou-se avaliar, em seguida à inoculação de sementes com o fungo antagonista *P. macrosporus*, o efeito bioprotetor contra *C. gloeosporioides* e promotor do crescimento de plântulas de cafeeiro. Foram comparados tratamentos com inoculação isolada ou combinada desses dois fungos, além de tratamentos controle e com utilização de fungicida. Avaliaram-se o desenvolvimento radicular inicial, a altura e a produção de biomassa na fase de plântulas. No segundo estudo, objetivou-se identificar processos enzimáticos influenciados pela inoculação de raízes do cafeeiro com o fungo *P. macrosporus* e confirmar sua capacidade de indução de resistência contra *C. gloeosporioides*, observando alterações das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e quitinase. Foram utilizados tratamentos com inoculação isolada ou combinada desses dois fungos em raízes de plântulas de cafeeiro, com ou sem realização de fermentos. Em períodos de 6, 12, 24 e 48 horas após a finalização dos procedimentos de inoculação, as raízes foram coletadas para determinação da atividade das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e quitinase. A inoculação de sementes com *P. macrosporus* proporciona bioproteção para o cafeeiro ao inibir a ação do patógeno *C. gloeosporioides*, além de exercer efeito bioestimulante, promovendo o crescimento de raízes e maior acúmulo de biomassa. A indução de resistência é um dos mecanismos responsáveis pela ação antagônica do fungo *Phialomyces macrosporus* contra *C. gloeosporioides* no cafeeiro, por meio do estímulo à atividade das três enzimas estudadas, sendo o principal mecanismo relacionado à ativação da peroxidase.

Palavras-chave: Biocontrole de doenças. Promotor de crescimento. Atividade enzimática. Peroxidase. Mancha manteigosa do cafeeiro. *Coffea arabica* L.

## GENERAL ABSTRACT

The development of biological methods for diseases control is becoming an important strategy in the search for more sustainable ways of managing coffee crop. The induction of plant resistance to pathogens is one of the means for biological control by antagonistic microorganisms. Some antagonists have the ability to stimulate the growth of the host plant. This dissertation consists of two complementary studies. In the first, we aimed to evaluate the inoculation of coffee seeds with antagonist fungus *P. macrosporus* as a bioprotector agent against *C. gloeosporioides*, and as a bio-stimulant for seedling growth. The treatments consisted of isolated or combined inoculations of both these fungi, in addition to a control treatment and a fungicide treatment. Initial root development, plant height and biomass production were evaluated at seedling stage. In the second study, we aimed to identify enzymatic processes influenced by inoculation of coffee roots with fungus *P. macrosporus*, and confirm its ability to induce resistance against *C. gloeosporioides*. Treatments consisted of isolated or combined inoculation of both these fungi on the roots of coffee seedlings, with or without intentional injury. In periods of 6, 12, 24 and 48 hours after completion of the inoculation procedures, the roots were collected to determine the activity of peroxidase, superoxide dismutase and chitinase. The inoculation of seeds with *P. macrosporus* provides bio-protection for coffee by inhibiting the action of pathogen *C. gloeosporioides*. In addition, we evidenced a bio-stimulant effect of *P. macrosporus*, which promotes higher root growth and biomass accumulation. The antagonism of *P. macrosporus* against *C. gloeosporioides* occurs via resistance induction, by stimulating the activity of the three studied enzymes. The activation of peroxidase is the main mechanism involved in the resistance induced by *P. macrosporus*.

Keywords: Disease biocontrol. Growth promoter. Enzymatic activity. Peroxidase. Coffee blister spot. *Coffea arabica* L.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o comprimento da raiz pivotante de plântulas de cafeeiro, aos 28 dias após o início da germinação .....50
- Figura 2 Curvas de crescimento da raiz principal de plântulas de cafeeiro sob efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus*, ao longo de 28 dias após o início da germinação .....52
- Figura 3 Aspecto visual da colonização de sementes de cafeeiro por *C. gloeosporioides* (esquerda) e por *P. macrosporus* (direita), após tempo de contato por seis dias em meio de cultura objetivando inoculação.....54
- Figura 4 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o número de raízes laterais por plântula de cafeeiro, aos 28 dias após o início germinação .....55
- Figura 5 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre a altura de plântulas de cafeeiro, aos 56 dias após o início da germinação.....57
- Figura 6 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o peso seco de raiz de dez plântulas de cafeeiro, aos 56 dias após o início da germinação.....58
- Figura 7 Aspecto visual de plântulas representativas dos tratamentos aos 56 dias após o início da germinação, com destaque para a inibição do crescimento radicular provocada pela inoculação com *C. gloeosporioides* (tratamento 2) e o estímulo

	decorrente da inoculação com <i>P. macrosporus</i> (tratamentos 3, 4 e 5).....	59
Figura 8	Efeito da inoculação de sementes com <i>C. gloeosporioides</i> e <i>P. macrosporus</i> sobre o peso seco da parte aérea de dez plântulas de cafeeiro, aos 56 dias após o início da germinação .....	60
Figura 9	Efeito da inoculação de sementes com <i>C. gloeosporioides</i> e <i>P. macrosporus</i> sobre o peso seco total de dez plântulas de cafeeiro, aos 56 dias após o início da germinação.....	61

### CAPÍTULO 3

Figura 1	Atividade de enzimas peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e quitinase (CHI) em raízes de plântulas de cafeeiro em função do tempo após inoculação.....	83
Figura 2	Atividade da enzima peroxidase (POX) em raízes de plântulas de cafeeiro, em função do tempo a partir da inoculação com <i>P. macrosporus</i> e/ou <i>C. gloeosporioides</i> , sem (A) e com fermento (B).....	86
Figura 3	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em raízes de plântulas de cafeeiro, em função do tempo a partir da inoculação com <i>P. macrosporus</i> e/ou <i>C. gloeosporioides</i> , sem (A) e com fermento (B).....	92
Figura 4	Atividade da enzima quitinase (CHI) em raízes de plântulas de cafeeiro, em função do tempo a partir da inoculação com <i>P. macrosporus</i> e/ou <i>C. gloeosporioides</i> , sem (A) e com fermento (B).....	96

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Tratamentos em sementes avaliados no experimento .....	44
Tabela 2	Resumo da análise de variância para as variáveis estudadas quanto aos diferentes tratamentos de sementes.....	49

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Tratamentos de inoculação em raízes de cafeeiro sem e com ferimento.....	77
Tabela 2	Resumo da análise de variância para as variáveis estudadas .....	82
Tabela 3	Atividade da enzima peroxidase ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$ ) em raízes de plântulas de cafeeiro, a partir da inoculação com <i>P. macrosporus</i> e/ou <i>C. gloeosporioides</i> , sem e com ferimento, e em diferentes períodos de amostragem (h) após a aplicação dos tratamentos .....	85
Tabela 4	Atividade da enzima superóxido dismutase ( $\text{U min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$ ) em raízes de plântulas de cafeeiro, a partir da inoculação com <i>P. macrosporus</i> e/ou <i>C. gloeosporioides</i> , sem e com ferimento, e em diferentes períodos de amostragem (h) após a aplicação dos tratamentos .....	91
Tabela 5	Atividade da enzima quitinase ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$ ) em raízes de plântulas de cafeeiro, a partir da inoculação com <i>P. macrosporus</i> e/ou <i>C. gloeosporioides</i> , sem e com ferimento, e em diferentes períodos de amostragem (h) após a aplicação dos tratamentos .....	95

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução Geral.....	14
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2 <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1 <b>Complexo <i>Colletotrichum</i> spp. e a cultura do cafeeiro</b> .....	17
2.2 <b>Mancha manteigosa no cafeeiro</b> .....	18
2.3 <b>Transmissão de <i>Colletotrichum</i> spp. por sementes</b> .....	19
2.4 <b>Controle biológico</b> .....	20
2.5 <b>Indução de resistência de plantas a fitopatógenos</b> .....	22
2.6 <b>Promotores de crescimento em plantas em relação a manejo de doenças</b> .....	25
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>CAPÍTULO 2</b> Potencial de <i>Phialomyces macrosporus</i> em proteger o cafeeiro contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e estimular o crescimento da planta.....	36
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	38
2 <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
2.1 <b>Obtenção e preparo dos inóculos</b> .....	40
2.2 <b>Obtenção e preparo das sementes de cafeeiro</b> .....	41
2.3 <b>Aplicação dos tratamentos de inoculação das sementes</b> .....	42
2.4 <b>Condução do experimento e avaliações</b> .....	44
3 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
3.1 <b>Efeito bioprotetor do fungo <i>P. macrosporus</i> sobre o desenvolvimento radicular inicial</b> .....	47
3.2 <b>Efeito de promoção de crescimento em plântulas estimulada por <i>P. macrosporus</i> no cultivo de substrato</b> .....	56
4 <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63
5 <b>CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>CAPÍTULO 3</b> Potencial de <i>Phialomyces macrosporus</i> em induzir resistência contra o fitopatógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em plântulas de cafeeiro.....	69
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	71
2 <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	73
2.1 <b>Obtenção e preparo dos inóculos</b> .....	73
2.2 <b>Obtenção e preparo das sementes de cafeeiro</b> .....	74
2.3 <b>Obtenção das plântulas de cafeeiro e aplicação dos tratamentos</b> .....	75
2.4 <b>Preparo de extratos de raízes e avaliação da atividade de enzimas</b> .....	78
2.5 <b>Análises estatísticas</b> .....	80
3 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	81

<b>3.1</b>	<b>Atividade de peroxidase.....</b>	<b>84</b>
<b>3.2</b>	<b>Atividade de superóxido dismutase .....</b>	<b>90</b>
<b>3.3</b>	<b>Atividade de quitinase .....</b>	<b>94</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>98</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>

## CAPÍTULO 1 Introdução Geral

### 1 INTRODUÇÃO

A atividade cafeeira se destaca historicamente na balança comercial brasileira com expressiva geração de divisas. O desenvolvimento tecnológico no manejo dessa cultura evoluiu substancialmente nas últimas décadas e atualmente a produção de café no Brasil responde por cerca de um terço da produção mundial, sendo assim o maior produtor, exportador e grande consumidor. A principal região produtora é o Sudeste e os principais estados produtores são Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo com 53, 23 e 8% da produção respectivamente (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2015).

Dentre os fatores que influenciam a produtividade da cultura, a incidência de doenças desafia técnicos e agricultores, implicando em redução na produção e na qualidade do café. Problemas fitossanitários são ocasionados principalmente por fungos causadores da ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*), da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), da mancha de phoma (*Phoma* spp.) e das antracnoses (*Colletotrichum* spp.), dentre outras. Os relatos mais comuns de doenças associadas ao *Colletotrichum* spp. são as antracnoses em folhas e frutos, a seca de ponteiros e a mancha manteigosa.

O *Colletotrichum gloeosporioides* é o agente etiológico da mancha manteigosa. Produtores têm observado aumento na incidência e severidade da doença nas lavouras. As plantas apresentam morte de hipocótilos, necrose de ramos laterais com morte das espículas, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos, necrose e mumificação dos frutos e mancha manteigosa nas folhas levando à abscisão. Como consequência, há diminuição da produtividade, que em algumas plantas pode ser nula (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009).

No patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro, o controle genético ainda é pouco conhecido. A doença foi descrita em lavouras das cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo, Rubi, Mundo Novo e Catucaí Vermelho (PASIN; ABREU; SOUZA, 2011), e até o momento não há um produto químico para o manejo da doença registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Nesse cenário, ganha importância a possibilidade de se desenvolverem métodos alternativos para o manejo da mancha manteigosa baseados no controle biológico. Uma das opções consiste na utilização de microrganismos antagonistas que possam inibir a colonização das plantas de cafeeiro pelo patógeno *C. gloeosporioides*. A ação antagonista pode se dar por meio de processos de antibiose, competição, parasitismo ou indução de resistência na planta (CHET, 1992; HARAN; SCHICKLER; CHET, 1996; STRANGE, 2003). Esta última constitui-se numa das estratégias mais promissoras no controle biológico de doenças. O estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos pode ser acompanhado por meio do monitoramento da atividade de determinadas enzimas, sendo o aumento da atividade um indicador da ocorrência de resistência induzida (MACAGNAN et al., 2008) a partir de um tratamento que dispare tal processo na planta. Entre as várias enzimas envolvidas nesse processo, as peroxidases, a superóxido dismutase e as quitinases têm recebido atenção pela importância em diversas frentes de atuação nos mecanismos de defesa das plantas.

Em alguns casos, além de atuar favorecendo a planta contra o patógeno, o agente de controle biológico também pode expressar capacidade de promover o crescimento vegetal, proporcionando simultaneamente os efeitos protetor e estimulante do desenvolvimento da planta hospedeira (BOTREL, 2013; PIEROZZI, 2013).

Dentre as atividades de pesquisa da UFLA nessa temática, uma das iniciativas refere-se à prospecção de fungos sapróbios do semiárido da região

Nordeste quanto ao potencial de uso para o biocontrole de doenças de plantas. Dentre os microrganismos testados, o fungo *Phialomyces macrosporus* tem se mostrado promissor, combinando ação antagonica contra fitopatógenos e efeito promotor do crescimento vegetal (BOTREL, 2013; LABORDE, 2014; PINTO, 2013; PIEROZZI, 2013). Nesse contexto, no presente trabalho objetivou-se: 1) avaliar, em seguida à inoculação de sementes com o fungo antagonista *P. macrosporus*, o efeito bioprotetor contra *C. gloeosporioides* e promotor do crescimento de plântulas de cafeeiro e 2) identificar processos enzimáticos influenciados pela inoculação de raízes de plântulas de cafeeiro com o fungo *P. macrosporus* e confirmar sua capacidade de indução de resistência contra *C. gloeosporioides*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Complexo *Colletotrichum* spp. e a cultura do cafeeiro

Fungos do gênero *Colletotrichum* estão entre os mais importantes agentes fitopatogênicos nas regiões tropicais e subtropicais. Espécies desse gênero causam doenças de significativo impacto econômico em plantações de cereais, leguminosas, hortaliças e também em culturas perenes como madeiras, fruteiras diversas e o cafeeiro.

A primeira descrição de *Colletotrichum* em cafeeiro foi feita em 1902 por Noack, referente a um isolado do Brasil, denominado de *Colleotrichum coffeanum*. No Kenya, em 1926, McDonald relatou a ocorrência da variante “virulans” de *Colletotrichum*, associada à *Coffee Berry Disease*. As principais doenças no complexo *Colletotrichum* x cafeeiro são a antracnose de folhas e frutos, seca ou morte de ponteiros (*die-back*), queima-castanha (*brown blight*), a CBD (“*coffee berry disease*”), a antracnose dos frutos verdes e a mancha manteigosa (MCDONALD, 1926; NOAK, 1902; OROZCO-MIRANDA et al., 2002; RODRIGUES; VÁRZEA; MEDEIROS, 1991; VARGAS; GONZALES, 1972; WALLER et al., 1993).

A antracnose possui ocorrência na maioria das regiões onde a cultura cafeeira se desenvolve, havendo variações na natureza e intensidade dos danos provocados (GALLI; CARVALHO, 1980). As espécies de *Colletotrichum* são consideradas facultativas. A fase saprofítica pode se constituir em importante fonte de inóculo para a sua disseminação. Períodos contínuos de alta umidade (sete a 10 dias de chuva), temperaturas amenas em torno de 22 °C e altitude elevada favorecem o desenvolvimento de *Colletotrichum* spp. que passa da fase saprofítica para a parasítica (PARADELA FILHO et al., 2001).

## 2.2 Mancha manteigosa no cafeeiro

No Brasil, existem vários relatos do ataque de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz em cafeeiro, causando manchas em folhas e danos em frutos (NECHET, 1999). A mancha manteigosa em *Coffea arabica* L. foi relatada pela primeira por Wellman (1957), na Costa Rica. Os sintomas foram originalmente descritos como manchas circulares medindo 2 a 6 mm de diâmetro, não necróticas, de coloração verde-clara em ambas as faces das folhas, tendo sido atribuída à causa virótica sem, contudo, demonstrar sua transmissão. Posteriormente, Vargas e Gonzalez (1972) demonstraram ser ocasionada por agente fúngico do gênero *Colletotrichum*.

No Brasil, Mansk e Matiello (1977) relataram a ocorrência da mancha manteigosa no estado do Espírito Santo, em lavouras de café Conilon (*Coffea canefora*), sendo observado ataque em folhas, frutos e ramos. Nas folhas novas, aparecem, inicialmente, manchas de cor verde-claro, com aspecto oleoso, menos brilhante comparado com a superfície normal da folha, medindo de 2 a 10 mm de diâmetro. No estágio mais avançado, as manchas apresentam o centro necrótico e coalescem, causando a queda prematura das folhas. Nos frutos e ramos, aparecem lesões menores, com 2 a 3 mm de diâmetro, deprimidas, necróticas, de coloração marrom-claro e bordas irregulares. Os cafeeiros acometidos pela mancha manteigosa apresentam desfolha e seca progressiva dos ramos, da extremidade para a base. As brotações são novamente atacadas, podendo ocorrer morte prematura das plantas, em menos de um ano de ataque. Os ataques mais intensos são observados nas folhas e nos ramos novos, em plantas adultas, durante a fase de maior crescimento vegetativo, de outubro a fevereiro (MANSK, 1990).

Em Minas Gerais, a mancha manteigosa, causada por *C. gloeosporioides*, foi constatada no município de Cristais, no início da década de

1990, em lavouras de *Coffea arabica*, causando manchas nas folhas, em áreas circulares localizadas, de cor verde-claro com diâmetro de 3-5 mm e, no centro destes círculos, desenvolviam áreas necróticas em cor marrom-claro (DORIZZOTTO; ABREU, 1993). Existem relatos da doença também nos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo, na espécie *Coffea arabica* e nos estados do Espírito Santo, Rondônia e Amazonas, na espécie *Coffea canephora* (COSTA; VENTURA; FERRÃO, 2003; FERREIRA et al., 2004).

### **2.3 Transmissão de *Colletotrichum* spp. por sementes**

Na literatura, há relatos da transmissão de *Colletotrichum* spp., por sementes de diversas espécies vegetais, tais como leguminosas, poáceas, solanáceas e malváceas. Na cultura cafeeira, *Colletotrichum* spp. é enquadrado como transmissível pelas sementes. Orozco-Miranda et al. (2002), avaliando frutos e sementes de café arábica das cultivares Catucaí Amarelo e Catucaí Vermelho, verificaram que a incidência de *Colletotrichum* spp. nos frutos cereja, foi de 100% e 89% respectivamente. O fungo pôde ser reisolado de todos os órgãos das plântulas provenientes de sementes nas quais havia sido detectada a presença do patógeno por meio de teste de sanidade.

A transmissibilidade via sementes de *Colletotrichum gloeosporioides* (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2010; MAIA, 2012; MUNAUT et al., 1998), agente causal da mancha manteigosa, é mais um agravante em relação a essa doença, visto que para a correta implantação de uma lavoura cafeeira é necessário utilizar mudas saudáveis. Assim, um requisito básico é a aquisição de sementes saudáveis com o intuito de originar mudas de alta qualidade, desenvolvimento uniforme, proporcionar um melhor rendimento por área e maior longevidade das plantas (MEIRELES et al., 2007).

Segundo Orozco-Miranda (2003), os frutos e sementes são importantes veículos de disseminação, sobrevivência e transmissão de *Colletotrichum* spp. em cafeeiro. Esse fato chama a atenção para aqueles isolados que são patogênicos. Lins (2006) verificou por microscopia eletrônica de varredura que *Colletotrichum gloeosporioides* está presente nos tecidos de plântulas oriundas de sementes coletadas de cafeeiros com sintomas da mancha manteigosa. A mesma autora relata que a germinação das sementes obtidas de plantas doentes é retardada em relação às sementes de plantas saudáveis e que dificilmente se desenvolvem até o estágio de palito de fósforo.

Ferreira (2006) avaliou a transmissibilidade natural da mancha manteigosa da semente para a muda, utilizando sementes coletadas de plantas doentes e de plantas saudáveis da cultivar Catucaí. Foi constatado que não houve diferença significativa no percentual de germinação, entretanto, com o desenvolvimento das plântulas, observou-se morte de hipocótilos originados das sementes oriundas de plantas com mancha manteigosa. Neste caso, a incidência de *C. gloeosporioides* nos hipocótilos foi de 94,8, com severidade de 86,8%, enquanto as sementes colhidas de plantas saudáveis formaram plântulas vigorosas.

#### **2.4 Controle biológico**

Em 1931, o termo “controle biológico” foi utilizado pela primeira vez, em um artigo sobre mal do pé do trigo (BELLOW; FISHER, 1999). Na década de 1970, Baker e Cook (1974) definiram controle biológico como a:

redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas.

Mais tarde, estes mesmos autores redefiniram o controle biológico como sendo “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por meio de um ou mais organismos que não o homem” (BETTIOL, 1991). Nesta perspectiva, o controle biológico passou a incorporar as práticas culturais para a obtenção de ambiente adequado aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambos, bem como o melhoramento da planta para resistência ao patógeno em potencial ou a adequação do hospedeiro às atividades antagonísticas de microrganismos.

A utilização do controle biológico de fitopatógenos tem despertado maior interesse na comunidade científica atualmente, tendo em vista as preocupações com o ambiente devido ao risco de contaminação causada pelos pesticidas, além da segurança do homem na lavoura, a saúde da população, o custo de produção e a resistência de patógenos aos agrotóxicos. Assim, os princípios dos métodos alternativos de controle se fazem necessários no manejo das principais doenças das plantas cultivadas (SHTIENBERG et al., 1994). Nos países europeus, o uso de fungicidas está sendo cada vez mais restringido (ADASKAVEG; FÖRSTER, 2010). Neste cenário, pesquisadores têm buscado a associação de fungicidas convencionais e bioprotetores na tentativa de reduzir o número de aplicações de agrotóxicos no campo.

Microrganismos aptos à utilização no biocontrole podem inibir a atuação do fitopatógeno por diferentes modos de ação como a antibiose, a competição, o parasitismo e a indução de resistência na planta (CHET, 1992; HARAN; SCHICKLER; CHET, 1996; STRANGE, 2003).

Na antibiose, os microrganismos antagonistas possuem a capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos. Entre eles, estão antibióticos (fenazinas, acetil floroglucinol, oomicina, antranilatos), bacteriocinas, sideróforos e compostos voláteis. A disputa por nutrientes, espaço físico, água e luz faz parte do modo de ação por competição e é muito comum entre os microrganismos

(SCHARDL; PHILIPS, 1997). O parasitismo parece ser o modo mais eficiente de antagonismo no controle biológico, pois os hiperparasitas dependem dos seus hospedeiros para sobreviverem e estão sujeitos às mesmas variações ambientais (SAITO et al., 2009). Já o mecanismo da indução de resistência a patógenos ativa os mecanismos de defesa latente na planta, sendo considerado eficiente por apresentar-se menos agressivo à saúde da população e aos agroecossistemas (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

## **2.5 Indução de resistência de plantas a fitopatógenos**

As principais formas de resistência são a sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance* - SAR), a sistêmica induzida (*Induced Systemic Resistance* - ISR), a de hipersensibilidade (*Hypersensitive Response* - HR) e a indução de proteínas relacionadas à patogênese (*Pathogenesis-related proteins* - PR-Proteínas). A resistência induzida pode ser ativada em plantas por uma série de fatores físicos, químicos e biológicos que constituem os chamados elicitores, cuja ação leva a planta a evitar ou atrasar a entrada e/ou a atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos próprios de defesa (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005; STANGARLIN et al., 2011). Quando a planta reconhece os elicitores, dispara mecanismos para ativar genes envolvidos em respostas de defesa, as quais podem ser estruturais e bioquímicas (PASCHOLATI; LEITE, 1995), sem, contudo, causar qualquer alteração no genoma da planta (BAYSAL; SOYLU; SOYLU, 2003). Após a ativação de genes, as reações seguem por uma rota de sinalização para expressar a defesa da planta nas categorias de resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Quando as plantas são expostas ao agente indutor de resistência, as rotas de sinalização são intensificadas e desencadeiam aumento na atividade de enzimas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos. Desse modo, o estado de indução de resistência em plantas pode ser acompanhado por meio do monitoramento de determinadas enzimas (MACAGNAN et al., 2008) que também funcionam como marcadores de resistência induzida (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; TUZUN, 2001). Entre as várias enzimas vinculadas a estes processos, as peroxidases, a superóxido dismutase e as quitinases têm recebido atenção por seu destacado papel nas estratégias de defesa das plantas.

A peroxidase tem sido associada a uma gama de processos de desenvolvimento de defesa na planta em respostas a estresses bióticos e abióticos, além de expressar papel importante na desintoxicação celular (ALMAGRO et al., 2009; BAYSAL; SOYLU; SOYLU, 2003; GULSEN et al., 2010; HIRAGA et al., 2001; OLIVEIRA, 2006; WAR et al., 2011). No seu metabolismo normal, os organismos estão constantemente expostos ao superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que constituem espécies reativas de oxigênio. Mas quando há o reconhecimento do fitopatógeno, a produção dessas moléculas aumenta com a chamada “explosão oxidativa”, o que as torna tóxicas ao patógeno e também à célula do hospedeiro, ocorrendo assim o “estresse oxidativo” na planta (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014; OLIVEIRA, 2006). Esse estresse é prevenido ou amenizado pela ação de enzimas antioxidativas. A superóxido dismutase converte o  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , que, por sua vez é decomposto pela atuação da peroxidase, a qual também apresenta atividade antimicrobiana direta (PENG; KÚC, 1992).

Outra importante molécula induzida pela peroxidase é a lignina, substância orgânica mais abundante nas plantas, depois da celulose. A lignina ocorre na parede celular das plantas superiores e funciona como barreira física à

penetração fúngica (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). A lignificação pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais de várias maneiras: estabelecendo barreiras mecânicas ao avanço e desenvolvimento do patógeno, modificando a parede celular e tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas produzidas pelos patógenos (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). Segundo Golan, Rubinowska e Górska-Drabik (2013), alterações nos níveis da peroxidase nas plantas têm sido relatadas entre as primeiras respostas da planta ao ataque de patógenos.

A superóxido dismutase é uma das enzimas antioxidativas intracelulares mais eficazes e presente em todos os organismos aeróbicos, anaeróbios facultativos e em compartimentos subcelulares propensos à explosão oxidativa devido a um estresse abiótico ou biótico. Esta enzima atua diretamente contra os efeitos tóxicos de níveis elevados das espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL; TUTEJA, 2010; SCANDALIOS, 2005).

A quitinase é efetiva na defesa da planta contra fungos patogênicos por catalisar a hidrólise da quitina componente da parede celular de fungos. A atividade dessa enzima é incrementada na presença de  $\beta$  1-3 glucanase que é responsável por clivar a glucana, outro componente da parede celular de fungos. Ao realizarem a lise das hifas, essas enzimas inibem o crescimento de fungos patogênicos na planta hospedeira. Nesse processo, ocorre também a liberação de oligômeros de glucana e quitina do patógeno, que funcionam como elicitores eficientes para ativar resposta de defesa das plantas (CAMPOS; GROSSI DE SÁ, 2002). Estudos têm demonstrado que a expressão de genes de quitinase em plantas aumenta a resistência das plantas a patógenos (LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Portanto, quando a planta sofre algum dano devido a estresses bióticos ou abióticos, imediatamente acionam seus mecanismos de defesa, com a indução

de moléculas de sinalização que irão ativar genes relacionados com essas funções. As enzimas antioxidativas, superóxido dismutase e peroxidase, irão atuar eliminando espécies reativas de oxigênio que são formadas em resposta ao ataque de fitopatógenos. Além disso, essas enzimas, juntamente com a quitinase, desempenham outros papéis de defesa nos vegetais, inclusive participando na indução de resistência aos fitopatógenos.

Na natureza, existem diversos fungos que apresentam características interessantes para serem usados como agentes de controle biológico, inclusive como indutores de resistência contra fitopatógenos. Todavia, ainda são pouco estudados, necessitando assim de avanços no conhecimento a respeito do seu potencial antagonista. Para mudanças nesse cenário, é importante a busca e a utilização de microrganismos que possuem características desejáveis para atuação em patossistemas. Produtos biocompatíveis, de baixo impacto ambiental e toxicidade aos organismos não alvos poderão trazer grande contribuição para a sustentabilidade dos agroecossistemas (BETTIOL, 2013).

## **2.6 Promotores de crescimento em plantas em relação a manejo de doenças**

A utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal é uma das alternativas para a agricultura moderna enfrentar o desafio de promover o aumento da produção de culturas com maior sustentabilidade. Atualmente, existem vários resultados de pesquisas relacionados à promoção de crescimento em plantas por meio da ação de rizobactérias e bactérias endofíticas (CARVALHO, 2004), mas são escassos os relatos de efeitos estimulantes proporcionados por espécies fúngicas, a exemplo do que já se conhece sobre os benefícios proporcionados por diversas espécies de *Trichoderma*.

No caso das rizobactérias promotoras do crescimento, a atuação se dá por meio de dois mecanismos, um direto e outro indireto. O mecanismo direto

envolve produção de compostos que estimulam a produção de hormônios para o crescimento de planta como as auxinas, citocininas, e giberelinas além de favorecer a absorção de água e nutrientes minerais. Já no mecanismo indireto, as rizobactérias atuam como agentes de controle biológico de doenças e há envolvimento na diminuição ou prevenção dos efeitos danosos de microrganismos fitopatogênicos, pela produção de sideróforos e metabólitos com ação fungicida (POLESI, 2011).

O uso de fungos antagonistas como *Trichoderma* spp. tem demonstrado resultados promissores no controle de fitopatógenos (SILVA et al., 2011). Na literatura, há relatos de várias espécies de plantas que ao serem inoculadas com *Trichoderma* aumentaram a produção de massa seca (CARVALHO FILHO, 2008; CHAGAS et al., 2014; DINIZ et al., 2006; MACHADO et al., 2011). Para Chet, Inbar e Hadar (1997), o sucesso no uso de espécies de *Trichoderma* se deve à sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver em condições desfavoráveis e agressividade contra fungos patogênicos. Segundo Melo (1996), a inoculação de sementes com esse fungo aumenta o crescimento radicular das plântulas, sendo que a promoção do enraizamento envolve a produção de hormônios vegetais, os quais favorecem a absorção e translocação de nutrientes, tornando o vegetal mais resistente ao ataque de patógenos. O *Trichoderma* também atua como promotor do crescimento da parte aérea (ETHUR, 2006). Atualmente, existem cerca de 30 marcas comerciais registrados para o controle de vários fitopatógenos na agricultura (BETTIOL, 2012).

Estudos recentes envolvendo o fungo *Phialomyces macrosporus* forneceram indicações de que além de favorecer a planta contra fitopatógenos, esse potencial agente de controle biológico também pode promover o crescimento vegetal, proporcionando simultaneamente os efeitos protetor e estimulante do desenvolvimento da planta hospedeira (BOTREL, 2013; PIEROZZI, 2013).

Nessa vertente de pesquisa, além da comprovação de benefícios, a elucidação dos mecanismos operantes na interação da planta com esses microrganismos de dupla aptidão constitui importante passo no desenvolvimento de novos insumos biológicos. Estes deverão ser parte comum da agricultura nas próximas décadas, em que certamente aqueles produtos biotecnológicos capazes de desencadear benefícios de proteção contra patógenos e promoção do crescimento da planta hospedeira agregarão vantagens ao agricultor e menor risco ao ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTER, H. New developments in postharvest fungicide registrations for edible horticultural crops and use strategies in the United States. In: PRUSKY, D.; GULLINO, M. L. (Ed.). **Post-harvest pathology series: plant pathology in the 21st century**. New York: Springer, 2010. v. 2, p. 107-111.
- ALMAGRO, L. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 377-390, Feb. 2009.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p.
- BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Wageningen, v. 52, n. 6, p. 747-753, Dec. 2003.
- BELLOWS, T. S.; FISHER, T. W. **Handbook of biological control**. San Diego: I Press, 1999. 1046 p.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: \_\_\_\_\_. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, 1991. p. 1-3.
- BETTIOL, W. Perspectivas de produtos biológico para o controle de doenças de plantas. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 2003, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus, 2003. p. 50-62.
- BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2012. 155 p. (Documentos, 88).

BOTREL, D. A. **Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*) no cafeeiro**. 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

CAMPOS, M. A.; GROSSI DE SÁ, M. F. Resistência mediada pela expressão de proteínas e peptídeos antimicrobianos. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 127-155.

CARVALHO, G. A. **Efeito *in vitro* e *in vivo* de filtrados de rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. do cafeeiro**. 2004. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CARVALHO FILHO, M. R. et al. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 21 p. (EMBRAPA. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 225).

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.

CHAGAS, A. F. J. et al. Eficiência da inoculação combinada de rizóbio e *Trichoderma* spp. em diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no cerrado (Savana Brasileira). **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 37, n. 1, p. 20-28, 2014.

CHET, I. Microbial control plant disease. In: \_\_\_\_\_. **Environmental microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 335-354.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungak antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D. T.; SODERSTROM, B. (Ed.). **The mycota IV: enviromental and microbial relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 165-184.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 2 jul. 2015.

COSTA, H.; VENTURA, J. A.; FERRÃO, M. A. Mancha manteigosa em café arábica na região serrana do Estado do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: EMBRAPA Café, 2003. p. 206.

DINIZ, K. A. et al. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 37-43, 2006.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeanum* NOACK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 189, ago. 1993. Resumo. Suplemento.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de Fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 153 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 880-885, jul./ago. 2005.

FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAEEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: NECAF, 2004. 1 CD-ROM.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, Aug. 2005.

GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T. de. Doenças do cafeeiro - *Coffea arabica* L. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 128-140.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.

GOLAN, K.; RUBINOWSKA, K.; GÓRSKA-DRABIK, E. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (SW.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. infestation. **Acta Biologica**, Cracoviensia, v. 55, p. 93-98, 2013.

GULSEN, O. et al. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*. **Arthropod Plant Interact**, Paris, v. 4, n. 12, p. 45-55, Dec. 2010.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, New York, v. 142, n. 9, p. 2321-2331, 1996.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidase. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 462-468, May 2001.

LABORDE, M. C. F. **Avaliação de fungos sapróbios na sobrevivência de *Cercospora coffeicola***. 2014. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LINS, S. R. de O. **Estudos histopatológicos da mancha manteigosa em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e comportamento de isolados de *Colletotrichum* spp em plantas obtidas por cultura de embrião**. 2006. 117 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

LOON, L. C. van; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

- MACAGNAN, D. et al. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, n. 1, p. 34-37, jan./fev. 2008.
- MACHADO, R. G. et al. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 111-126, 2011.
- MANSK, Z. Doenças do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16., 1990, Espírito Santo do Pinhal. **Resumos...** Rio de Janeiro: LBC, 1990. p. 61-77.
- MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “conilon” (*Coffea canefora*, Pierre), no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1977. p. 172-173.
- MCDONALD, J. A preliminary account of disease green coffee berries in Kenya colony. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 2, n. 2, p. 145-154, Oct. 1926.
- MEIRELES, R. C. et al. Secafé: metodologia para acelerar a germinação das sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 90-96, 2007.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-296, 1996.
- MUNAUT, F. et al. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. **Plant Pathology**, Wageningen, v. 47, n. 5, p. 641-648, 1998.
- NASCIMENTO, J.; BARRIGOSSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 234-250, 2014.
- NECHET, K. L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp em cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

NOACK, F. **As manchas das folhas dos cafeeiros**. São Paulo: [s.n.], 1902. 32 p. (Boletim da Agricultura, 1).

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. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 1, p. 139-153.

OLIVEIRA, J. T. A. Mecanismos de defesa do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] contra patógenos. In: CONGRESSO NACIONAL DO FEIJÃO-CAUPI, 1., 2006, Teresina. **Anais...** Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2006. p. 1-4.

OROZCO-MIRANDA, E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

OROZCO-MIRANDA, E. et al. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002. p. 59.

PARADELA FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S.; SOUZA, I. P. Influence of the fungi population on the physicochemical composition of coffee (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 3, p. 681-687, 2011.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 4, p. 1129-1132, 2009.

PENG, M.; KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and in tobacco leaf disks. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 696-698, June 1992.

PIEROZZI, C. G. **Fungos sapróbios do semiárido nordestino: aspectos fisiológicos, ação no controle da ferrugem e indução do enraizamento em mudas de eucalipto**. 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

PINTO, F. A. M. F. **Controle da mancha manteigosa com fungos sapróbios em cafeeiro**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

POLESI, N. P. E. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, out./dez. 2011.

RODRIGUES, J. R.; VÁRZEA, V. M. P.; MEDEIROS, E. F. Strains of *Colletotrichum coffeanum* oak causing Coffee Berry Disease in Angola and Malawi with characteristics different to the Kenya strain. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 131, n. 3, p. 205-209, Mar. 1991.

SAITO, L. R. et al. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 3, p. 203-208, set./dez. 2009.

SCHARDL, C. L.; PHILLIPS, T. D. Protective grass endophytes: where are they from and where are they going? **Plant Disease**, Quebec, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, Dec. 1998.

SHTIENBERG, D. et al. Incorporation of cultivar resistance in a reduced sprays strategy to suppress early and late blights of potato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 1, p. 23-26, Jan. 1994.

SILVA, V. N. et al. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1609-1618, 2011.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 221-244.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

STRANGE, R. N. **Introduction to plant pathology**. New Jersey: J. Wiley, 2003. 480 p.

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, New York, v. 107, p. 85-93, Jan. 2001.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, Palo Alto, v. 18, p. 259-288, 1980.

VARGAS, G. E.; GONZALES, U. L. C. La mancha manteicosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San Jose, v. 22, n. 2, p. 119-129, abr./jun. 1972.

WALLER, J. M. et al. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. Nov. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 8, p. 989-994, Aug. 1993.

WAR, A. R. et al. Jasmonic acid mediated-induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 30, n. 4, p. 512-523, Dec. 2011.

WELLMAN, F. L. Blister spot of Arabica coffee from virus in Costa Rica. **Turrialba**, San Jose, v. 7, n. 1, p. 13-15, ene./mar. 1957.

**CAPÍTULO 2 Potencial de *Phialomyces macrosporus* em proteger o  
cafeeiro contra *Colletotrichum gloeosporioides* e estimular o  
crescimento da planta**

**RESUMO**

O desenvolvimento de métodos biológicos de controle de doenças vem ganhando importância na busca por formas mais sustentáveis de manejo da cultura do cafeeiro. No presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito bioprotetor do fungo antagonista *P. macrosporus*, quando em sementes, contra *C. gloeosporioides*, bem como a ação bioestimulante no crescimento de plântulas de cafeeiro. Foram comparados tratamentos com inoculação isolada ou combinada desses dois fungos, além de tratamentos controle e com utilização de fungicida. Avaliaram-se o desenvolvimento radicular inicial, a altura e a produção de biomassa na fase de plântulas. A inoculação de sementes com *P. macrosporus* proporciona bioproteção para o cafeeiro ao inibir a ação do patógeno *C. gloeosporioides*, além de exercer efeito bioestimulante, promovendo o crescimento de raízes e maior acúmulo de biomassa.

Palavras-chave: Biocontrole de doenças. Promotor de crescimento. Mancha manteigosa do cafeeiro. *Coffea arabica* L.

## ABSTRACT

The development of biological methods for diseases control is becoming an important strategy in the search for more sustainable ways of managing coffee crop. The present study aimed to evaluate the inoculation of coffee seeds with antagonist fungus *P. macrosporus* as a bio-protector agent against *C. gloeosporioides*, and as a bio-stimulant for seedling growth. The treatments consisted of isolated or combined inoculation of both these fungi, in addition to a control treatment and a fungicide treatment. Initial root development, plant height and biomass production were evaluated at seedling stage. The inoculation of seeds with *P. macrosporus* provides bio-protection for coffee by inhibiting the action of pathogen *C. gloeosporioides*. In addition, we evidenced a bio-stimulant effect of *P. macrosporus*, which promotes higher root growth and biomass accumulation.

**Keywords:** Disease biocontrol. Growth promoter. Coffee blister spot. *Coffea arabica* L.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é estratégica para o Brasil, por ser este o maior produtor e exportador de café do mundo. Apesar da representatividade da cafeicultura brasileira e do grande potencial produtivo, alguns obstáculos contribuem para perdas de produção. A ocorrência de doenças representa um dos principais fatores limitantes, podendo causar danos que chegam a inviabilizar a exploração da cultura em determinadas situações.

Dentre as doenças fúngicas do cafeeiro causadas por *Colletotrichum* spp. no Brasil, uma das mais grave está relacionada ao *Colletotrichum gloeosporioides*, espécie cuja presença é associada à incidência da mancha manteigosa. Cafeicultores têm demonstrado preocupação em relação a esta doença devido ao aumento de sua incidência e severidade no campo. Os sintomas correspondem à morte de hipocótilos, mumificação e abscisão de folhas e frutos, murcha e seca descendente de ramos plagiotrópicos. Como consequência, há prejuízo da produtividade e em algumas plantas a produção pode ser nula (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009).

A implantação de uma lavoura cafeeira inicia-se com a produção de mudas em viveiros, o que requer sementes sadias, com o intuito de se obter plantas de maior vigor, com desenvolvimento uniforme, produtivas, e de maior longevidade (MEIRELES et al., 2007; ROSA et al., 2003). A transmissão de *C. gloeosporioides* pode ser por via sementes (FERREIRA; ABREU; PEREIRA, 2005; FERREIRA et al., 2010; MAIA, 2012; MUNAUT et al., 1998), acentuando o risco de sua disseminação por meio das mudas. Além disso, a presença de patógenos em sementes relaciona-se diretamente a um menor índice de germinação e vigor (TEIXEIRA; MACHADO, 2003), o que afeta negativamente a qualidade das mudas produzidas.

O manejo para controle das doenças do patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro exige esforços na busca por métodos alternativos, pelo fato de não existir nenhum produto químico comercial para essa finalidade registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ademais, sendo o café um item de exportação, é preciso levar em conta que nos países europeus o uso de fungicidas está sendo cada vez mais restringido (ADASKAVEG; FÖRSTER, 2010), fator que poderá influenciar os limites de contaminantes e padrões de qualidade requeridos para comercialização do café brasileiro no exterior. Nesse cenário, ganha importância a possibilidade de se desenvolver estratégias mais sustentáveis que permitam favorecer o cafeeiro frente à incidência de *Colletotrichum* e outros patógenos.

A utilização de agentes microbianos antagonistas para o controle de fitopatógenos como método alternativo tem despertado interesse na comunidade científica. Uma das iniciativas refere-se à prospecção de fungos sapróbios do semiárido da região Nordeste quanto ao potencial de uso para o biocontrole de doenças de plantas. Dentre os microrganismos testados, o fungo *Phialomyces macrosporus* tem se mostrado promissor, combinando ação antagonista contra fitopatógenos e efeito promotor do crescimento vegetal (BOTREL, 2013; LABORDE, 2013; PIEROZZI, 2013; PINTO, 2013).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o fungo *P. macrosporus* inoculado a sementes quanto à capacidade de proporcionar bioproteção contra *C. gloeosporioides* e de estimular o crescimento de plântulas de cafeeiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foi realizado um experimento, no qual se avaliou o desenvolvimento inicial de plântulas de cafeeiro após as sementes terem sido submetidas a diferentes tratamentos combinando inoculações com *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo envolvido na ocorrência da mancha manteigosa do cafeeiro e o fungo antagonista *Phialomyces macrosporus*.

Este antagonista havia sido previamente selecionado no âmbito do “Projeto Sisbiota - Bioprospecção de fungos sapróbios no semiárido nordestino para o controle de doenças infecciosas em plantas: indução de resistência”. Por meio de ensaio de cultura pareada em placa de Petri, com metodologia adaptada de Dennis e Webster (1971), buscou-se obter isolados capazes de inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Os resultados evidenciam efetiva ação antagonista de *P. macrosporus* (PINTO, 2013). Este antagonista está depositado na CCMB (Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia), situada na Universidade Estadual de Feira de Santana-BA.

### 2.1 Obtenção e preparo dos inóculos

O inóculo de *C. gloeosporioides* utilizado foi obtido da Coleção Micológica de Lavras - CML situada na Universidade Federal de Lavras - UFLA. O isolado selecionado foi o I-24 por ser o mais patogênico, obtido de plantas de cafeeiro no campo, com sintomas de seca de ponteiro e mancha manteigosa nas folhas. Os esporos (conídios) foram cultivados em meio de cultura MEA 2% (extrato de malte e ágar) durante sete dias, em incubadora BOD a  $25 \pm 2$  °C, com 12 horas luz/escuro. A cultura de *P. macrosporus* foi preparada nessas mesmas condições, com uma diferença em relação ao meio de

cultura mais apropriado para esse fungo, que se desenvolve melhor no meio CMA (milho, cenoura e ágar).

## **2.2 Obtenção e preparo das sementes de cafeeiro**

As sementes de cafeeiro utilizadas neste estudo foram da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, adquiridas na Fazenda Bom Jardim, produtora de sementes certificadas, localizada em Bom Sucesso, MG, safra 2013/2014. A preparação das sementes para montagem do experimento seguiu protocolos normalmente utilizados em estudos dessa natureza (CARVALHO, 2005, 2012; MAIA, 2012; OGOSHI, 2011; SANTOS, 2012).

O perfil fisiológico dos lotes de sementes foi avaliado em testes de germinação descrito nas Regras para Análise de Sementes do Brasil (BRASIL, 2009). A sanidade foi aferida com teste de incubação em substrato de papel (Blotter Test).

O preparo das sementes para a montagem do experimento iniciou-se com a retirada do pergaminho e contato com água corrente por um período de 48 horas. Na sequência, foram desinfestadas com álcool 70% por dois minutos e em hipoclorito de sódio a 2% por mais dois minutos, seguidos de três banhos em água destilada e esterilizada. O excesso de água na superfície da semente foi eliminado deixando-as por 24 horas em câmara de fluxo laminar sobre papel de filtro esterilizado. Por fim, as sementes foram transferidas para placas de Petri (150 mm de diâmetro) contendo meio de cultura ágar-água e incubadas em BOD a  $25 \pm 2$  °C, por um período de sete dias, com o intuito de selecionar as sementes aparentemente isentas de microrganismos em sua superfície.

### 2.3 Aplicação dos tratamentos de inoculação das sementes

Todos os procedimentos envolvendo manipulação de sementes e inóculos dos fungos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Previamente à montagem dos tratamentos de inoculação com os fungos *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus*, as placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo os respectivos inóculos foram mantidas durante sete dias em estufa incubadora (BOD) a  $25 \pm 2$  °C para formação de colônias. Os tratamentos comparados no experimento estão descritos na Tabela 1.

Para o tratamento controle T1, as sementes foram acondicionadas em placas de Petri contendo apenas meio de cultura MEA, sem a presença de qualquer microrganismo, permanecendo por seis dias e transferidas para outra placa igual a anterior com o auxílio de uma pinça esterilizada, permanecendo por mais seis dias. Assim, obedeceu-se igualmente o tempo demandado para a aplicação dos demais tratamentos, mantendo as mesmas condições de luz e temperatura.

Nos tratamentos T2 e T3, as sementes foram mantidas por seis dias em placas de Petri contendo meio de cultura MEA posteriormente transferidas para as placas colonizadas com o fitopatógeno *C. gloeosporioides* e o antagonista *P. macrosporus* respectivamente. No tratamento T4, as sementes ficaram em contato por seis dias com a colônia de *C. gloeosporioides* e em seguida transferidas para a placa com colônia de *P. macrosporus*, aí permanecendo por mais seis dias. O tratamento T5 obedeceu a mesma sequência do T4, porém invertendo a ordem de inoculação dos dois fungos. Desse modo, as combinações T4 e T5 representaram aplicações do antagonista como estratégias de biocontrole curativo e preventivo, respectivamente.

Para efeito de simulação de um método de químico de controle preventivo, incluiu-se o tratamento T6, no qual se aplicou o fungicida Derosal

Plus<sup>®</sup> (0,3 L/100 kg de sementes), após o que as sementes foram mantidas por seis dias em placas com MEA, transferidas para placa colonizada por *C. gloeosporioides* e aí deixadas em contato por outros seis dias.

O tempo de contato de seis dias com o fitopatógeno e/ou o antagonista, considerado para efeito de inoculação das sementes, foi definido com base nos trabalhos de Maia (2012) e Vieira et al. (2011), que obtiveram maior infecção de células das sementes de cafeeiro por *C. gloeosporioides* após incubação por esse período.

Para cada tratamento, foram montadas oito placas de Petri contendo dez sementes distribuídas, com a parte plana e sulcada do grão voltada para baixo, totalizando 80 sementes. Durante o período de tempo necessário para que se concluísse o processo de inoculação, doze dias no total, as placas foram mantidas em BOD a  $25 \pm 2$  °C.

Tabela 1 Tratamentos em sementes avaliados no experimento

Tratamento	Descrição
T1 Controle	Tratamento controle – sementes sem inoculação, em contato apenas com o meio de cultura MEA em placa de Petri, por dois períodos de seis dias.
T2 Colletotrichum	Sementes mantidas durante seis dias em placa contendo apenas MEA, em seguida transferidas para placa colonizada pelo fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> e incubadas por seis dias.
T3 Phialomyces	Sementes mantidas durante seis dias em placa contendo apenas MEA, em seguida transferidas para placa colonizada pelo antagonista <i>P. macrosporus</i> e incubadas por seis dias.
T4 Collet. + Phial.	Sementes em contato direto com uma cultura de <i>C. gloeosporioides</i> por seis dias e transferidas para placa colonizada por <i>P. macrosporus</i> , aí permanecendo por mais seis dias.
T5 Phial. + Collet.	Sementes em contato direto com uma cultura de <i>P. macrosporus</i> por seis dias e transferidas para placa colonizada por <i>C. gloeosporioides</i> , aí permanecendo por mais seis dias.
T6 Derosal + Collet.	Tratamento de sementes com o fungicida Derosal Plus <sup>®</sup> , permanência em MEA por seis dias e transferência para placa colonizada por <i>C. gloeosporioides</i> para contato durante seis dias.

## 2.4 Condução do experimento e avaliações

Finalizado o processo de inoculação, as dez sementes contidas em cada placa de Petri foram postas para germinar em bandeja de isopor, sobre duas folhas de papel “germitest” umedecidas com água destilada e esterilizada, depositadas lado a lado a aproximadamente 15 mm de distância entre si. Para tanto, as bandejas haviam sido desinfestadas com solução de álcool etílico a 70% e em seguida com hipoclorito de sódio a 2%.

Cada bandeja contendo as sementes foi envolvida em papel alumínio e este recebeu perfurações de estilete em toda sua extensão, a cerca de 100 mm de distância. As bandejas foram então colocadas em saco de polietileno, formando uma câmara úmida com o intuito de manter um microclima favorável à

germinação e permitir trocas gasosas com o ambiente, sendo distribuídas sobre bancadas em câmara de crescimento vegetal com temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. As sementes foram aspergidas a cada dois dias com água destilada e esterilizada com auxílio de um borrifador manual, até o ponto em que o papel “germitest” se apresentasse úmido.

Decorridos cinco dias, ocorreu a protrusão radicular nas sementes. Quatro bandejas de cada tratamento foram mantidas nas mesmas condições, para avaliação do desenvolvimento do sistema radicular na fase de plântulas. Foram realizadas leituras do comprimento da raiz pivotante a cada quatro dias, até os 28 dias após a protrusão, ocasião em que se efetuou a contagem do número de raízes laterais emitidas. Como ocorreu morte de plântulas ao longo do tempo em alguns dos tratamentos de inoculação com *C. gloeosporioides* (T2 e T4), essas medições foram realizadas somente nas plântulas sobreviventes.

As sementes correspondentes às outras quatro bandejas de cada tratamento foram transferidas para copos plásticos de 300 mL contendo substrato comercial Bioplant<sup>®</sup> previamente esterilizado em autoclave a 120°C, por dois tempos de 60 min, com intervalo de 24 horas. Em cada copo foram acomodadas cinco sementes cobertas por 10 mm de substrato. Os copos foram mantidos na câmara de crescimento, provendo-se irrigação das plântulas a cada dois dias com água destilada e esterilizada. Aos 56 dias após a protrusão radicular, com as plântulas no estágio de “orelhas de onça”, procedeu-se à avaliação da altura a partir da superfície do substrato. Em seguida, as plântulas foram seccionadas, separando-se parte aérea e raízes lavadas, para determinação da produção de matéria seca desses compartimentos após secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por 72 horas para obtenção de peso constante. Em virtude da morte de plântulas ocorridas ao longo do tempo em alguns dos tratamentos de inoculação com *C. gloeosporioides* (T2 e T4), todas essas medições foram realizadas somente nas plântulas que permaneceram vivas até os

56 dias. Os dados de produção de matéria seca medidos foram ponderados pelo número de plântulas avaliadas em cada tratamento/repetição e expressos em valores correspondentes a dez plântulas.

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, em que cada unidade experimental foi constituída a partir de dez sementes/plântulas de cafeeiro. Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Para as variáveis com efeito de tratamentos significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, procedeu-se o agrupamentos de médias pelo teste de Scott-Knott a 5%. No caso da medida do desenvolvimento da raiz pivotante, também foram ajustados modelos de regressão para o comprimento radicular em cada tratamento em função do tempo após o início da germinação das sementes.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes combinações de inoculação de sementes com o fitopatógeno *C. gloeosporioides* e o antagonista *P. macrosporus* interferiram no desenvolvimento inicial do cafeeiro, conforme evidenciado pelo efeito significativo dos tratamentos sobre as variáveis de crescimento radicular, altura e peso seco de plântulas. Apenas o peso seco de raízes não diferiu estatisticamente em função dos tratamentos (Tabela 2).

#### 3.1 Efeito bioprotetor do fungo *P. macrosporus* sobre o desenvolvimento radicular inicial

Quando comparadas as médias do comprimento da raiz pivotante aos 28 dias após o início da germinação (Figura 1), verifica-se que os tratamentos que envolveram inoculação das sementes com o fitopatógeno *C. gloeosporioides* isoladamente, antes da inoculação com *P. macrosporus* ou depois da aplicação de fungicida (tratamentos T2, T4 e T6) prejudicaram significativamente o crescimento radicular em relação ao observado no tratamento controle. Isso evidencia que *C. gloeosporioides* pode infectar sementes e provocar danos importantes já na fase mais inicial da formação das mudas de cafeeiro.

Ao longo do período de monitoramento, constatou-se morte de plântulas nos tratamentos T2 e T4, o que aos 28 dias representou 40,0 e 27,5% de mortalidade respectivamente. Portanto, o tratamento de inoculação das sementes apenas com *C. gloeosporioides* foi o mais agressivo e comprometeu o processo de germinação das sementes. Nesse caso, após a protrusão radicular, o crescimento da raiz pivotante foi reiteradamente mais lento ao longo do tempo, até o ponto em que foi paralisado em algumas das plântulas, originando necrose na região meristemática que culminou na morte da raiz. Ainda não havia sido

relatada a morte precoce de raízes a partir da inoculação do patógeno em sementes aparentemente saudáveis, como verificado no presente estudo. Os trabalhos realizados até então foram focados em avaliações de índices de germinação, calculados por contagem de plântulas emergidas da superfície do substrato.

Tabela 2 Resumo da análise de variância para as variáveis estudadas quanto aos diferentes tratamentos de sementes

Fontes de variação	G. L.	QM					
		Comprimento da raiz principal	Número de raízes laterais	Altura	Peso seco de raiz	Peso seco da parte aérea	Peso seco total
Tratamentos de inoculação	5	7,5643 **	5.9081 **	3,5744 **	0,0079 <sup>ns</sup>	0,1804 **	0,2587 **
Resíduo	18	0,1567	0.1532	0,0851	0,0042	0,0154	0,0247
Total	23						
Coeficiente de variação (%)		8,7	12,9	6,3	39,3	19,9	20,0

\*\* = significativo a 1% pelo teste F; ns = não significativo.

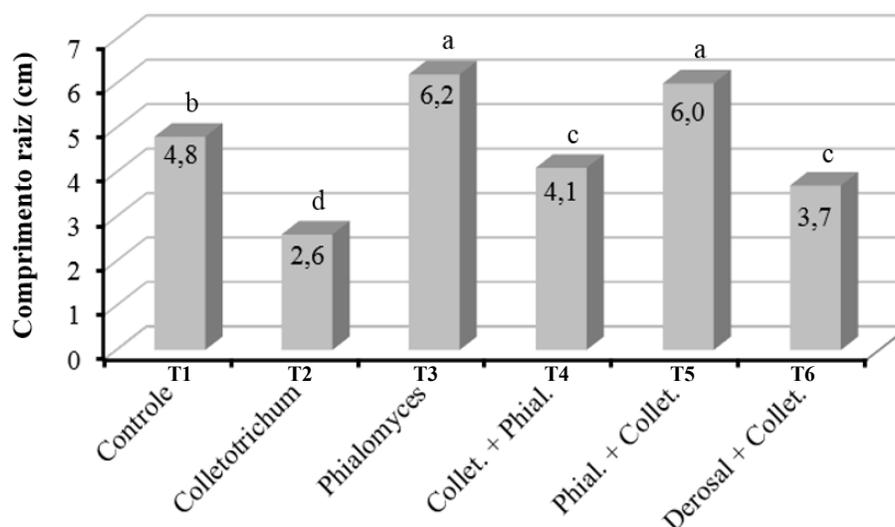


Figura 1 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o comprimento da raiz pivotante de plântulas de cafeeiro, aos 28 dias após o início da germinação

Legenda: Médias com mesmas letras pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

A severidade de *C. gloeosporioides* sobre os índices de germinação de sementes de cafeeiro vem sendo documentada na literatura. Carvalho et al. (2012) observam falhas de germinação da ordem de 34,0% a partir de sementes coletadas a campo, oriundas de plantas com sintomas da mancha manteigosa. Ferreira et al. (2010), ao utilizar sementes colhidas de plantas com sintomas, relata que apenas 5,2% das plântulas sobreviveram. Maia (2012), ao comparar os efeitos da inoculação com o patógeno em sementes colhidas de plantas com ou sem sintomas, contabilizou índices de germinação de 16,4 e 30,4% respectivamente. Todos esses resultados reforçam a validade da hipótese de Vargas e Gonzáles (1972), segundo a qual é provável que exista um caráter genético que predispõe plântulas de sementes originadas de cafeeiros com mancha manteigosa a uma maior suscetibilidade em expressar a doença. De

acordo com Teixeira e Machado (2003), em geral, a presença de patógenos em sementes está associada a prejuízos como baixa germinação, perda de vigor e deterioração, sendo que a maioria dos patógenos normalmente pode ser transmitida à progênie.

Observa-se, no entanto, que o uso preventivo de fungicida, assim como a inoculação com o fungo antagonista *P. macrosporus* posteriormente ao contato das sementes com o fitopatógeno atenuaram significativamente os seus efeitos prejudiciais (Figura 1). Sugere-se, desse modo, uma possível ação curativa desencadeada pelo microrganismo antagonista.

Por sua vez, os tratamentos em que se fez inoculação das sementes com *P. macrosporus* de forma isolada, ou antes da inoculação com *C. gloeosporioides* (tratamentos 3 e 5 - Tabela 1), apresentaram os maiores valores de crescimento radicular, sendo estatisticamente iguais entre si e promovendo incremento significativo do comprimento da raiz pivotante em relação ao tratamento controle (Figura 1). Esses resultados suportam a hipótese de que *P. macrosporus* pode exercer, concomitantemente, efeitos bioprotetor e bioestimulante às plântulas de cafeeiro, uma vez que a inoculação de sementes com esse fungo propiciou não só uma ação preventiva com inibição do fitopatógeno, mas também impulsionou o crescimento radicular.

Na realidade, as diferenças entre tratamentos constatadas aos 28 dias (Figura 1) tiveram início logo após a protrusão radicular e ampliaram-se com o passar do tempo ao longo do período de avaliação, conforme mostrado na Figura 2. Pelos modelos ajustados para a elongação da raiz pivotante em função do tempo decorrido após o início da germinação, nota-se que os tratamentos com *P. macrosporus* adicionado às sementes, isoladamente ou antecedendo à inoculação com *C. gloeosporioides*, promoveram incrementos lineares no comprimento da raiz. O tratamento controle apresentou padrão de resposta quadrática, com inflexão indicando a estabilização do crescimento nas últimas épocas de

avaliação. As inoculações isoladas de *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* (tratamentos T2 e T3) resultaram, respectivamente, no menor e no maior desenvolvimento radicular observados, sendo a diferença entre esses tratamentos equivalente a 129% na taxa diária de crescimento da raiz, conforme indicado pelo coeficiente angular dos modelos. O tratamento T5, com inoculação de *P. macrosporus* precedendo o contato das sementes com o patógeno, proporcionou o segundo melhor resultado, em que o incremento diário de crescimento da raiz foi 118% maior que o verificado no tratamento T2.

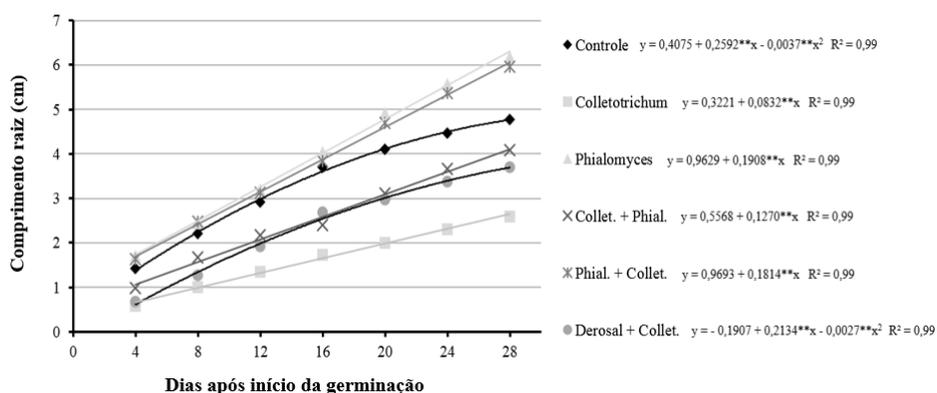


Figura 2 Curvas de crescimento da raiz principal de plântulas de café sob efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus*, ao longo de 28 dias após o início da germinação

Os modelos de resposta ajustados permitem distinguir com clareza o efeito promotor de crescimento obtido a partir da inoculação de sementes saudáveis com *P. macrosporus* (tratamento T3), combinado ao efeito protetor contra *C. gloeosporioides* (tratamento T5). No tocante à ação antagonista, observa-se que, quando *P. macrosporus* foi inoculado preventivamente em sementes saudáveis (tratamento T5), houve completa inibição da infecção pelo *C. gloeosporioides* inoculado posteriormente. Já quando a ordem de contato das sementes com os

dois fungos foi inversa (tratamento T4), a inibição do fitopatógeno pelo antagonista foi parcial e não possibilitou o crescimento normal da raiz, que foi significativamente menor que no controle e similar ao tratamento com fungicida (Figuras 1 e 2).

Vale destacar também que os resultados obtidos evidenciam que o tempo de contato de seis dias foi suficiente para que a inoculação fosse bem sucedida, tanto no caso do fitopatógeno quanto do antagonista, de modo que ambos colonizaram as sementes (Figura 3) e expressaram capacidade de influenciar precocemente o desenvolvimento do cafeeiro. Esse período de contato já havia se mostrado efetivo para a inoculação de *C. gloeosporioides* (MAIA, 2012; VIEIRA et al., 2011), mas ainda não se conhecia demanda de tempo para o procedimento com *P. macrosporus*.

O modo como os tratamentos influenciaram o desenvolvimento da raiz principal tendeu a se repetir na avaliação da intensidade de ramificação do sistema radicular. Pela contagem do número de raízes laterais aos 28 dias após o início da germinação (Figura 4), confirmam-se os efeitos negativos da inoculação com *C. gloeosporioides* e os benefícios da inoculação com *P. macrosporus*. O contato das sementes com um ou outro desses fungos (tratamentos T2 e T3) resultou, respectivamente, na menor e maior formação de raízes secundárias entre os tratamentos. O uso do fungicida (tratamento T6) e a inoculação de *P. macrosporus* posterior à colonização das sementes por *C. gloeosporioides* (tratamento T4) proporcionaram ramificação radicular estatisticamente igual ao do controle.



Figura 3 Aspecto visual da colonização de sementes de cafeeiro por *C. gloeosporioides* (esquerda) e por *P. macrosporus* (direita), após tempo de contato por seis dias em meio de cultura objetivando inoculação

A inoculação de sementes sadias com *P. macrosporus* mostrou ser uma estratégia preventiva eficaz, impedindo que a inoculação feita em seguida com *C. gloeosporioides* (tratamento T5) produzisse efeito nocivo ao desenvolvimento radicular das plântulas. Concomitantemente, esse tratamento expressou estímulo ao desenvolvimento de raízes laterais (Figura 4).

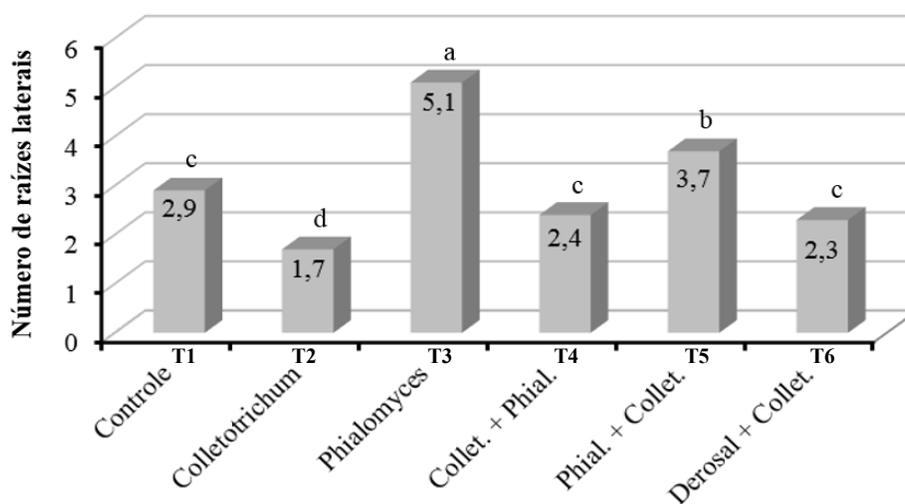


Figura 4 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o número de raízes laterais por plântula de cafeeiro, aos 28 dias após o início germinação

Legenda: Tratamentos com mesmas letras pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

O potencial supressor de *P. macrosporus* sobre fungos fitopatogênicos foi detectado em outros estudos. Sua ação antagônica ao desenvolvimento de *C. gloeosporioides* foi documentada por Pinto (2013), que visualizou a formação de halo de inibição do crescimento de colônias do patógeno em teste de cultura pareada em placa de Petri e detectou efeito bioprotetor em mudas de cafeeiro com oito meses de idade, a partir da inoculação preventiva do fungo antagonista sete dias antes da inoculação do patógeno. Laborde (2014) testou a aplicação de *P. macrosporus* diretamente em folhas de mudas de cafeeiro com sintomas característicos da incidência de *Cercospora coffeicola*, observando redução da esporulação deste fungo em folhas senescentes e da taxa de germinação de seus conídios. Os efeitos bioprotetor e bioestimulante do cafeeiro foram constatados por Botrel (2013) ao testar *P. macrosporus* no controle da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) em mudas.

### **3.2 Efeito de promoção de crescimento em plântulas estimulada por *P. macrosporus* no cultivo de substrato**

Os principais contrastes observados quanto à influência dos tratamentos no crescimento inicial das plântulas em substrato, avaliado em termos de altura e produção de biomassa aos 56 dias após a protrusão radicular, seguiram os mesmos padrões detectados nas avaliações de raiz realizadas em papel “germitest”, durante a fase inicial da formação do sistema radicular até os 28 dias.

A menor altura de plântula foi condicionada pelo tratamento, com inoculação das sementes apenas com *C. gloeosporioides*, enquanto os tratamentos de inoculação unicamente com *P. macrosporus*, ou deste antecedendo o contato das sementes com patógeno, resultaram em maior crescimento (Figura 5). Quando o fungo antagonista foi inoculado após o contato das sementes com o patógeno houve amenização dos efeitos prejudiciais e o crescimento em altura igualou-se ao do tratamento controle. Por fim, no tratamento com aplicação preventiva de fungicida às sementes, obteve-se altura estatisticamente superior a do controle, porém inferior à alcançada com a inoculação preventiva de *P. macrosporus*.

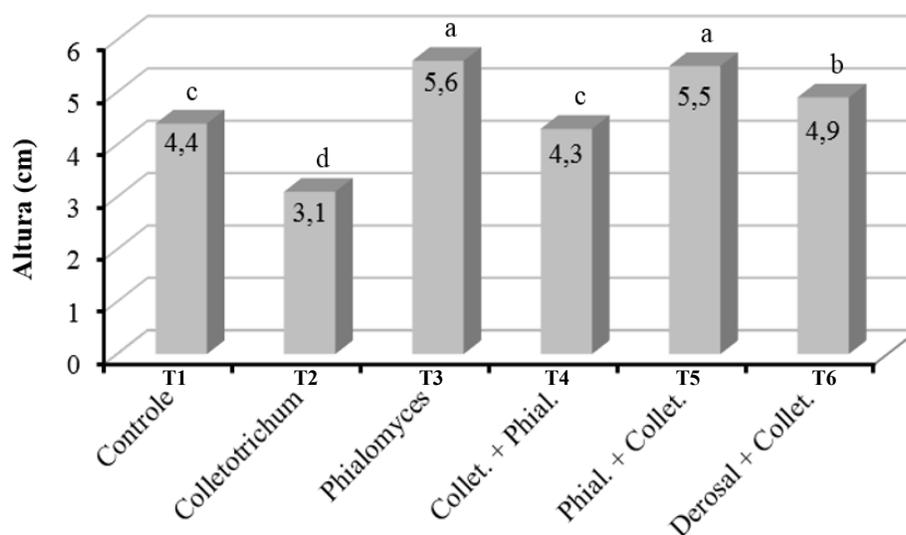


Figura 5 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre a altura de plântulas de cafeeiro, aos 56 dias após o início da germinação

Legenda: Tratamentos com mesmas letras pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

As diferenças entre os tratamentos quanto ao desenvolvimento radicular avaliado em papel “germitest” (Figuras 1, 2 e 4) não se refletiram no peso seco das raízes recuperadas das plântulas cultivadas em substrato até os 56 dias após a protrusão radicular. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para essa variável (Tabela 2, Figura 6). No entanto, há que se considerar dois aspectos que ajudam a explicar esse nivelamento dos resultados de peso seco de raiz. O primeiro está associado ao elevado coeficiente de variação dos dados ( $CV = 39,3\%$ ), que, apesar de ser comum em avaliações do sistema radicular, pode dificultar a discriminação estatística das médias. O segundo aspecto refere-se ao fato de que os valores desta variável foram expressos a partir do peso cumulativo das raízes de dez plantas que compunham cada unidade experimental, sendo obtidos por estimativa no caso dos

tratamentos T2, T4 e T6, que apresentaram morte de plântulas devido à infecção por *C. gloeosporioides*. Esses tratamentos tiveram 40%, 30% e 5% de mortalidade de plântulas, respectivamente, afetando a representatividade dos valores de peso seco extrapolados a partir das plantas sobreviventes, o que pode ter contribuído para diminuir as diferenças em relação aos demais tratamentos. Ainda assim, nota-se alguma tendência de resposta diferencial ao se considerar os valores absolutos do peso seco de raiz (Figura 6), o que foi perceptível também pela análise visual de plântulas representativas de cada tratamento (Figura 7).

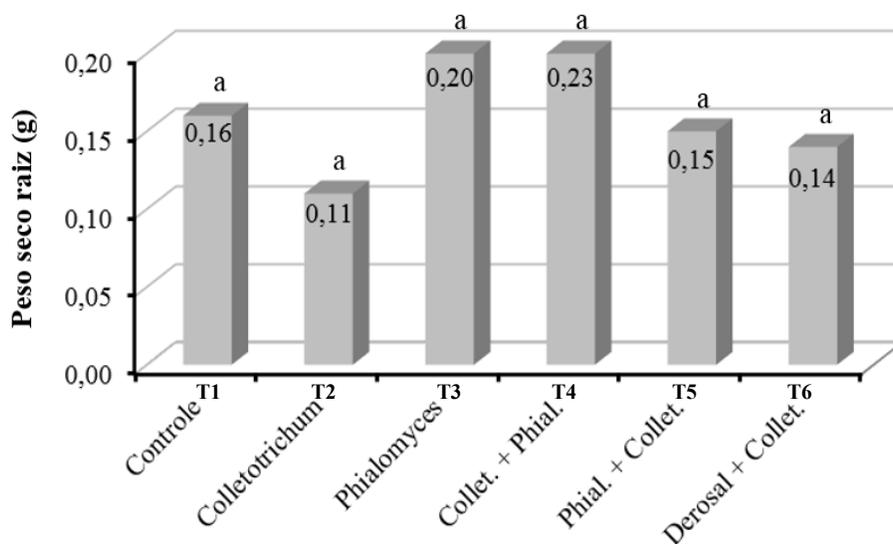


Figura 6 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o peso seco de raiz de dez plântulas de cafeeiro, aos 56 dias após o início da germinação

Legenda: Tratamentos com mesmas letras pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.



Figura 7 Aspecto visual de plântulas representativas dos tratamentos aos 56 dias após o início da germinação, com destaque para a inibição do crescimento radicular provocada pela inoculação com *C. gloeosporioides* (tratamento 2) e o estímulo decorrente da inoculação com *P. macrosporus* (tratamentos 3, 4 e 5)

Os dados de peso seco da parte aérea (Figura 8) evidenciam o efeito depressivo da inoculação das sementes com *C. gloeosporioides* sobre o desenvolvimento das plântulas. Em contraposição, destacam-se os efeitos preventivo e curativo de *P. Macrosporus* sobre o patógeno, combinado a uma ação bioestimulante promotora do crescimento do cafeeiro, o que possibilitou que todos os tratamentos envolvendo o fungo antagonista superassem o controle na produção de biomassa.

As diferenças nas médias de peso seco total das plântulas (Figura 9) reforçam os principais resultados já relatados para as demais variáveis. Conforme também verificado para o peso seco da parte aérea (Figura 8), chama a atenção o melhor desempenho do tratamento T4, no qual *P. macrosporus* foi inoculado depois de *C. gloeosporioides*. No entanto, nesse caso, novamente é necessário ponderar que os dados foram extrapolados de mensurações realizadas nas plantas vivas remanescentes à época da avaliação, visto que este tratamento (assim como o T2 e o T6) perdeu plantas devido à patogenicidade de *C. gloeosporioides*. Desse modo, a menor densidade de plantas sobreviventes nos

copos de substrato pode ter favorecido seu desenvolvimento mais vigoroso, contribuindo para o desempenho aparentemente melhor desse tratamento.

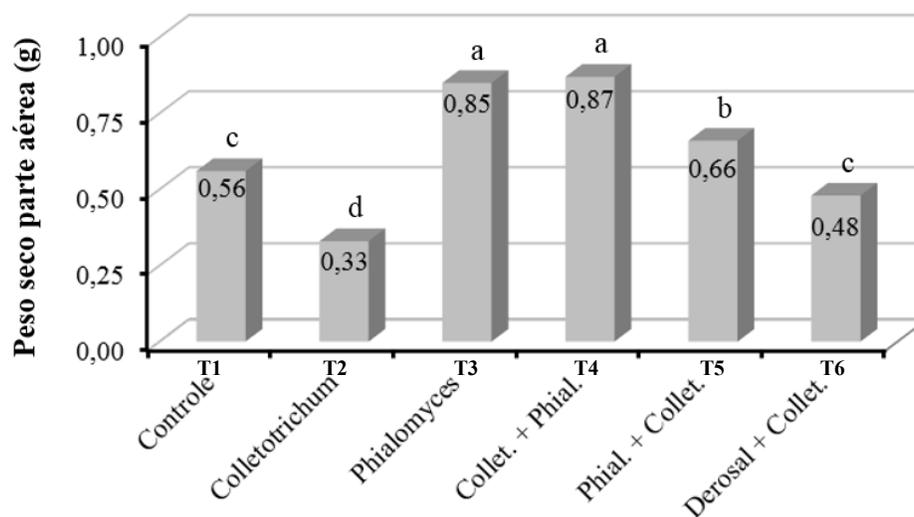


Figura 8 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o peso seco da parte aérea de dez plântulas de café, aos 56 dias após o início da germinação

Legenda: Tratamentos com mesmas letras pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

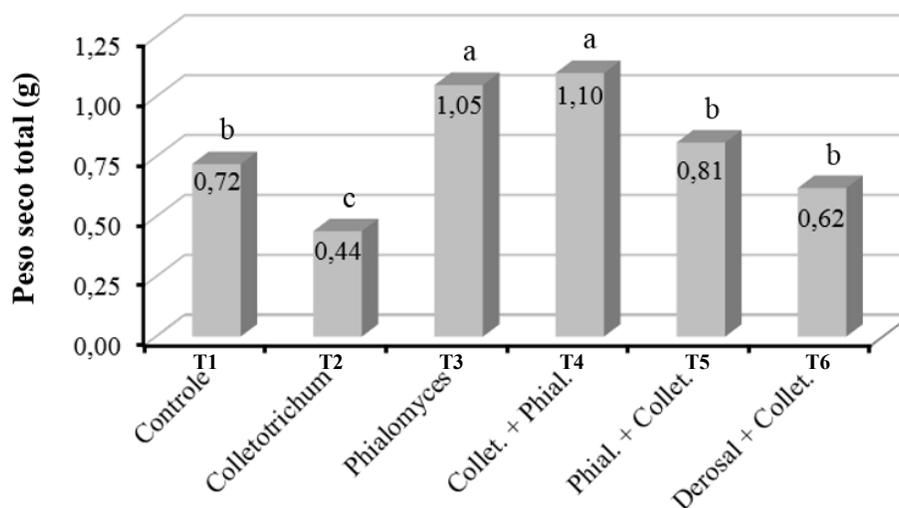


Figura 9 Efeito da inoculação de sementes com *C. gloeosporioides* e *P. macrosporus* sobre o peso seco total de dez plântulas de café, aos 56 dias após o início da germinação

Legenda: Tratamentos com mesmas letras pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Numa análise global, depreende-se que as influências negativas ou positivas exercidas precocemente sobre o desenvolvimento radicular anterior à fase de folhas cotiledonares expandidas – “orelhas de onça” – (Figuras 1, 2 e 4) persistiram ou repercutiram na formação da parte aérea (Figura 8). Ambos os fungos colocados em contato com as sementes mostraram capacidade de atuar rapidamente interferindo no metabolismo e vigor das plântulas de modo que a biomassa acumulada na parte aérea, durante o período de 56 dias de cultivo em substrato, evidencia tanto o efeito deletério da infecção por *C. gloeosporioides* quanto a proteção e a promoção do crescimento conferidas por *P. macrosporus*.

A virulência de *Colletotrichum* spp. em mudas de café já havia sido comprovada em estudos anteriores. Trabalhos desenvolvidos por Lins et al. (2007) e Pereira et al. (2009) sobre esse patossistema, utilizando microscopia eletrônica de varredura, mostram a colonização por hifas do patógeno em células

do hospedeiro após a inoculação do hipocótilo de plântulas na fase de “palito de fósforo”. Após empregar técnica de transformação genética com a proteína verde fluorescente (GFP) em *C. gloeosporioides*, Maia (2012) comprovou a transmissibilidade do patógeno inoculado em sementes para a parte aérea utilizando microscopia de epifluorescência na análise de fragmentos retirados da inserção do cotilédono no caule.

Os mecanismos envolvidos na ação antagônica de *P. macrosporus* sobre *C. gloeosporioides* ainda não são plenamente conhecidos, mas podem estar relacionados à antibiose com produção de compostos voláteis ou indução de resistência (BOTREL, 2013; PIEROZZI, 2013). No tocante aos efeitos bioestimulantes de *P. macrosporus*, são ainda escassos os estudos que permitem vislumbrar sua aptidão como agente promotor do crescimento de plantas. Proposições nesse sentido foram apresentadas por aqueles autores ao estudarem a inoculação em mudas de cafeeiro e de eucalipto, respectivamente. Em ambos os casos, foram constatados ganhos significativos de crescimento das plantas tratadas com *P. macrosporus*.

A capacidade de microrganismos antagonistas também atuarem estimulando o desenvolvimento de plantas é bem conhecida e os avanços na sua aplicação como tecnologia agrícola vem sendo revelados para outras espécies fúngicas benéficas, a exemplo de *Trichoderma* spp. em associação com culturas diversas (CHAGAS JUNIOR et al., 2014; DINIZ et al., 2006; SAITO et al., 2009). O tratamento de sementes com esses microrganismos, além da proteção contra fitopatógenos, favorece a germinação de sementes, emergência e desenvolvimento das plântulas. Seu efeito bioestimulante se dá pela liberação de hormônios vegetais que promovem maior expansão do sistema radicular e melhoram a assimilação de nutrientes, aumentando a resistência a estresses bióticos, além de facilitar a degradação de fontes de nutrientes importantes para o desenvolvimento vegetal (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004).

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A interpretação conjunta dos resultados do presente estudo evidenciou o potencial de *P. macrosporus* para utilização como agente de biocontrole preventivo e curativo do fitopatógeno *C. gloeosporioides*, e também como promotor do crescimento vegetal em cafeeiro. Essas informações abrem perspectivas para o desenvolvimento futuro de tecnologias agrícolas à base de insumos biológicos, os quais poderão conciliar eficiência agronômica, segurança e qualidade ambiental no manejo das culturas.

## 5 CONCLUSÕES

O fungo *P. macrosporus* é antagonista ao *C. gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa em cafeeiro, e sua inoculação em sementes proporciona bioproteção para o cafeeiro ao inibir a ação do fungo fitopatogênico.

A inoculação das sementes com *P. macrosporus* exerce efeito bioestimulante, promovendo o crescimento de raízes e maior acúmulo de biomassa na fase inicial de formação de mudas.

## REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTER, H. New developments in postharvest fungicide registrations for edible horticultural crops and use strategies in the United States. In: PRUSKY, D.; GULLINO, M. L. (Ed.). **Post-harvest pathology series: plant pathology in the 21st century**. New York: Springer, 2010. v. 2, p. 107-111.
- BOTREL, D. A. **Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*) no cafeeiro**. 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.
- CARVALHO, G. A. de et al. Efeito *in vitro* e *in vivo* de filtrados de rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 553-561, maio/jun. 2005.
- CARVALHO, H. P. de et al. Efeito de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, agente etiológico da mancha manteigosa, na germinação e viabilidade de sementes de cafeeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 264-271, 2012.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Eficiência da inoculação combinada de rizóbio e *Trichoderma* spp. em diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no cerrado (Savana Brasileira). **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 37, n. 1, p. 20-28, 2014.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, I Production of non-volatile antibiotics. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, p. 25-39, 1971.
- DINIZ, K. A. et al. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 37-43, 2006.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, J. B.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios fisiológicos e tecidos do fruto maduro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 880-885, jul./ago. 2005.

FERREIRA, J. B. et al. Transmissibilidade e efeito do tratamento de sementes de cafeeiros com mancha manteigosa (*C. gloeosporioides*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 101-108, jan./fev. 2010.

HARMAN, G. E. 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, Apr. 2000.

HARMAN, G. E. et al. Trichoderma species- opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews/Microbiology**, London, v. 2, n. 1, p. 43-56, Jan. 2004.

LABORDE, M. C. F. **Avaliação de fungos sapróbios na sobrevivência de *Cercospora coffeicola***. 2014. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LINS, S. R. O. et al. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 488-495, nov./dez. 2007.

MAIA, F. G. M. ***Colletotrichum gloeosporioides*: transmissibilidade em sementes e mecanismos de defesa em mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MEIRELES, R. C. et al. Secafé: metodologia para acelerar a germinação das sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 90-96, 2007.

MUNAUT, F. et al. Genetic relationships among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. in Africa and Australia using RAPD and ribosomal DNA markers. **Plant Pathology**, Wageningen, v. 47, n. 5, p. 641-648, 1998.

OGOSHI, G. **Fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de plantas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa**. 2011. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). *Acta Botanica Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de café 271. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 264-271, 2009.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* - cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, 2009.

PIEROZZI, C. G. **Fungos sapróbios do semiárido nordestino: aspectos fisiológicos, ação no controle da ferrugem e indução do enraizamento em mudas de eucalipto**. 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

PINTO, F. A. M. F. **Controle da mancha manteigosa com fungos sapróbios em cafeeiro**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROSA, S. D. V. F. da et al. Formação de mudas de *Coffea arabica* L. cv Rubi utilizando sementes e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3.; WORKSHOP INTERNACIONAL DE CAFÉ & SAÚDE, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2003. p. 298.

SAITO, L. R. et al. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 3, p. 203-208, set./dez. 2009.

SANTOS, H. N. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mancha manteigosa**. 2012. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. da C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1045-1052, set./out. 2003.

VARGAS, G. E.; GONZALES, U. L. C. La mancha manteicosa del café causada por *Colletotrichum* spp. **Turrialba**, San Jose, v. 22, n. 2, p. 119-129, 1972.

VIEIRA, J. F. et al. Quimioterapia em sementes e implicações na redução da mancha manteigosa em cafeeiro. **Revista FZVA**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2011.

**CAPÍTULO 3 Potencial de *Phialomyces macrosporus* em induzir resistência contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em plântulas de cafeeiro**

**RESUMO**

A indução de resistência na planta é um dos modos de ação de organismos antagonistas no controle biológico de fitopatógenos. No presente trabalho, objetivou-se identificar processos enzimáticos influenciados pela inoculação do cafeeiro com o fungo *P. macrosporus* e confirmar sua capacidade de indução de resistência contra *C. gloeosporioides*. Foram utilizados tratamentos com inoculação isolada ou combinada desses dois fungos em raízes de plântulas de cafeeiro, com ou sem realização de fermentos. Em períodos de 6, 12, 24 e 48 horas após a finalização dos procedimentos de inoculação, as raízes foram coletadas para determinação da atividade das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e quitinase. O antagonismo de *P. macrosporus* contra *C. gloeosporioides* se dá via indução de resistência no cafeeiro, por meio do estímulo à atividade das três enzimas estudadas, sendo o principal mecanismo relacionado à ativação da peroxidase.

Palavras-chave: Biocontrole de doenças. Atividade enzimática. Peroxidase. Mancha manteigosa do cafeeiro. *Coffea arabica* L.

## ABSTRACT

Resistance induction in plants is one mean for the biological control of pathogens by antagonistic organisms. The present study aimed to identify enzymatic processes influenced by the inoculation of coffee plants with fungus *P. macrosporus*, and confirm its ability to induce resistance against *C. gloeosporioides*. Treatments consisted of isolated or combined inoculation of both these fungi on roots of coffee seedlings, with or without intentional injury. In periods of 6, 12, 24 and 48 hours after completing the inoculation procedures, the roots were collected to determine the activity of peroxidase, superoxide dismutase and chitinase. The antagonism of *P. macrosporus* against *C. gloeosporioides* occurs via resistance induction in coffee plants, by stimulating the activity of the three studied enzymes. The activation of peroxidase is the main mechanism involved in the resistance induced by *P. macrosporus*.

Keywords: Disease biocontrol. Enzymatic activity. Peroxidase. Coffee blister spot. *Coffea arabica* L.

## 1 INTRODUÇÃO

O patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro está ligado à ocorrência da mancha manteigosa, doença cujo manejo para o controle ainda não é claramente definido. A utilização de agentes microbianos antagônicos para o controle do *Colletotrichum* é uma das alternativas de controle estudadas. Nesse sentido, o fungo *Phialomyces macrosporus* tem se destacado como inibidor da colonização de plantas de cafeeiro por diferentes fitopatógenos, inclusive *C. gloeosporioides*, associando ainda efeito promotor do crescimento vegetal, conforme constatado em trabalhos utilizando diferentes procedimentos de inoculação (BOTREL, 2013; LABORDE, 2014; PINTO, 2013).

Dentre os modos de ação de microrganismos usados no controle biológico de doenças, tem-se a competição, o parasitismo, a antibiose e a indução de resistência (CHET, 1992; HARAN; SCHICKLER; CHET, 1996; STRANGE, 2003). Os mecanismos envolvidos na ação antagônica de *P. macrosporus* sobre *C. gloeosporioides* ainda não são plenamente conhecidos, mas podem estar relacionados à antibiose com produção de compostos voláteis ou à indução de resistência (BOTREL, 2013; PIEROZZI, 2013).

A resistência induzida, como medida de controle de doenças de plantas, tem por objetivo evitar ou atrasar a entrada e posterior atuação do patógeno nos tecidos vegetais por meio de mecanismos de defesa inerentes à própria planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A utilização de microrganismos não patogênicos como indutores de resistência vem ganhando importância (PASCHOLATI, 1998) e atualmente existem registros na literatura de diversas substâncias de origem biológica que agem como indutores de resistência (KUC, 2001). Cavalcanti, Brunelli e Stangarlin (2005) e Resende et al. (2004) relatam que a resistência induzida em plantas pode ocorrer a partir do tratamento com

agentes bióticos (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abióticos (substâncias químicas).

Em alguns patossistemas, tratamentos com determinados indutores de resistência levam à ativação direta de mecanismos de respostas de defesa da planta. Contudo, alguns mecanismos são ativados apenas após a inoculação do hospedeiro com o fitopatógeno. O tratamento prévio com indutores de resistência pode predispor plantas suscetíveis a ativarem respostas de defesa mais rápida e intensamente do que as plantas não induzidas, quando ambas são expostas ao fitopatógeno. Dessa maneira, indutores de resistência fazem expressar um mecanismo de defesa denominado preparo ou sensibilidade (efeito “*priming*”), o qual foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* (CONRATH et al., 2006; KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002).

As enzimas peroxidase, superóxido dismutase e quitinase são frequentemente associadas a mecanismos de defesa dos vegetais em situações de estresses abióticos e bióticos (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL; TUTEJA, 2010; GULSEN et al., 2010; MEDEIROS et al., 2010; OLIVEIRA, 2006; WAR et al., 2012) e a elevação nos níveis de atividade enzimática na planta pode ser indicador da resistência contra fitopatógenos (LOON; REP; PIETERSE, 2006; MACAGNAN et al., 2008; OLIVEIRA, 2006). Portanto, estudos da resposta bioquímica de defesa, como a detecção de aumento na atividade de determinadas enzimas em órgãos da planta, associado à atuação de agentes de controle biológico, permitem avançar na compreensão de mecanismos capazes de atenuar os danos decorrentes da incidência de doenças.

O objetivo do presente trabalho foi relacionar alterações na atividade das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e quitinase à atuação do fungo antagonista *P. macrosporus* em raízes de plântulas de cafeeiro, de modo a comprovar a indução de resistência contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foi realizado um experimento de inoculação do cafeeiro com o fungo *P. macrosporus*, antagonista ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*, para avaliação de alterações na atividade de determinadas enzimas que servem como marcadores de indução de resistência.

O fungo *P. macrosporus* foi previamente selecionado no âmbito do “Projeto Sisbiota - Bioprospecção de fungos sapróbios no semiárido nordestino para o controle de doenças infecciosas em plantas: indução de resistência”. Pinto (2013) conduziu um ensaio de cultura pareada em placa de Petri, com metodologia adaptada de Dennis e Webster (1971), comprovando efetiva ação antagônica de *P. macrosporus*, que foi capaz de inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*.

### 2.1 Obtenção e preparo dos inóculos

O inóculo de *C. gloeosporioides* utilizado foi obtido da Coleção Micológica de Lavras - CML situada na Universidade Federal de Lavras - UFLA. O isolado selecionado foi o I-24 por ser o mais patogênico, obtido de plantas de cafeeiro no campo, com sintomas de seca de ponteiro e mancha manteigosa nas folhas. Os esporos (conídios) foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura MEA 2% (extrato de malte e ágar) durante sete dias, em incubadora BOD a  $25 \pm 2$  °C, com 12 horas luz/escuro.

A suspensão inoculante de *C. gloeosporioides* usada no experimento foi obtida após a esporulação, realizando-se lavagem superficial das colônias com 5 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri e promovendo a retirada dos conídios com auxílio de um pincel de cerdas macias, sendo a

suspensão resultante filtrada em gaze esterilizada. Ajustou-se a concentração da suspensão em  $4 \times 10^6$  conídios/mL, a partir de estimativa feita em lâmina de contagem (câmara de Newbauer).

A cultura de *P. macrosporus* também foi preparada em incubadora BOD a  $25 \pm 2$  °C, com 12 horas luz/escuro, utilizando-se meio de cultura CMA (milho, cenoura e ágar), mais apropriado para esse fungo. Após sete dias, adotou-se os procedimentos descritos por Botrel (2013), em que um disco da colônia foi transferido para erlenmeyer contendo 100 mL de meio CM líquido (milho, cenoura e água). O erlenmeyer foi mantido por dez dias em agitador do tipo *shaker*, em rotação de 120 rpm, à temperatura de 25-27 °C. Após esse período, todo o conteúdo foi homogeneizado em liquidificador. A suspensão inoculante usada no experimento foi produzida por meio da diluição em série de unidades formadoras de colônias (ufc), ajustando-se a concentração em  $3 \times 10^4$  ufc/mL.

## 2.2 Obtenção e preparo das sementes de cafeeiro

As sementes de cafeeiro utilizadas neste estudo foram da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, adquiridas na Fazenda Bom Jardim, produtora de sementes certificadas, localizada em Bom Sucesso, MG, safra 2013/2014. A preparação das sementes para montagem do experimento seguiu protocolos normalmente utilizados em estudos dessa natureza (CARVALHO et al., 2005, 2012; MAIA, 2012; OGOSHI, 2011; SANTOS, 2012).

O perfil fisiológico dos lotes de sementes foi avaliado em teste de germinação descrito nas Regras para Análise de Sementes do Brasil (2009). A sanidade foi aferida com teste de incubação em papel umedecido (*Blotter Test*).

O preparo das sementes para a montagem do experimento iniciou-se com a retirada do pergaminho e contato com água corrente por um período de 48

horas. Na sequência, foram desinfestadas com álcool 70% por dois minutos e em hipoclorito de sódio a 2% por mais dois minutos, seguidos de três banhos em água destilada e esterilizada. O excesso de água na superfície do grão foi eliminado deixando-se as sementes por 24 horas em câmara de fluxo laminar sobre papel de filtro esterilizado. Por fim, as sementes foram transferidas para placas de Petri (150 mm de diâmetro) contendo meio de cultura ágar-água e incubadas em BOD a  $25 \pm 2$  °C, por um período de sete dias, com o intuito de selecionar as sementes aparentemente isentas de microrganismos em sua superfície.

### **2.3 Obtenção das plântulas de cafeeiro e aplicação dos tratamentos**

Finalizado o processo de preparo, as sementes foram divididas em lotes de sessenta unidades, distribuídas em bandeja de isopor para germinar sobre duas folhas de papel “germitest” umedecidas com água destilada e esterilizada. As sementes foram depositadas lado a lado a aproximadamente 15 mm de distância entre si. Para tanto, as bandejas haviam sido desinfestadas com solução de álcool etílico a 70% e em seguida com hipoclorito de sódio a 2%.

Cada bandeja contendo as sementes foi envolvida em papel alumínio e este recebeu perfurações de estilete em toda sua extensão, a cerca de 100 mm de distância. As bandejas foram então colocadas em saco de polietileno, formando uma câmara úmida com o intuito de manter um microclima favorável à germinação e permitir trocas gasosas com o ambiente, sendo distribuídas sobre bancadas em câmara de crescimento vegetal com temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. As sementes foram aspergidas a cada dois dias com água destilada e esterilizada com o auxílio de um borrifador manual “De Vilbiss”, até o ponto em que o papel “germitest” se apresentasse úmido.

Decorridos cerca de dezenove dias, as plântulas apresentavam comprimento de raiz principal aproximado de 4,5 cm. Nesta ocasião, iniciou-se a aplicação dos tratamentos de inoculação descritos na Tabela 1. As inoculações foram realizadas sem e com ferimento da raiz principal promovido em seis pontos utilizando-se agulha entomológica. Nos tratamentos com inoculação do fungo antagonista, as plântulas tiveram as raízes aspergidas com a solução contendo *P. macrosporus* na concentração de  $3 \times 10^4$  ufc/mL, no primeiro dia da aplicação dos tratamentos, visando promover a indução de resistência. Nos tratamentos com inoculação do fitopatógeno, as plântulas tiveram as raízes aspergidas com a solução contendo conídios de *C. gloeosporioides* na concentração de  $4 \times 10^6$  esporos/mL, no sétimo dia após o início da aplicação dos tratamentos, visando provocar a infecção. Nos tratamentos que não receberiam inóculos fúngicos, as raízes eram aspergidas apenas com água destilada e esterilizada.

A composição dos tratamentos também envolveu diferentes períodos de coleta das raízes para análises de atividade enzimática, às 6, 12, 24 e 48 horas após a finalização dos procedimentos de inoculação. Estabeleceu-se assim um esquema fatorial  $4 \times 2 \times 4$  (quatro tratamentos de inoculação x raízes sem e com ferimento x quatro períodos de coleta para análises enzimáticas). Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada unidade experimental composta por uma bandeja contendo sessenta plântulas. Esse número de plântulas foi necessário a fim de garantir as quantidades de material de raiz requeridas nas análises de atividade enzimática.

Durante todo o período experimental, as parcelas foram mantidas sobre bancadas em câmara de crescimento vegetal, com temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro, sendo umedecidas a cada dois dias com água destilada e esterilizada.

Tabela 1 Tratamentos de inoculação em raízes de cafeeiro sem e com ferimento

Tratamento de inoculação	Procedimento					
	Ferimento da raiz no 1º dia	Aspersão água no 1º dia	Aspersão inóculo de <i>P. macrosporus</i> no 1º dia	Ferimento da raiz no 7º dia	Aspersão água no 7º dia	Aspersão inóculo de <i>C. gloeosporioides</i> no 7º dia
T1 Controle s/ ferimento	-	+	-	-	+	-
T2 <i>Colletotrichum</i> s/ ferimento	-	+	-	-	-	+
T3 <i>Phialomyces</i> s/ ferimento	-	-	+	-	+	-
T4 Phial. + Collet. s/ ferimento	-	-	+	-	-	+
T5 Controle c/ ferimento	+	+	-	+	+	-
T6 <i>Colletotrichum</i> c/ ferimento	+	+	-	+	-	+
T7 <i>Phialomyces</i> c/ ferimento	+	-	+	+	+	-
T8 Phial. + Collet. c/ ferimento	+	-	+	+	-	+

## 2.4 Preparo de extratos de raízes e avaliação da atividade de enzimas

A coleta de raízes foi realizada em períodos de 6, 12, 24 e 48 horas após a finalização dos procedimentos de inoculação das plântulas de cafeeiro. Após destacadas, as raízes foram envelopadas em papel alumínio, colocadas em contato com nitrogênio líquido a fim de paralisar o metabolismo celular e, em seguida, armazenadas em *deep freezer* a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem processadas.

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas peroxidase e superóxido dismutase, amostras de 200 mg de tecido das raízes foram maceradas com nitrogênio líquido em almofariz, adicionando-se polivinilpirrolidona 1% (p/p), até a obtenção de um pó fino. Esse material foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM em pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 25 minutos, em temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo o extrato sobrenadante utilizado para as análises enzimáticas (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da enzima peroxidase foi determinada pela oxidação do guaiacol, de acordo com a metodologia de Urbanek, Kuzniak gearowska e Herka (1991). Adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, ajustado para 200  $\mu\text{L}$  pela adição de solução contendo fosfato de potássio 100 mM em pH 7,0, guaiacol 7,5 mM e peróxido de hidrogênio 18,75 mM. Após incubação a  $30^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 480nm. A partir da leitura obtida, o coeficiente de extinção molar de  $1,235\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade da peroxidase (CHANCE; MAEHLEY, 1955). A atividade de peroxidase foi expressa em micromol de atividade por minuto, por miligrama de proteína solúvel ( $\mu\text{M min}^{-1}\text{ mgP}^{-1}$ ).

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada pela capacidade dessa enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em meio de incubação composto pelo extrato enzimático e solução

de fosfato de potássio 50 mM em pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1  $\mu$ M, nitrotetrazólio 75  $\mu$ M eriboflavina 2  $\mu$ M. Após incubação por 7 minutos em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30 W, realizou-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm. Uma unidade de superóxido dismutase correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do nitrotetrazólio nas condições do ensaio, sendo expressa em unidade de proteína por minuto, por miligrama de proteína solúvel ( $U \text{ min}^{-1} \text{ mgP}^{-1}$ ).

Para as análises de atividade da enzima quitinase, os tecidos das raízes foram colocados em nitrogênio líquido e triturados até a obtenção de um pó fino, utilizando-se almofariz e pistilo. Posteriormente, aproximadamente 1 g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual se adicionou o tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,2, na proporção de 5mL de tampão por grama de amostra de raiz. Após homogeneização, a solução foi centrifugada a 12.000 g por 25 minutos, à temperatura de 4°C, sendo o extrato sobrenadante usado como fonte enzimática.

A atividade da quitinase foi determinada a partir de uma alíquota de 100  $\mu$ L de extrato enzimático, ajustada para 280  $\mu$ L pela adição de solução com 100  $\mu$ L de acetato de sódio 50 mM em pH 5,2 e 80  $\mu$ L de CM-Chitin-RBV 2 mg  $\text{mL}^{-1}$  (substrato específico para quitinase fornecido por LOEWE Biochemica GmbH), disposta em microplaca de 96 cavidades, com volume de 350  $\mu$ L por cavidade. As amostras assim tratadas foram incubadas a 40 °C por 90 minutos, sendo em seguida acidificadas com 30  $\mu$ L de HCl 2 N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 3.700 g por 10 minutos, à temperatura de 4°C. Uma alíquota de 180  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura no comprimento de onda de 520 nm, em espectrofotômetro de ELISA (WIRTH; WOLF, 1990). A atividade de quitinase foi expressa em micromol de atividade por minuto, por miligrama de proteína solúvel ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mgP}^{-1}$ ).

A proteína total de cada extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina.

## **2.5 Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância. Empregou-se o teste de Scott-Knott a 5% para agrupamentos de médias dos tratamentos e modelos de regressão foram ajustados para a atividade das enzimas em função do tempo decorrido da aplicação dos tratamentos. Foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade das três enzimas estudadas foi significativamente influenciada pelos tratamentos de inoculação com *P. macrosporus* e *C. gloeosporioides*, diferindo também pelo fermento ou não das raízes e em função dos períodos de amostragem após a inoculação. Houve ainda interações significativas entre esses fatores (Tabela 2). Os coeficientes de variação foram relativamente baixos, evidenciando boa consistência dos dados obtidos.

De maneira geral, a atividade enzimática nas raízes do cafeeiro aumentou com o tempo decorrido da aplicação dos tratamentos de inoculação com *P. macrosporus* e/ou *C. gloeosporioides* (Figura 1). A atividade das enzimas peroxidase e superóxido dismutase foi incrementada até o período de 48 horas considerado na amostragem de raízes, enquanto a quitinase atingiu o pico de máxima atividade antes desse prazo. Todavia, o desdobramento das interações entre tratamentos de inoculação x fermentos x períodos de tempo na amostragem das raízes para análise enzimática revela comportamentos variáveis conforme as combinações desses fatores e a enzima em questão. De qualquer modo, a rápida alteração nos padrões de atividade das três enzimas é condizente com os relatos da literatura de que reações bioquímicas de defesa da planta iniciam-se poucas horas após o reconhecimento de condições adversas, como, por exemplo, a ação de patógenos (OLIVEIRA, 2006; TORRES; DANGL, 2005).

Tabela 2 Resumo da análise de variância para as variáveis estudadas

Fontes de variação <sup>1</sup>	G. L.	QM		
		Atividade da peroxidase	Atividade da superóxido dismutase	Atividade da quitinase
Inoculação (I)	3	19.897.713,95**	6.287,37**	160,18**
Ferimento (F)	1	5.940.647,51**	476.314,87**	15,84**
Período (P)	3	7.029.137,01**	102.247,01**	256,01**
I x F	3	834.943,40**	2.255,23**	67,45**
I x P	9	900.362,75**	1.936,73**	30,08**
F x P	3	281.310,57**	120.499,21**	169,84**
I x F x P	9	64.661,57**	2.951,45**	50,20**
Resíduo	64	4.394,86	7,52	1,70
Total	95			
CV (%)		2,7	1,8	6,3

<sup>1</sup> Inoculação = tratamentos envolvendo inoculação de *P. macrosporus* e *C. gloeosporioides*; Ferimento = sem ou com ferimento nas raízes para a inoculação; Período = períodos de coleta de raízes para análises enzimáticas após a inoculação. \*\* = significativo a 1% pelo teste F.

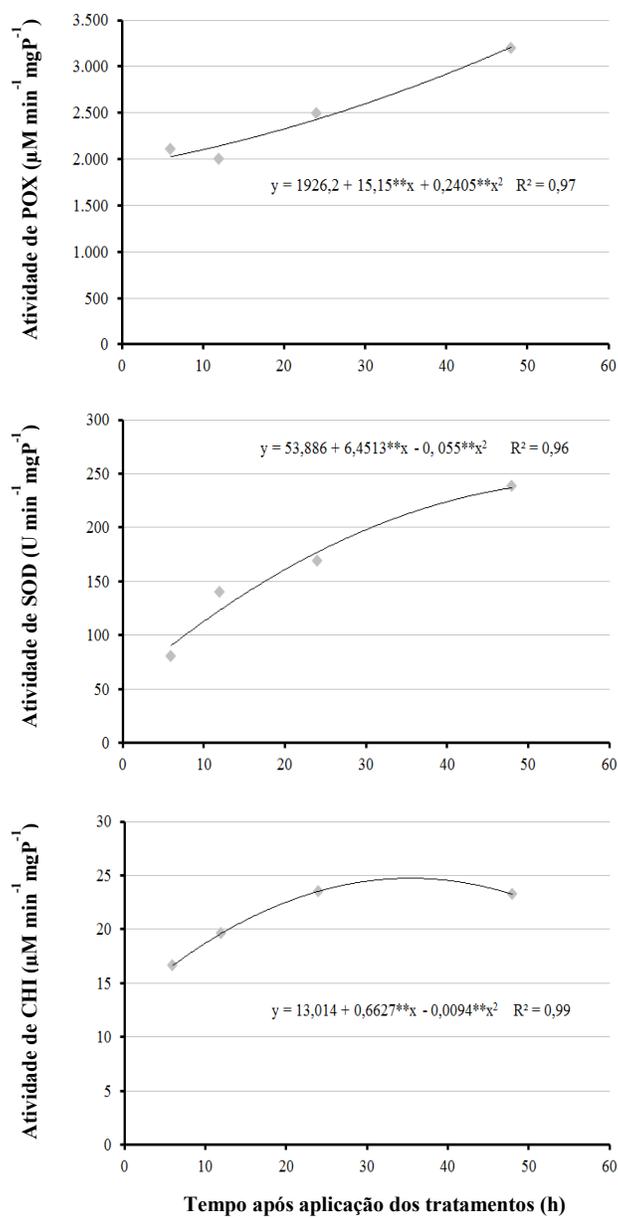


Figura 1 Atividade de enzimas peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e quitinase (CHI) em raízes de plântulas de cafeeiro em função do tempo após inoculação

Legenda: Média de todos os tratamentos, sem e com fermento.

### 3.1 Atividade de peroxidase

A promoção de ferimento nas raízes incrementou a atividade de peroxidase, mesmo no tratamento controle. Este correspondeu à menor expressão da enzima, enquanto os demais tratamentos resultaram em atividade mais intensa, sobretudo ao final do período de avaliação (Tabela 3, Figura 2). Considerando-se que a ação da peroxidase está relacionada aos mecanismos de defesa da planta, é importante notar que, quando a inoculação do patógeno foi feita posteriormente ao período de contato das raízes com *P. macrosporus*, a atividade da peroxidase foi potencializada, independentemente da existência ou não de ferimentos no momento da inoculação dos fungos.

Ao longo do período de avaliação, o tratamento com inoculação isolada do antagonista *P. macrosporus* promoveu maior atividade enzimática em comparação à inoculação com o patógeno *C. gloeosporioides*, sendo as diferenças proporcionalmente maiores na ausência de ferimento às raízes (Tabela 3, Figura 2). Sabe-se que a colonização por esse patógeno se dá preferencialmente quando existem rupturas no tecido vegetal (PEREIRA et al., 2009), o que pode ter retardado sua atuação e o conseqüente reconhecimento e reação de defesa da planta quando a inoculação foi feita em raízes intactas. Desse modo, as injúrias devem ter favorecido a entrada do *C. gloeosporioides*, contribuindo para nivelar os resultados nesses dois tratamentos quando aplicados com ferimento das raízes (Figura 2B).

Tabela 3 Atividade da enzima peroxidase ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$ ) em raízes de plântulas de cafeeiro, a partir da inoculação com *P. macrosporus* e/ou *C. gloeosporioides*, sem e com fermento, e em diferentes períodos de amostragem (h) após a aplicação dos tratamentos

Tratamento de inoculação	Sem fermento					Com fermento				Média geral	
	Período de amostragem de raízes				Média	Período de amostragem de raízes					Média
	6	12	24	48		6	12	24	48		
Controle	873 c	1.114 d	1.114 d	1.988 d	1.272 d	2.064 c	2.044 c	1.744 d	2.212 d	2.016 d	1.644 d
<i>Colletotrichum</i>	969 c	1.273 c	1.721 c	2.169 c	1.533 c	2.165 c	2.200 b	2.344 c	2.954 c	2.416 c	1.974 c
<i>Phialomyces</i>	2.187 b	1.771 b	2.262 b	3.148 b	2.342 b	2.519 b	2.235 b	2.486 b	3.126 b	2.592 b	2.467 b
Phial. + Collet.	2.869 a	2.684 a	4.223 a	4.874 a	3.662 a	3.190 a	2.721 a	4.083 a	5.111 a	3.776 a	3.719 a
Média	2.202 B					2.700 A					2.451
CV (%)						2,7					

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

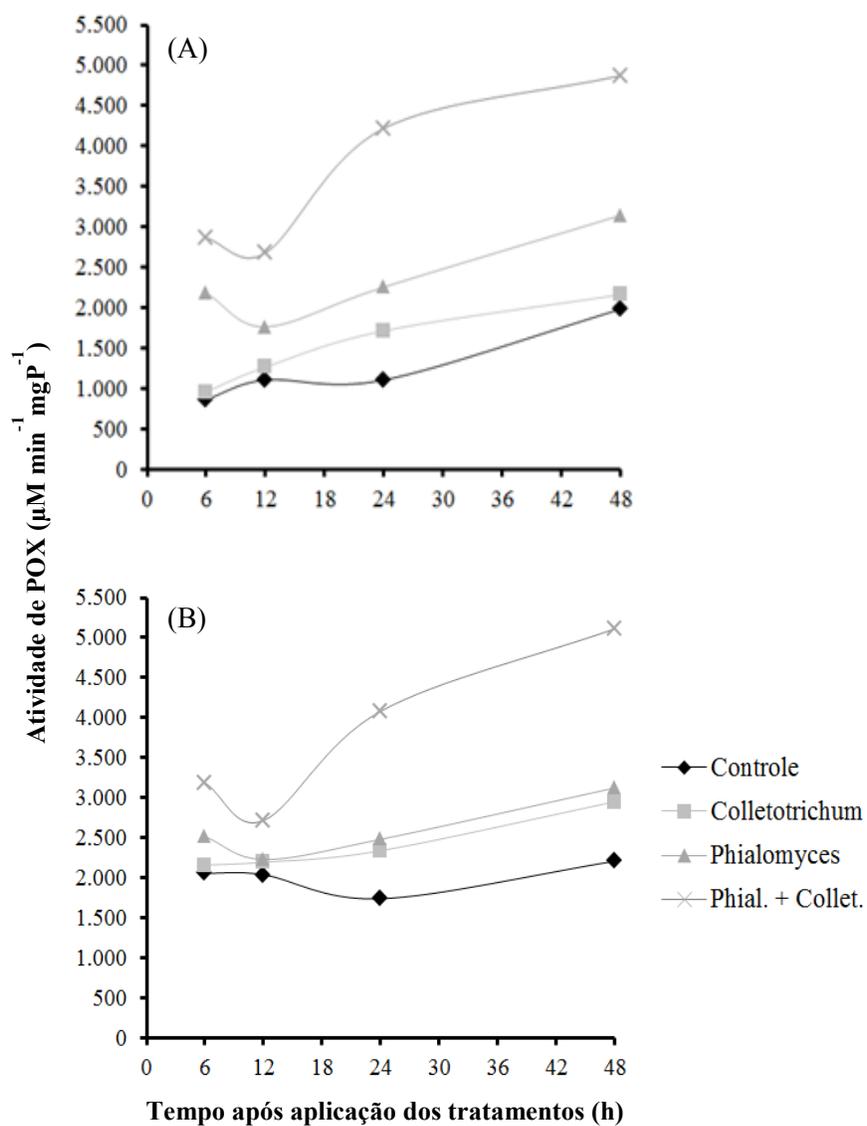


Figura 2 Atividade da enzima peroxidase (POX) em raízes de plântulas de café, em função do tempo a partir da inoculação com *P. macrosporus* e/ou *C. gloeosporioides*, sem (A) e com fermento (B)

O tempo transcorrido da aplicação dos tratamentos foi determinante nas reações de defesa do cafeeiro, expressas pelo aumento progressivo da atividade de peroxidase (Figura 2). Na ausência de ferimento, observa-se que a atividade dessa enzima foi inicialmente menor e tornou-se mais acentuada ao longo do tempo, inclusive no tratamento controle. Com ferimento, já nas primeiras horas a ação da peroxidase foi estimulada em todos os tratamentos, mas a taxa de incremento foi menos intensa, à exceção da inoculação combinada dos dois fungos, que induziu maior e crescente atividade de peroxidase com o tempo.

Ao que parece, a colonização por *P. macrosporus* ocorre com certa facilidade mesmo em raízes intactas e sadias, na qual o fungo ultrapassa as barreiras para penetração nos tecidos e dispara reações de defesa na planta por meio do estímulo à atividade da peroxidase (Figura 2A). Essa atividade foi substancialmente ampliada no tratamento em que houve exposição ao patógeno após o contato com o antagonista pelo período de seis dias. Nesse caso, a resposta de defesa da planta à presença de *C. gloeosporioides* é bem mais rápida e potente devido à ativação prévia da resistência, desencadeada na interação com *P. macrosporus*.

Esse resultado confirma a operação do mecanismo de defesa conhecido como preparo ou sensibilidade (efeito “*priming*”), pelo qual o tratamento prévio com indutores de resistência predispõe plantas suscetíveis a ativarem respostas de defesa de maneira mais rápida e intensa quando houver contato com o fitopatógeno (CONRATH et al., 2006; KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002).

A resistência induzida é ativada por diversos elicitores, que podem ser fatores físicos, químicos ou biológicos, os quais permitem às plantas combaterem a entrada e a atividade do patógeno em seus tecidos, por meios próprios de defesa (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005; NOJOSA; RESENDE; RESENDE, 2005; STANGARLIN et al., 2011).

Ao reconhecer os elicitores, a planta dispara mecanismos para ativar genes envolvidos em respostas de defesa, as quais podem ser estruturais e bioquímicas (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Após a ativação dos genes, as reações seguem por rotas de sinalização para expressar a defesa da planta. Desse modo, quando as plantas são expostas ao agente indutor de resistência, essas rotas de sinalização levam à intensificação da atividade de enzimas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos (MACAGNAN et al., 2008).

A peroxidase participa de diversos processos fisiológicos e sua atividade é aumentada quando a planta sofre estresses como o ataque de patógenos e também quando é tratada com agentes indutores de resistência (ANTEROLA; LEWIS, 2002), sendo, por isso, frequentemente utilizada como marcador enzimático em estudos de resistência (RASMUSSEN; DUNFORD; WELINDER, 1995). A ação da peroxidase pode estimular a formação de lignina que representa uma barreira física à penetração de patógenos. Atua também na proteção celular contra reações oxidativas (ANTEROLA; LEWIS, 2002; OLIVEIRA, 2006) que são muito intensificadas em condições adversas e que podem prejudicar a própria planta, no fenômeno chamado estresse oxidativo (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014; OLIVEIRA, 2006).

Pelo exposto, depreende-se que os valores de atividade de peroxidase muito mais elevados em decorrência da inoculação combinada dos dois fungos, comparativamente à sua inoculação individualizada (Tabela 3, Figura 2), confirmam o papel de *P. macrosporus* como efetivo indutor de resistência contra *C. gloeosporioides*. Quando o cafeeiro teve suas raízes previamente tratadas com o antagonista, a reação da planta ao patógeno foi muito mais rápida (Figura 2), fato condizente com os relatos de que as alterações nos níveis da peroxidase estão entre as primeiras respostas da planta ao identificar o ataque de patógenos (GOLAN; RUBINOWSKA; GÓRSKA-DRABIK, 2013).

O aumento na atividade de peroxidase em cafeeiro foi também verificado em trabalhos envolvendo testes de diferentes produtos em outros patossistemas. Pereira et al. (2008), ao avaliarem os efeitos de concentrações de extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e o composto acibenzolar-S-metil, na presença do patógeno *Cercospora coffeicola*, constataram aumento da atividade de peroxidase em folhas de cafeeiro, com distintos picos de atividade conforme o produto ao longo de onze dias após a aplicação dos tratamentos. Silva et al. (2008) detectaram aumento significativo da atividade de peroxidase em mudas de cafeeiro tratadas com duas bactérias endofíticas e inoculadas três dias depois com o patógeno *Hemileia vastatrix*, sendo a avaliação da atividade enzimática realizada sete dias após o contato com o patógeno. Pereira et al. (2012) estudaram o composto acibenzolar-S-metil e o óleo essencial de citronela no controle da ferrugem e da cercosporiose. Na avaliação das respostas de defesa, esses autores observaram aumento da atividade de peroxidase nas folhas, no período de 192 a 336 horas após a pulverização, dependendo do produto testado.

Apesar de a peroxidase ser amplamente avaliada em estudos envolvendo reações bioquímicas de defesa das plantas contra fitopatógenos, não foram encontradas na literatura inferências acerca de respostas envolvendo a atividade dessa enzima em raízes de cafeeiro. Portanto, é válido mencionar o caráter inédito do presente trabalho.

É interessante notar ainda que embora o cafeeiro reconheça a presença tanto do antagonista quanto do patógeno, ativando os mecanismos de defesa relacionados à peroxidase (Tabela 3, Figura 2), é provável que ocorra uma associação facilitada ou mesmo alguma sinergia com *P. macrosporus*, tendo em vista a sua capacidade de atuar ao mesmo tempo como agente protetor e estimulante do crescimento. Essa sinergia poderia explicar a boa capacidade deste antagonista colonizar as raízes sadias (sem ferimentos) e acionar as

alterações bioquímicas ligadas à indução de resistência contra *C. gloeosporioides* (Figura 2A).

### 3.2 Atividade de superóxido dismutase

Apesar de algumas diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos quanto à indução de alterações na atividade da superóxido dismutase, estas não tiveram maior magnitude quando as inoculações foram efetuadas sem ferir as raízes (Tabela 4) e, com o passar do tempo, houve estabilização da atividade enzimática (Figura 3A).

Contrariamente, o procedimento de realizar perfurações nas raízes antecedendo a aplicação dos tratamentos acentuou drasticamente a atividade dessa enzima no decorrer dos períodos de avaliação e, após 48 horas, propiciou clara diferenciação entre os efeitos dos tratamentos (Tabela 4, Figura 3B). Assim, os fatores “ferimento” e “tempo de contato” tiveram grande influência sobre a atividade da superóxido dismutase. Verificou-se que a exposição ao *P. macrosporus* incrementou significativamente a atividade enzimática nas raízes que haviam recebido ferimento, sobretudo quando foram posteriormente inoculadas com *C. gloeosporioides*. Nesta condição, a atividade da superóxido dismutase refletiu a indução de resistência por *P. macrosporus*, porém de forma menos evidente que percebida no caso da peroxidase.

Tabela 4 Atividade da enzima superóxido dismutase ( $\text{U min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$ ) em raízes de plântulas de cafeeiro, a partir da inoculação com *P. macrosporus* e/ou *C. gloeosporioides*, sem e com fermento, e em diferentes períodos de amostragem (h) após a aplicação dos tratamentos

Tratamento de inoculação	Sem fermento					Com fermento					Média geral
	Período de amostragem de raízes				Média	Período de amostragem de raízes				Média	
	6	12	24	48		6	12	24	48		
Controle	72 c	77 c	78 c	79 b	76 d	56 c	190 b	225 b	339 d	203 d	139 d
<i>Colletotrichum</i>	115 a	84 b	83 b	83 a	91 b	68 b	200 a	218 c	376 c	216 c	154 c
<i>Phialomyces</i>	78 b	87 b	83 b	80 b	82 c	91 a	196 a	217 c	418 b	231 b	156 b
Phial. + Collet.	118 a	91 a	89 a	86 a	96 a	49 d	196 a	355 a	444 a	261 a	179 a
Média	87 B					227 A				157	
CV (%)						1,8					

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

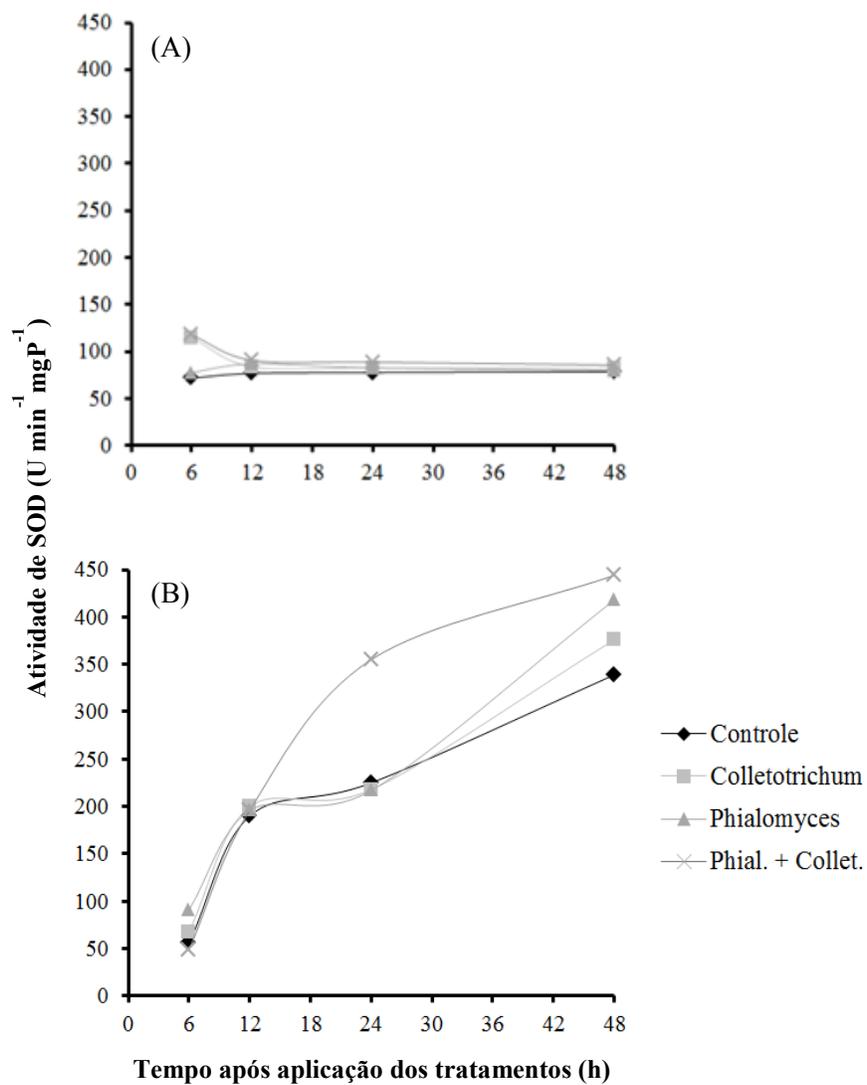


Figura 3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em raízes de plântulas de cafeeiro, em função do tempo a partir da inoculação com *P. macrosporus* e/ou *C. gloeosporioides*, sem (A) e com fermento (B)

Resultados variáveis de atividade de superóxido dismutase em folhas de cafeeiro foram obtidos por Xavier (2011). Essa autora testou o efeito da pulverização de extratos à base de casca de laranja e *Cladosporium cladosporioides* em mudas da mesma cultivar utilizada no presente estudo (Catuaí Vermelho IAC 144), para avaliações quanto à indução de resistência contra a ferrugem. Na análise enzimática, observou-se certo aumento da atividade de superóxido dismutase em alguns dos tratamentos após oito dias.

Barreto (2005), estudando as respostas bioquímicas ligadas à resistência de genótipos de feijão caupi ao patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, verificou que uma alteração que ocorre poucas horas após o reconhecimento do fungo foi a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma espécie reativa de oxigênio que parece ter ação fungitóxica direta contra o patógeno e funciona como molécula sinalizadora de outros eventos de defesa, mas que também provoca o estresse oxidativo. Dentre outras enzimas, as atividades da superóxido dismutase, que tem ação antioxidativa, e da peroxidase foram maiores no genótipo resistente, sugerindo seu envolvimento nos mecanismos de resistência dessa cultura ao *C. lindemuthianum*.

O aumento na atividade de superóxido dismutase em resposta aos tratamentos (Tabela 4, Figura 3) não seguiu os mesmos padrões e proporções observados em relação à peroxidase (Tabela 3, Figura 2), embora, assim como esta, a primeira exerça funções de atenuação do estresse oxidativo em plantas crescendo sob condições bióticas ou abióticas desfavoráveis (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL; TUTEJA, 2010; SCANDALIOS, 2005). Uma hipótese que explicaria a diferença de comportamento das duas enzimas frente aos tratamentos é que nas reações de defesa do cafeeiro a peroxidase seja mais sensível à ativação por *P. macrosporus*.

### 3.3 Atividade de quitinase

De maneira análoga ao que se verificou no caso da superóxido dismutase, as diferenças nos resultados obtidos para a atividade de quitinase foram menos evidentes ao longo do tempo quando os tratamentos de inoculação foram efetuados sem ferimento das raízes (Tabela 5, Figura 4). Em média, a realização de ferimentos não condicionou maior atividade de quitinase, porém, nessa condição houve melhor discriminação de efeitos dos tratamentos de inoculação, especialmente nas avaliações feitas a partir do período de 24 horas.

Os tratamentos com exposição ao *P. macrosporus* e, principalmente, a combinação *P. macrosporus* mais *C. gloeosporioides*, se destacaram quanto ao estímulo à atividade da quitinase (Figura 4B). Pelos dados da última avaliação realizada no período de 48 horas após a aplicação dos tratamentos de inoculação, nota-se de modo geral uma estabilização, tendendo ao decréscimo, na atividade de quitinase, diferentemente do comportamento constatado para as outras duas enzimas. Esses efeitos menos expressivos do contato com os fungos sobre a ação da quitinase nas raízes do cafeeiro leva a crer que, possivelmente, tais alterações não estariam fortemente vinculadas à resistência induzida por *P. macrosporus*, embora constituam parte do efeito protetor contra *C. gloeosporioides*.

A produção de quitinase é efetiva na defesa das plantas, com ação tipicamente antifúngica (OLIVEIRA, 2006) ao catalisar a hidrólise da quitina, componente da parede celular de fungos, o que inibe o crescimento daqueles patogênicos no hospedeiro. Além dessa atuação direta, a quitinase libera oligômeros de quitina do patógeno, que funcionam como elicitores eficientes para ativar resposta de defesa das plantas (CAMPOS; GROSSI DE SÁ, 2002).

Tabela 5 Atividade da enzima quitinase ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$ ) em raízes de plântulas de cafeeiro, a partir da inoculação com *P. macrosporus* e/ou *C. gloeosporioides*, sem e com fermento, e em diferentes períodos de amostragem (h) após a aplicação dos tratamentos

Tratamento de inoculação	Sem fermento					Com fermento					Média geral
	Período de amostragem de raízes				Média	Período de amostragem de raízes				Média	
	6	12	24	48		6	12	24	48		
Controle	18 c	20 a	21 a	21 b	20 b	14 b	19 a	18 d	13 d	16 d	18 d
<i>Colletotrichum</i>	17 c	21 a	20 b	22 b	20 b	13 b	18 a	23 c	22 c	19 c	20 c
<i>Phialomyces</i>	21 b	23 a	22 a	25 a	23 a	12 b	17 a	26 b	27 b	21 b	22 b
Phial. + Collet.	23 a	22 a	19 b	24 a	22 a	15 a	18 a	38 a	32 a	26 a	24 a
Média	21 A					20 B					21
CV (%)						6,3					

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5%.

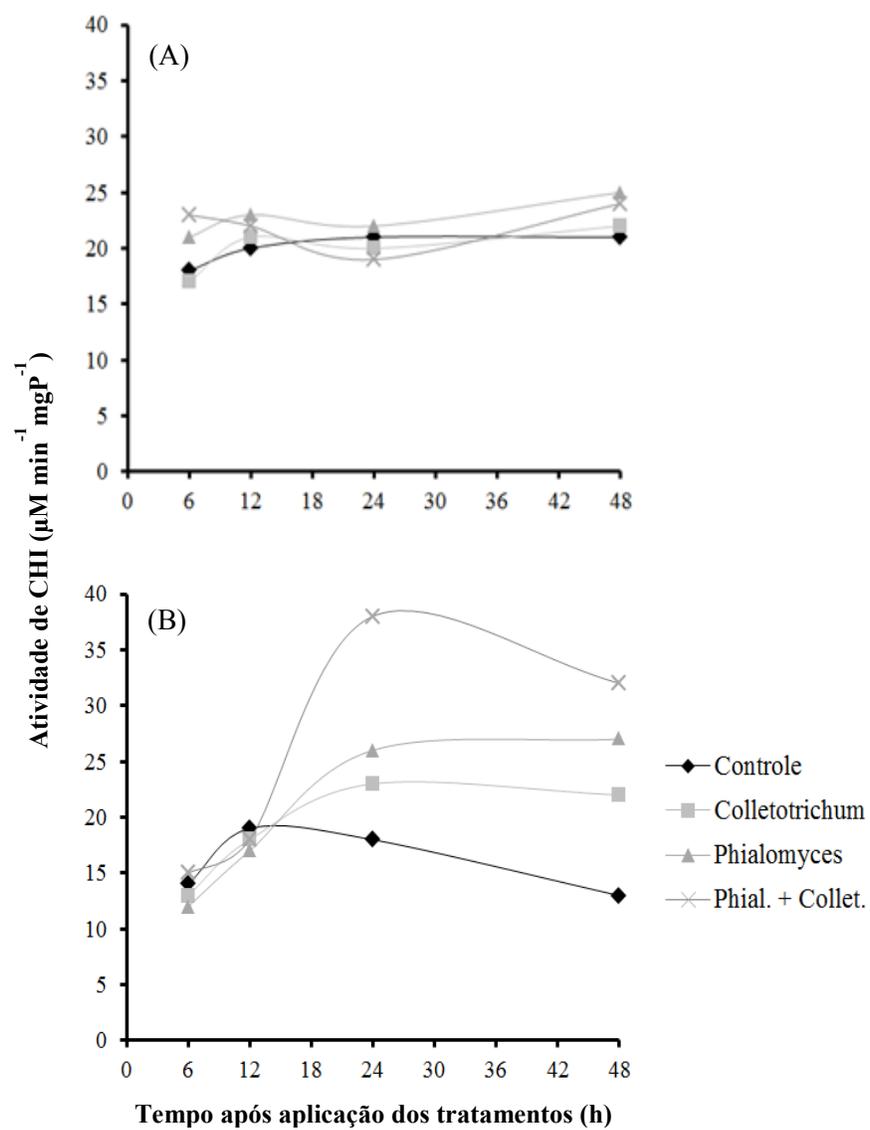


Figura 4 Atividade da enzima quitinase (CHI) em raízes de plântulas de cafeeiro, em função do tempo a partir da inoculação com *P. macrosporus* e/ou *C. gloeosporioides*, sem (A) e com fermento (B)

As informações sobre a atividade de quitinase em plantas de cafeeiro submetidas a tratamentos visando indução de resistência têm se mostrado pouco conclusivas. Pereira et al. (2012), estudando respostas de defesa à aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM) e óleo essencial de citronela para o controle da ferrugem e cercosporiose, observaram aumentos significativos na atividade quitinase apenas em determinados momentos durante o período de avaliação de 24 até 336 horas após a aplicação dos tratamentos. Já Xavier (2011) não identificou alteração na atividade de quitinase ao avaliar o efeito de extratos à base de casca de laranja e *Cladosporium cladosporioides* pulverizados em mudas visando à indução de resistência contra a ferrugem.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interpretação conjunta dos resultados obtidos no presente estudo permite afirmar que tanto o antagonista e seus metabólitos quanto o patógeno, quando inoculados às raízes, induzem respostas de defesa das plantas de cafeeiro, expressas pelo aumento na atividade das três enzimas avaliadas. Em todos os casos, o contato com o patógeno quando a planta havia sido previamente colonizada pelo antagonista resultou em reações defensivas mais intensas, confirmando que *P. macrosporus* atua como agente indutor de resistência.

O principal mecanismo dessa indução de resistência está relacionado à enzima peroxidase, cuja atividade foi fortemente influenciada pela exposição ao *P. macrosporus*. Mesmo quando inoculado sem ferimentos às raízes, esse fungo mostrou capacidade de estimular a atividade de peroxidase, o que não se verificou para as demais enzimas. Esse fato reforça a especificidade e preponderância da ativação da peroxidase como mecanismo pelo qual *P. macrosporus* induz resistência no cafeeiro e expressa sua ação antagonista ao *C. gloeosporioides*.

## 5 CONCLUSÕES

O antagonismo do fungo *P. macrosporus* contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* se dá via indução de resistência no cafeeiro, por meio do estímulo à atividade das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e, de forma menos intensa, da quitinase.

A ativação da peroxidase constitui o principal mecanismo de indução de resistência no cafeeiro a partir da inoculação das raízes com *P. macrosporus*.

## REFERÊNCIAS

- ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct. 2002.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.
- BARRETO, A. L. H. **Estratégias de infecção dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc. & Magnus) Briosi & Cav.] e *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.] em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta**. 2005. 297p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BOTREL, D. A. **Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*) no cafeeiro**. 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- 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**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.
- CAMPOS, M. A.; GROSSI DE SÁ, M. F. Resistência mediada pela expressão de proteínas e peptídeos antimicrobianos. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 127-155.

CARVALHO, G. A. de et al. Efeito *in vitro* e *in vivo* de filtrados de rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 553-561, maio/jun. 2005.

CARVALHO, H. P. de et al. Efeito de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, agente etiológico da mancha manteigosa, na germinação e viabilidade de sementes de cafeeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 264-271, 2012.

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.

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

CHET, I. Microbial control plant disease. In: \_\_\_\_\_. **Environmental microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 335-354.

CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, I Production of non-volatile antibiotics. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, p. 25-39, 1971.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, Aug. 2005.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.

GOLAN, K.; RUBINOWSKA, K.; GÓRSKA-DRABIK, E. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (SW.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. infestation. **Acta Biologica**, Cracoviensia, v. 55, p. 93-98, 2013.

GULSEN, O. et al. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*. **Arthropod Plant Interact**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 45-55, Mar. 2010.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, New York, v. 142, n. 9, p. 2321-2331, 1996.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves required the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, 2002.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 7-12, Jan. 2001.

LABORDE, M. C. F. **Avaliação de fungos sapróbios na sobrevivência de *Cercospora coffeicola***. 2014. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LOON, L. C. van; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

MACAGNAN, D. et al. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, n. 1, p. 34-37, jan./fev. 2008.

MAIA, F. G. M. ***Colletotrichum gloeosporioides*: transmissibilidade em sementes e mecanismos de defesa em mudas micropropagadas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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.

NASCIMENTO, J.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 234-250, 2014.

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. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 1, p. 139-153.

OGOSHI, G. **Fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de plantas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa**. 2011. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

OLIVEIRA, J. T. A. Mecanismos de defesa do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] contra patógenos. In: CONGRESSO NACIONAL DO FEIJÃO-CAUPI, 1., 2006, Teresina. **Anais...** Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2006. p. 1-4.

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123 p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1998.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* - cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, 2009.

PEREIRA, R. B. et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eye spot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 383-390, jul./ago. 2012.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

PIEROZZI, C. G. **Fungos sapróbios do semiárido nordestino: aspectos fisiológicos, ação no controle da ferrugem e indução do enraizamento em mudas de eucalipto**. 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

PINTO, F. A. M. F. **Controle da mancha manteigosa com fungos sapróbios em cafeeiro**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

RASMUSSEN, C. B.; DUNFORD, H. B.; WELINDER, K. G. Rate enhancement of compound I formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and conifer alcohol. **Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 4022-4029, 1995.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costaricensis* 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.

SANTOS, H. N. **Resistência em cafeeiro a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da mancha manteigosa**. 2012. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SILVA, H. S. A. et al. Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 49-54, 2008.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

STRANGE, R. N. **Introduction to plant pathology**. New Jersey: J. Wiley, 2003. 480 p.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 397-403, Aug. 2005.

URBANEK, H.; KUZNIAKGEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean-leaves by botrytis-cinerea polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

WAR, A. R. et al. Jasmonic acid mediated-induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 30, n. 4, p. 512-523, Dec. 2011.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, 1990.

XAVIER, K. V. **Extratos de cascas de maracujá e de laranja na indução de resistência em cafeeiro contra ferrugem tomateiro contra mancha bacteriana**. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.