PROTEÇÃO DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)
CONTRA *Hemileia vastatrix* BERK. ET BR. POR
Saccharomyces cerevisiae MEYEN

DAGMAR SANTOS ROVERATTI

Bióloga

Orientador: Dr^a WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1989

R873p Roveratti, Dagmar Santos
Proteção de plantas de café (Coffea arabica
L.) contra Hemileia vastatrix Berk. et Br. por
Saccharomyces cerevisiae Meyen. Piracicaba,
1989.
94p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Café - Doença - Controle 2. Ferrugem do
café - Controle I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.73

PROTEÇÃO DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CONTRA
Hemileia vastatrix BERK ET BR. POR *Saccharomyces cerevisiae* MEYEN

Dagmar Santos Roveratti

Aprovada em: 30/08/89

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

ESALQ/USP

Dr. Walkyria B.C. Moraes

IB/CPA

Drª Walkyria B.C. Moraes

Orientador

Ao Victor e à Mãra,
pela minha ausência.

Ao Rui,
pela sua presença.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos Sinceros,

À Drª WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES, pelo apoio, sugestões e incentivo como orientadora deste trabalho.

Ao Dr. MÁRIO BARRETO FIGUEIREDO, da Divisão de Patologia Vegetal do Instituto Biológico, pela revisão dos originais.

À CECÍLIA ABEID TEIXEIRA, da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pelos serviços de datilografia.

Ao SÉRGIO VIANNA, da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico, pelos serviços de fotografia.

Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) e ao "Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit", GmbH (GTZ), pelo auxílio financeiro.

À ANA REGINA, pela valiosa colaboração durante a execução dos experimentos.

Ao MARCELO e ao CELSO pelo auxílio prestado como funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica.

À DENISE, ELZA, SANDRA, SYLVIA e MARCOS pelo companheirismo durante os anos de curso.

Aos demais colegas e funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS	x
RESUMO	xiii
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1. Indução de Resistência	07
2.2. Controle Biológico	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Planta Hospedeira	32
3.2. Patógeno	33
3.3. Microorganismo antagônico ou indutor de re- sistência	33
3.4. Preparo do Inóculo	34
3.5. Inoculação	34
3.6. Preparo e aplicação do microorganismo anta- gônico ou indutor de resistência	35
3.7. Avaliação do efeito de proteção	36
3.8. Testes de Proteção	36
3.8.1. Influência da concentração da levedu- ra na proteção de plantas de café ..	37
3.8.2. Influência do intervalo de tempo en- tre o tratamento com a levedura e a inoculação com <i>H. vastatrix</i> - dura- ção do efeito de proteção	37

3.8.3. Investigação sobre o caráter sistêmico ou não da proteção	38
3.8.4. Avaliação sobre o efeito do tratamento com a levedura após a inoculação.	40
3.8.5. Comparação entre a eficiência da proteção determinada por células vivas ou autoclavadas da levedura e seus filtrados	41
3.8.5.1. Procedimento para obtenção das preparações da levedura	41
3.8.5.2. Testes de Proteção	44
3.9. Efeito da levedura <i>S. cerevisiae</i> sobre o patógeno <i>H. vastatrix</i>	44
3.9.1. Efeito sobre a germinação de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i> "in vitro" .	45
3.9.1.1. Preparo dos testes de germinação	45
3.9.1.2. Observação e contagem ao microscópio óptico	45
3.9.2. Efeito sobre a permanência dos uredíniosporos na superfície foliar ...	46
3.9.2.1. Preparo dos discos de folhas	46
3.9.2.2. Método de Coloração	47
3.9.2.3. Observação ao microscópio de Fluorescência	48
3.9.3. Efeito sobre a germinação e formação de apressórios dos uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i> "in vivo"	48
3.9.3.1. Preparo dos discos de folhas	48
3.9.3.2. Método de Coloração	49
3.9.3.3. Observação ao microscópio de Fluorescência	49

	Página
3.9.4. Testes de Proteção	50
3.10. Fotomicrografias	50
3.11. Análise Estatística	51
4. RESULTADOS	52
4.1. Influência da concentração da levedura na proteção de plantas de café	52
4.2. Influência do intervalo de tempo entre o tra- tamento com a levedura e a inoculação com <i>H. vastatrix</i> - duração do efeito de prote- ção	55
4.3. Investigação sobre o caráter sistêmico ou não da proteção	55
4.4. Efeito do tratamento com a levedura após a inoculação	58
4.5. Comparação entre a eficiência da proteção determinada por células vivas ou autoclava- das da levedura e seus filtrados	60
4.6. Efeito da levedura <i>S. cerevisiae</i> sobre o pa- tôgeno <i>H. vastatrix</i>	60
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
1	Esquema do procedimento de obtenção de amostras de células vivas ou autoclavadas de <i>S. cerevisiae</i> e seus filtrados.	43
2	Sintomas em folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, inoculadas com <i>H. vastatrix</i> .	54
3	Aspecto ao microscópio de fluorescência de células vivas de <i>S. cerevisiae</i> na superfície abaxial de folhas de cafeeiro.....	64
4	Aspecto ao microscópio de fluorescência de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i> após a germinação na superfície abaxial de folhas de cafeeiro	65

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
1	Proteção de plantas de café contra <i>H. vastatrix</i> pelo tratamento prévio das folhas com suspensões de <i>S. cerevisiae</i> em diferentes concentrações	53
2	Influência do intervalo de tempo entre o tratamento com <i>S. cerevisiae</i> e a inoculação com <i>H. vastatrix</i> , na proteção de plantas de café à ferrugem	56
3	Efeito de proteção local em folhas de café contra <i>H. vastatrix</i> pelo tratamento com <i>S. cerevisiae</i>	57
4	Efeito de <i>S. cerevisiae</i> na proteção de plantas de café a <i>H. vastatrix</i> , quando aplicado após a inoculação	59
5	Proteção determinada por células vivas ou autoclavadas de <i>S. cerevisiae</i> e seus filtrados	61
6	Proteção determinada por células vivas ou autoclavadas de <i>S. cerevisiae</i> e seus filtrados e o efeito sobre a germinação "in vitro", "in vivo", formação de apressórios e permanência, na superfície foliar, dos uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDR	-	República Federal da Alemanha
Bg	-	Filtro de cristal azul ("blau Glass")
BP	-	Filtro de passagem de banda de onda de luz de transmissão
cel/ml	-	células por mililitro
KG	-	filtro anti-calorífico ("Kalt Glass")
LP	-	Filtro de passagem de banda larga
mod.	-	Modelo
P	-	Peso
RKP	-	Filtro de reflexão de passagem de banda estreita
TRIS	-	Tris hidroxí-amino-metano
UV	-	Ultra-violeta
V	-	Volume

LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS

<u>Nome Científico</u>	<u>Nome vulgar</u>
<i>Arachis hypogaea</i> L.	amendoim
<i>Beta vulgaris</i> L.	beterraba
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i> L.	margarida-do-campo
<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat	crisântemo
<i>Citrullus vulgaris</i> L.	melancia
<i>Coffea arabica</i> L.	cafeeiro
<i>Cotoneaster</i> spp.	-
<i>Cucumis melo</i> L.	melão
<i>Cucumis sativus</i> L.	pepino
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	algodão
<i>Hordeum vulgare</i> L.	cevada
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	tomate
<i>Medicago sativa</i> L.	alfafa
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	fumo
<i>Oryza sativa</i> L.	arroz
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	feijão
<i>Pirus malus</i> L.	macieira
<i>Pisum sativum</i> L.	ervilha
<i>Prunus persicae</i> Batsch	pêssego
<i>Raphanus sativus</i> L.	rabanete
<i>Rosa</i> spp	roseira
<i>Solanum melongena</i> L.	beringela
<i>Solanum tuberosum</i> L.	batata
<i>Triticum aestivum</i> L.	trigo
<i>Vitis</i> spp	videira

Nome Científico

Agrobacterium radiobacter (Beijerinck & Van Delden) Conn
Agrobacterium tumefaciens (Smith & Townsend) Conn
Aphanocladium album (Preuss) W.Gams
Bacillus cereus subsp. *mycoides* (Fluegge) Smith
Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn
Bacillus thuringiensis Berliner
Botrytis cinerea Pers.
Cercospora arachidicola Hori
Chaetomium globosum Kunze ex. Fries
Cochliobolus sativus (Ito & Kurib) Drech ex. Dastur
Colletotrichum lagenarium (Pass.) Ell & Halst.
Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Megn.) Scrib
Colletotrichum trifoli Bain
Corynebacterium insidiosum (McCull) H.L.
Corynebacterium michiganense (E.F.Smith) Jensen
Erwinia amylovora (Burr.) Winslow et al.
Erwinia ananas pv. *uredovora* (Graham and Hodgkiss) Dye
Erwinia herbicola (Löhnis) Dye
Erysiphe graminis DC. ex. Mérat f.sp. *hordei* Marchal
Erysiphe graminis DC. f.sp. *tritici* Marchal
Exophiala jeanselmei (Langer) McGinnis & Padhye var.
lecanii-corni (Benedek & Specht) de Hoog
Fusarium spp
Fusarium oxysporum f.sp. *vasinfectum* (Atk) Snyder & Hansen
Helminthosporium oryzae Breda & Hann
Hemileia vastatrix Berkeley et Broome
Leptosphaeria nodorum Müller
Monilinia fructicola (Wint) Honey
Peronospora tabacina Adam
Phytophthora infestans (Mont.) de By.
Plasmopara viticola (de Bary) Berlese et de Toni
Pseudomonas cepacia Burkholder
Pseudomonas solanacearum (Smith) Dows

Nome Científico

Pseudomonas syringae Van Hall
Pseudomonas syringae pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie
Pseudomonas tabaci (Wolf & Foster) Stevens
Puccinia dianthi DC
Puccinia glomerata Grev.
Puccinia horiana P.Henn
Puccinia malvacearum Bert. ex.Mont
Pythium spp
Pythium oligandrum Drechsler
Rhizoctonia spp
Rhizoctonia cerealis Van der Hoeven
Rhizoctonia fragariae Husain & McKeen
Rhizoctonia solani Kühn
Rhizoctonia zeae Voorhees
Rhodotorula spp
Saccharomyces cerevisiae Meyen
Sclerotium rolfsii Sacc.
Serratia marcescens Bizio
Sporobolomyces spp
Sporobolomyces roseus Kluyver & V.Nul
Streptomyces griseus (Krainsky) Waksman & Henrici
Talaromyces flavus (Klocker) Stolk & Samson
Trichoderma koningii Oudem
Trichoderma hamatum (Bon.) Bainier
Trichoderma harzianum Rifai
Uromyces appendiculatus (Pers. ex.Pers.) Unger (= *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. var. *typica* Arth.)
Uromyces phaseoli (Pers.) Wint.
Venturia inaequalis (Cke) Wint.
Verticillium spp
Verticillium lecanii (Zimm) Viegas
Xanthomonas campestris pv. *manihotis* (Arthaud-Berthet) Starr

PROTEÇÃO DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CONTRA
Hemileia vastatrix BERK ET BR. POR *Saccharomyces cerevisiae* MEYEN

Autora: Dagmar Santos Roveratti

Orientador: Dr^a Walkyria Bueno de Camargo Moraes

RESUMO

Visando avaliar o potencial do microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* em proteger plantas de café (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) contra o patógeno *Hemileia vastatrix*, plantas de um ano de idade foram aspergidas com uma suspensão de células vivas ou autoclavadas da levedura, antes, simultaneamente ou depois da inoculação com o patógeno.

O efeito protetor de diferentes concentrações de *S. cerevisiae*, bem como a duração de tal efeito, também foram estudados.

Os efeitos do tratamento com suspensão de células vivas ou autoclavadas da levedura e seus respectivos filtrados sobre a germinação, formação de apressórios e persistência dos uredíniosporos do patógeno na superfície foliar foram observados por microscopia óptica ou de fluorescência.

Os resultados mostraram que a proteção de plantas de café por *S. cerevisiae* só se manifesta nos tratamentos realizados antes ou simultaneamente à inoculação com *H. vastatrix*. Nenhuma proteção foi observada nos tratamentos rea-

lizados depois da inoculação com o patógeno. A proteção observada é local, não existindo uma resposta de proteção sistêmica.

O maior efeito de proteção da levedura foi observado para concentrações de 20 mg/ml ou maiores, ficando ao redor de 70% de proteção em relação ao controle. A proteção se mantém nestes níveis no período que vai dos 4 dias a 2 semanas após o tratamento com a levedura, decrescendo gradativamente depois disto.

Nos tratamentos onde foram utilizadas células vivas ou autoclavadas da levedura, verificou-se uma inibição significativa da germinação "in vitro" e "in vivo", bem como um decréscimo acentuado do número de uredíniosporos do patógeno presentes na superfície das folhas de café. Paralelamente estes são os tratamentos que mostraram uma efetiva proteção das plantas à ferrugem.

Filtrados de células vivas ou autoclavadas da levedura mostraram um efeito pouco significativo sobre a germinação dos uredíniosporos, assim como sobre a permanência destes nas folhas, sendo que tais filtrados não foram eficientes em proteger as folhas de café contra ferrugem. Suspensão de células ou filtrados da levedura não afetaram a formação de apressórios do patógeno.

Os resultados sugerem que a proteção à ferrugem observada quando plantas de café são tratadas com *S. cerevisiae*, é devida basicamente a um efeito de controle bio-

lógico do patógeno pela levedura, podendo este efeito ser di
vidido em dois mecanismos distintos: o primeiro seria responsá
vel por uma diminuição do número de uredíniosporos do patóg
eno que permanecem na superfície das folhas e o outro por
uma inibição da germinação dos uredíniosporos restantes, pro
vavelmente por antibiose.

Nenhuma evidência foi verificada para sugerir
a hipótese do envolvimento de um mecanismo de indução de re-
sistência na proteção observada.

PROTECTION OF COFFEE PLANTS (*Coffea arabica* L.) AGAINST
Hemileia vastatrix BERK. ET BR. BY *Saccharomyces cerevisiae* MEYEN

Author: Dagnar Santos Roveratti

Adviser: Walkyria Bueno de Camargo Moraes

SUMMARY

In order to evaluate the potential capacity of *Saccharomyces cerevisiae* to protect coffee plants (*Coffea arabica* cv. "Mundo Novo") against the pathogen *Hemileia vastatrix*, one year-old plants were sprayed with a suspension of either living or autoclaved cells of *S. cerevisiae* before, simultaneously or after the challenger inoculation with the pathogen.

The protective effect of increasing concentrations of *S. cerevisiae* as well as the duration of such effect were also studied.

The effects of the treatment with living or autoclaved yeast cells and theirs respective filtrates in the urediniospores, appressorium formation and persistence of the urediniospores of the pathogen on the leaf surface were observed under optical or fluorescenc microscopy.

The results showed that protection of coffee plants by *S. cerevisiae* is only expressed in treatments where protectant was applied before or simultaneously with the

pathogen inoculation. No protection was observed in the treatments performed after the pathogen inoculation. Protection is locally evidenced and no systemic response was detected.

The highest effectiveness of the protectant was observed for concentrations of 20 mg/ml or higher, with a protection of at about 70% of the control. The protection persisted in this highest level during a period of time between 4 days and 2 weeks after the yeast treatment, decreasing gradually after that.

In treatments where living or autoclaved yeast cells were used, it was observed a significative "in vitro" and "in vivo" inhibition of germination of the urediniospores of the pathogen as well as a marked decrease in the number of spores present on the coffee leaves surface. These treatments also corresponded to the highest effectiveness in protecting plants against coffee leaf rust.

Living and autoclaved yeast cells filtrates showed only a slight effect on the urediniospores germination and in their persistence on the leaf surface. Yet, the mentioned filtrates were unable to protect coffee leaves against the pathogen. The appressoria formation was not affected neither by yeast cell suspensions nor by their filtrates.

The results strongly suggest that the protection against coffee leaf rust observed when plants were treated with *S. cerevisiae* is essentially due to a biological control

effect by the protectant and that there are two distinct mechanisms involved; one that leads to a decrease in the number of urediniospores present on the leaf surface and the other, that inhibits the germination of the remainder urediniospores probably by antibiosis.

No evidences were observed to support the hypothesis of an induced protection mechanism involved in the protective effect.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as várias doenças que atingem o cafeeiro (*Coffea arabica* L.), a ferrugem alaranjada causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley et Brome pode ser considerada a mais importante pelo menos no continente americano.

Esta doença está disseminada nas principais regiões produtoras de café do mundo, tendo determinado o colapso da indústria cafeeira em países como Sri Lanka, Filipinas e Indonésia, enquanto que em outros é responsável pelo investimento de grandes somas em dinheiro para programas de controle, melhoramento e pesquisas relacionadas (SHAW et alii, 1986).

Oficialmente o fungo *H. vastatrix* foi constatado pela 1ª vez em 1868 em cafezais do Ceilão, embora hajam relatos sobre a observação do fungo em 1861 em cafeeiros nativos perto do lago Vitória na Rhodesia (MONACO, 1977; BERGAMIN FILHO & PAIVA, 1983).

No Brasil, esta doença foi constatada pela 1ª vez em 1970 no Estado da Bahia (MEDEIROS, 1970) e apesar das medidas tomadas pelo Governo Federal, o Instituto Brasileiro

do Café e as Secretarias de Agricultura dos Estados para impedir ou retardar o avanço da doença, no mesmo ano ela atingiu a zona cafeeira do Sul de Minas, no ano seguinte foi constatada em São Paulo, disseminando-se para o Paraná e Mato Grosso. Em oito anos a doença já havia se alastrado por todo o Brasil alcançando países vizinhos como a Argentina e Paraguai em 1972, Perú e Bolívia em 1978 e 1979, e mais recentemente o Equador e a Colômbia em 1981 e 1983, respectivamente. Atualmente a ferrugem atinge todos os países produtores de café da América Latina (MONACO, 1977; SCHIEBER & ZENTMEYER, 1984).

A ferrugem do cafeeiro é uma doença tipicamente foliar. Os primeiros sintomas são pequenas manchas amareladas observadas na face inferior das folhas que aumentam de tamanho com o tempo, tornando-se recobertas por uma massa pulverulenta amarelo-alaranjada: os uredíniosporos do fungo. O efeito do fungo faz com que as folhas infectadas caiam prematuramente e quando esta desfolha ocorre, a posterior produção de grãos é afetada pois a planta não pode produzir carboidratos suficientes para a frutificação e maturação. Desta forma o impacto da ferrugem sobre a produção normalmente se faz sentir na safra do ano seguinte à infecção.

A perda de produção devido à ferrugem pode ser muito significativa o que leva os agricultores a efetuarem aplicações periódicas de fungicidas para controlar a doença pois, apesar dos programas de melhoramento, as variedades de

café mais cultivadas são, na maioria, suscetíveis às raças predominantes do patógeno.

A utilização de fungicidas requer equipamentos específicos além de mão-de-obra, fato que associado ao custo dos produtos, eleva muito as despesas de custeio da cultura.

Atualmente o custo adicional com o controle da ferrugem pode representar até 20% da despesa de custeio total enquanto que a perda na produção determinada pela doença não controlada atinge até 30% conforme avaliação do Instituto Brasileiro do Café (MATIELLO et alii, 1985).

A necessidade de se elevar a produção agrícola tem levado o homem a desenvolver produtos químicos cada vez mais eficientes no combate aos patógenos e pragas de diversas culturas. Com isto, outros problemas estão surgindo como a resistência dos patógenos aos produtos usados. No que se refere às doenças fúngicas, até 1970 os casos de resistência à fungicidas relatados no campo incluíam menos de 10 gêneros de fungos; em uma década este número aumentou para aproximadamente 35 gêneros fato que parece estar relacionado com o aprimoramento dos fungicidas sistêmicos mais específicos (KIMATI, 1987).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o comprometimento ambiental que advém do uso e abuso dos produtos químicos além dos efeitos nocivos ao próprio homem devido ao modo incorreto de utilização.

O alto custo, o aumento da resistência dos fitopatógenos e o impacto sobre o ambiente causados pelos produtos químicos, tem levado os fitopatologistas de todo o mundo a intensificarem as pesquisas na área de controle alternativo visando desenvolver processos mais naturais e menos comprometedores de controle de doenças. Entre estes métodos alternativos de controle estão a indução de resistência e o controle biológico.

A indução de resistência ou resistência induzida baseia-se numa ação sobre a planta hospedeira. Trabalhos de vários autores tem reforçado a hipótese de que plantas suscetíveis tem o potencial genético para expressar resistência, desde que devidamente estimuladas (SCHOENBECK et alii, 1980; KUČ, 1985; DEAN & KUČ, 1985). Esta resistência induzida que pode ser local ou sistêmica (TUZUN & KUČ, 1985a), é obtida pelo tratamento prévio das plantas com microrganismos não-patogênicos (SCHOENBECK et alii, 1980), raças incompatíveis do patógeno (OUCHI et alii, 1974), patógenos inativados (BELL & PRESLEY, 1969), pelos próprios patógenos (RICHMOND et alii, 1979) e por seus metabólitos (GUZZO et alii, 1987b). Alguns autores mostram que este tipo de proteção pode ser efetivo sob condições de campo (BALDER & SCHOENBECK, 1983; CARUSO & KUČ, 1977b) indicando sua possível aplicação no controle de doenças como alternativa ao controle químico tradicional.

O controle biológico baseia-se numa ação dire

ta sobre o patógeno. Neste caso um microorganismo antagônico impede o estabelecimento ou desenvolvimento do patógeno. Diferentes tipos de mecanismos antagônicos são conhecidos como a antibiose, o hiperparasitismo e a competição (BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982; COOK & BAKER, 1983). Em todos os casos a população do patógeno é afetada por ação do organismo antagônico o que pode determinar um controle efetivo da doença.

Desta forma a utilização de microorganismos ou seus metabólitos tem ampliado as perspectivas de um controle eficiente para diversas doenças de plantas quer pela indução de resistência ou pelo controle biológico.

Em café foi demonstrado que o tratamento prévio das plantas com diferentes fungos não-patogênicos e bactérias tem a capacidade de induzir resistência à *H. vastatrix* (MARTINS et alii, 1985). Em folhas destacadas de cafeeiro foi verificado que a aplicação do filtrado do extrato de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen induz resistência à *H. vastatrix* (MARTINS et alii, 1986). Outros autores demonstraram que este mesmo filtrado é um potente elicitor de fitoalexinas em soja (HAHN & ALBERSHEIM, 1978) e é sabido que a produção de fitoalexinas representa um dos vários mecanismos conhecidos para resistência à doenças em plantas (KUC, 1987).

Por outro lado, a levedura *S. cerevisiae* é um microorganismo amplamente utilizado industrialmente como fermento biológico para diversos fins o que torna possível sua obtenção em larga escala a um baixo custo.

Sendo assim, visando um método de controle da ferrugem do cafeeiro que associe baixo impacto ambiental com menores despesas de custeio, a presente dissertação tem por objetivos:

1. Avaliar o potencial do microorganismo *S. cerevisiae* comercial em proteger plantas de café à *H. vastatrix*;
2. Evidenciar se a proteção, caso observada, seria devida a um fenômeno de indução de resistência, controle biológico ou ambos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A observação de que plantas podem ser "imunizadas" por processos semelhantes àqueles usados para animais data do início do século. Entre os primeiros trabalhos referidos, está o de SMITH et alii (1911), onde os autores verificaram que margaridas do campo (*Chrysanthemum leucanthemum* L.) inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn tornavam-se resistentes a uma infecção posterior com o mesmo patógeno. Mais tarde BROWN (1923) observou, também em margaridas, que plantas tratadas com células mortas de *A. tumefaciens* e, um dia após, inoculadas no mesmo local com células vivas, não formavam tumores.

Este fenômeno tem sido denominado pré-imunização, proteção cruzada, resistência induzida ou indução de resistência. Para efeito desta revisão utilizar-se-ã preferencialmente os termos resistência induzida e indução de resistência.

Através do trabalho de diversos autores atual

mente está bem estabelecido que plantas previamente tratadas por patógenos, microorganismos não-patogênicos, raças não patogênicas de patógenos, patógenos mortos e outros agentes bióticos e abióticos podem tornar-se protegidas contra uma posterior inoculação com um microorganismo patogênico.

A indução de resistência através da utilização de patógenos tem sido demonstrada em vários trabalhos (CRUICKSHANK & MANDRYK, 1960; KUČ & RICHMOND, 1977; COHEN & KUČ, 1981; TUZUN & KUČ, 1985b). KUČ et alii (1975) verificaram que em plantas jovens de pepino (*Cucumis sativus* L.), a inoculação de uma folha com suspensão de conídios de *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. & Halst, protege a folha acima da infecção causada por uma inoculação posterior com o mesmo patógeno.

A literatura a respeito da indução de resistência por não patógenos também é bastante vasta (YARWOOD, 1956; ELLISTON et alii, 1976; MARTINS et alii, 1985). SCHOENBACK et alii (1980) analisaram aproximadamente 100 isolados não patogênicos de bactérias e fungos e encontraram que 15% são capazes de induzir resistência em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint.

A utilização de raças incompatíveis do patógeno na indução de resistência tem sido explorada por diversos autores (CARROL & LUKEZIC, 1972; SINHA & TRIVEDI, 1972; OUCHI et alii, 1974; SKIPP & DEVERAL, 1974; BAHAMISH & WOOD, 1985). OSTAZESKI (1984) observou que em plantas de alfafa

(*Medicago sativa* L.) suscetíveis à raça 2 de *Colletotrichum trifoli* Bain, a inoculação com a raça 1 à qual as plantas são resistentes, torna-as protegidas contra uma inoculação posterior com a raça 2. Em cevada (*Hordeum vulgare* L.) também foi observado que a inoculação de folhas com raças compatíveis e incompatíveis de *Erysiphe graminis* DC ex MÉRAT f.sp. *hordei* Marchal, protege as folhas contra uma infecção subsequente por raças compatíveis (CHO & SMEDGAARD-PETERSEN, 1986).

Patógenos mortos e outros microorganismos inativados por tratamento térmico, químico ou outros também podem induzir resistência (LOVREKOVICH & FARKAS, 1965; MCINTYRE et alii, 1973; MORAES et alii, 1976; PASCHOLATI et alii, 1986). LOZANO & SEQUEIRA (1970) verificaram que células termicamente inativadas de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) DOWS quando infiltradas em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), determinaram uma proteção das plantas ao patógeno vivo. CARROL & LUKEZIC (1972) demonstraram a indução de resistência em alfafa a *Corynebacterium insidiosum* (McCULL) H.L. JEMS pelo tratamento de pedaços de raízes e folhas de plantas suscetíveis com células mortas da mesma bactéria.

O efeito indutor de resistência de extratos ou metabólitos de microorganismos tem sido estudado por alguns autores (TRIVEDI & SINHA, 1976; BERETTA et alii, 1977; MARTINS et alii, 1986; GUZZO et alii, 1987b). SINHA & TRIVEDI (1972) demonstraram em arroz (*Oryza sativa* L.) a indução de resistência à *Helminthosporium oryzae* Breda de Hann pelo

tratamento de plantas com sobrenadante do meio de germinação dos esporos do próprio patógeno. WELTZIEN & KETTERER (1986) relatam que o extrato aquoso de misturas de solo, esterco e palha induziram um aumento de resistência à *Plasmopara viticola* (de Bary) Berlese et de Toni em folhas de videira (*Vitis* spp.). Estes extratos não tiveram um efeito fungicida ou fungitóxico direto e os autores sugerem a presença de metabólitos de microorganismos de solo. DOKE et alii (1987) verificaram que componentes da parede celular do fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) de By. induzem resistência em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) ao mesmo fungo.

Com o decorrer dos trabalhos na área de indução de resistência, logo ficou evidenciada a natureza local (LITTLEFIELD, 1969; ELLISTON et alii, 1971; ELLISTON et alii, 1976; SULE, 1988) e/ou sistêmica deste fenômeno (HUBERT & HELTON, 1967; KUČ et alii, 1975; ELLISTON et alii, 1976; KUČ & RICHMOND, 1977; JENNS et alii, 1979; TUZUN & KUČ, 1985a; DEAN & KUČ, 1986; HELLER & GESSLER, 1986).

A resistência induzida localmente é aquela que se manifesta nos tecidos onde foi aplicado o indutor, na área imediatamente adjacente ao local de penetração pelo patógeno e segundo SEQUEIRA (1983) é frequentemente associada à reação de hipersensibilidade: morte celular restrita à área de penetração, acompanhada normalmente por um rápido acúmulo de fitoalexinas nos tecidos em contacto ou adjacentes ao patógeno.

Já a resistência induzida sistemicamente em geral, é posterior à resistência localizada e se desenvolve no hospedeiro em pontos distantes do local da aplicação do indutor de resistência. O acúmulo de fitoalexinas não é suficiente para explicar a resistência sistêmica uma vez que estas substâncias dificilmente são detectadas nos tecidos sistemicamente protegidos e não inoculados. A resistência induzida sistêmica estaria relacionada com outras respostas da planta que não o acúmulo de fitoalexinas e seria dependente de um "sinal" químico emitido pelas células a partir do ponto da aplicação do indutor que sensibilizaria tecidos distantes do hospedeiro para responder rapidamente quando inoculados (DEAN & KUČ, 1985). JENNS & KUČ (1979) observaram que, em pepino, o sinal para imunização pode ser transmitido do porta-enxerto com resistência induzida para o enxerto, tornando-o também protegido. TUZUN & KUČ (1985b) observaram que, em fumo, o fator ou sinal de resistência induzida pela inoculação dos caules das plantas com esporângios do patógeno *Peronospora tabacina* Adams, foi transmitido por enxertia: enxertos induzidos transferidos para porta enxertos não induzidos desenvolveram plantas sistemicamente protegidas contra o patógeno.

Vários trabalhos também demonstraram que em cucurbitáceas a remoção, após algumas horas, das folhas induzidas não reduz a resistência sistêmica observada nas outras partes da planta e que folhas sistemicamente protegidas

permanecem protegidas mesmo após terem sido retiradas da planta (KUČ & RICHMOND, 1977; CARUSO & KUČ, 1979; JENNS & KUČ, 1980).

Os resultados destes trabalhos vem indicar que a resistência sistêmica parece ser dependente, portanto, de um sinal químico que é transportado a partir da folha induzida.

Uma vez que a resistência induzida sistêmica pode ser efetiva contra fungos, bactérias e vírus, fica evidente que esta proteção envolve a combinação de vários mecanismos de defesa tais como lignificação da parede celular, aumento de atividades enzimáticas, deposições químicas da parede, produção e acúmulo de novas proteínas como as PR-proteínas ("pathogenesis-related proteins").

HAMMERSCHMIDT et alii (1982) e HAMMERSCHMIDT & KUČ (1982) observaram uma correlação da lignificação da parede celular e do aumento da atividade da peroxidase com a resistência induzida sistemicamente em folhas de pepino.

MÉTRAUX & BOLLER (1986) demonstraram que, em pepino, ocorre um aumento local e sistêmico de quitinase em resposta à inoculação com vários patógenos e que esta indução de quitinase está correlacionada com a indução de resistência sistêmica contra *C. lagenarium*.

CLOUD & DEVERAL (1987) relataram que o desenvolvimento dos sintomas de antracnose nas folhas trifoliadas de feijão inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc

& Megn) Scrib. foi bastante restringido quando as folhas primárias da mesma planta foram anteriormente inoculadas com o mesmo patógeno; nas plantas pré-inoculadas, a penetração dos esporos da 2ª inoculação foi inibida e ocorreram com maior frequência deposições na parede e granulação nuclear nas células do tecido hospedeiro próximas aos locais de penetração.

Uma das principais características da resistência induzida quer local, quer sistemicamente, é a dependência de um certo intervalo de tempo entre o tratamento indutor e a inoculação com o patógeno. Isto é facilmente explicável uma vez que este tipo de resistência envolve mecanismos de respostas que precisam ser acionados no tecido hospedeiro. Em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) foi verificado que a pré-inoculação com um "strain" não-patogênico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (AtK) Snyder & Hansen, protege as plantas contra os efeitos de um "strain" patogênico do mesmo fungo e que embora a proteção tivesse sido observada duas horas após a aplicação do indutor, ela só atingiu o máximo quando o intervalo de tempo entre as duas inoculações foi de 24 horas (HILLOCKS, 1986).

Outros trabalhos também demonstraram que existe uma relação da concentração tanto do indutor como do inoculo com a resistência induzida observada. LOVREKOVICH & FARKAS (1965) demonstraram que a infiltração de células termicamente inativadas de *Pseudomonas tabaci* (Wolf & Foster) Stevens em plantas de fumo, nas concentrações de 10^5 e 10^7 cel/

ml, determinaram uma proteção parcial contra células vivas da mesma bactéria; a proteção foi total quando se utilizou a concentração de 10^9 cel/ml.

THORDAL-CHRISTENSEN & SMEDEGARD-PETERSEN (1988) verificaram que a indução de resistência em cevada à *E. graminis* f.sp. *hordei*, por raças virulentas e avirulentas deste patógeno se expressa 2 horas após a inoculação indutora aumentando gradualmente até 10-20 horas e é dependente da concentração do indutor.

SULE (1988) verificou que em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) vários patovares de *Pseudomonas syringae* Van Hall induzem proteção local contra cancro bacteriano causado por *Corynebacterium michiganense* (E.F. Smith) Jensen. Porém, somente células vivas das bactérias numa concentração mínima de 10^6 cel/ml são capazes de induzir proteção; suspensões de células na concentração de 10^3 cel/ml não são efetivas.

A resistência induzida seja local ou sistêmica tem baixa especificidade com relação à sua indução e ação, ambas podendo ser elicitadas e agir indiferentemente sobre fungos, vírus e bactérias (KUČ, 1985), o que é amplamente comprovado pelos inúmeros trabalhos referidos nesta revisão. Assim é que diferentes microorganismos induzem a resposta de proteção bem como seus metabólitos e até componentes abióticos e esta ausência de especificidade também se reflete no amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta pode ser protegida.

Além da baixa especificidade, outro fator que amplia as possibilidades de se utilizar a indução de resistência como método alternativo de controle de doenças, é o fato de que este fenômeno pode ser razoavelmente persistente (LITTLEFIELD, 1969; TUZUN & KUČ, 1985a). ROSS (1961) verificou que a inoculação de TMV (vírus do Mosaico do Fumo) em variedades de fumo que apresentam reações de hipersensibilidade a esse vírus, determinou uma resistência sistêmica que foi máxima após 7 dias da inoculação indutora mantendo-se por até 20 dias. KUČ & RICHMOND (1977) trabalhando com pepino, observaram que a inoculação da primeira folha verdadeira com *C. lagenarium* quando a 2ª folha não estava ainda totalmente expandida, protegeu as plantas sistemicamente por 4 a 5 semanas; uma segunda inoculação feita 3 semanas após a primeira, estendeu a proteção por todo o período de frutificação da planta.

TUZUN & KUČ (1987) observaram que plantas de fumo originadas por cultura de tecido a partir de folhas induzidas contra *P. tabacina*, permaneceram sistemicamente protegidas contra o patógeno. Estes resultados sugerem a possibilidade de uma alteração permanente na expressão do genoma da planta no que se refere à resistência.

Estas diversas constatações a respeito da indução de resistência tem levado alguns pesquisadores a explorar o potencial da resistência induzida para controle de doenças à nível de campo (BALDER & SCHOENBECK, 1983; TUZUN

et alii, 1986). CARUSO & KUČ (1977b) verificaram que a proteção de plantas de pepino, melão (*Cucumis melo* L.) e melancia (*Citrullus vulgaris* L.) contra *C. lagenarium*, pela prévia inoculação com esporos do mesmo fungo se expressava em condições de campo igualmente bem ao observado em laboratório (KUČ et alii, 1975; CARUSO & KUČ, 1977a; KUČ & RICHMOND, 1977).

DEHNE et alii (1984) demonstraram que, sob condições de campo, tratamentos de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) com indutores de resistência produzidos por *Bacillus subtilis* (Erhenberg) Cohn, determinaram uma alta resistência das plantas à *Erysiphe graminis* DC f.sp. *tritici* Marchal. Observaram ainda que, nas plantas induzidas, a reprodução do patógeno foi reduzida consideravelmente com diminuição da intensidade de esporulação e menos formação de cleistotécios que tornaram-se menores e com poucos ascos.

No que se refere ao cafeeiro, MORAES et alii (1976) verificaram que plantas suscetíveis podem ser protegidas contra o fungo *H. vastatrix* pelo tratamento prévio com uma suspensão de uredíniosporos do mesmo fungo, termicamente inativados. Mais tarde, BERETTA et alii (1977) observaram que mesmo o filtrado da suspensão destes uredíniosporos termicamente inativados foi capaz de induzir proteção à *H. vastatrix* em folhas de cafeeiro suscetíveis e que a proteção era tanto local como sistêmica. MARTINS et alii (1985) verificaram que o mesmo efeito indutor de resistência à *H. vastatrix* pode ser obtido pelo tratamento das plantas de café com sus

pensões de esporos ou células de vários fungos e bactérias indicando a natureza inespecífica desta indução. MARTINS et alii (1986) relatam que a aplicação de filtrado de fermento (*S. cerevisiae*) em folhas destacadas suscetíveis, 72 horas antes da inoculação com uredíniosporos de *H. vastatrix*, induziu resistência ao patógeno; o tratamento não afetou a germinação dos uredíniosporos nem a formação de apressórios do patógeno. Recentemente, ROVERATTI et alii (1987; 1989) demonstraram ser possível induzir resistência à *H. vastatrix* em cafeeiros suscetíveis, pelo tratamento das plantas com produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner ou pela cultura pura da bactéria em meio de cultivo; verificou-se uma proteção de efeito sistêmico com duração de até 5 semanas. Diante dos resultados os autores chamam a atenção para uma possível aplicação em campo.

2.2. CONTROLE BIOLÓGICO

O termo "Controle Biológico" relacionado ao controle de doenças, em plantas, foi proposto pela primeira vez por SANFORD & BROADFOOT, em 1931; (in COOK & BAKER, 1983) sendo que os primeiros esforços para a aplicação direta do controle biológico de patógenos de plantas foram feitos entre 1920-1940 (COOK & BAKER, 1983).

"Controle Biológico" tem sido diferentemente

conceituado por diversos autores. De uma forma geral, define-se como controle biológico o "uso pelo homem de qualquer organismo para controlar patógenos ou pragas". Segundo COOK & BAKER (1983), "controle biológico consiste na redução da quantidade de inóculo ou atividade produtora de doença de um patógeno, determinada por ou através de um ou mais organismos que não o homem". Para estes autores, como atividades produtoras de doença estariam incluídas: crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras qualidades do patógeno ou processos que determinem infecção, desenvolvimento de sintomas e sua reprodução. Desta forma, o objetivo do controle biológico de fitopatógenos seria a redução da doença pela redução do inóculo do patógeno através da diminuição de sua sobrevivência entre as culturas ou diminuição da produção e/ou liberação de propágulos viáveis, pela redução da infecção do hospedeiro pelo patógeno, ou ainda pela redução da severidade do ataque pelo patógeno.

O controle biológico está baseado na atividade antagônica ou predadora de um organismo sobre o outro. Este antagonismo pode ser direto ou indireto caso se trate de uma ação direta sobre o patógeno ou de uma ação que determine condições desfavoráveis ao patógeno, respectivamente.

Para os fitopatologistas, antagonistas são agentes biológicos com o potencial de interferir negativamente no processo de vida de patógenos de plantas e incluem principalmente microorganismos como fungos, bactérias e vírus,

porém outros organismos como nemátodos e protozoários também podem ser considerados.

Entre microorganismos considera-se que existam três tipos de antagonismo: antibiose, competição e parasitismo (BAKER & COOK, 1976; BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982; COOK & BAKER, 1983). Porém, um mesmo antagonista pode utilizar mais de uma forma de antagonismo relacionando sua ação com mais de um mecanismo.

Antibiose seria a destruição ou inibição de um organismo por um produto metabólico de outro. Este tipo de efeito tem sido verificado por diversos autores.

BAKER et alii (1983) verificaram que dois isolados de *B. subtilis*, um isolado de *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* (Fluegge) Smith, *B. thuringiensis* e *Erwinia ananas* pv. *uredovora* (Graham and Hodgkiss) Dye podem controlar a ferrugem causada por *U. phaseoli* quando aplicados em plantas jovens de feijão. Os autores verificaram que entre estas bactérias a mais eficiente foi um dos isolados de *B. subtilis* o qual, quando aplicado nas plantas de feijão antes da inoculação com o patógeno, determinou uma redução de mais de 95% no número de lesões de ferrugem. Nas folhas tratadas com este isolado, a observação ao microscópio demonstrou que a germinação dos uredosporos de *U. phaseoli*, foi bastante reduzida ocorrendo, também, o desenvolvimento de tubos germinativos atípicos. Testes "in vitro" também demonstraram uma inibição da germinação dos uredosporos do patógeno. A puri-

ficação parcial do filtrado de cultura da bactéria demonstrou que o efeito inibidor sobre a germinação de *U. phaseoli* e consequente redução da severidade da doença nas plantas de feijão, era devido a um produto metabólico do *B. subtilis*.

Outros autores também verificaram que substâncias antibióticas produzidas por um "strain" do *B. subtilis* em meio de cultura são ativas contra vários fungos fitopatogênicos "in vitro"; tanto a bactéria como o extrato do meio de cultura contendo as substâncias antibióticas determinam supressão dos sintomas de podridão marrom causada por *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey quando aplicados em frutos de pêssogo (*Prunus persicae* Batsch). Aparentemente o efeito destas substâncias antifúngicas se faz sobre a germinação dos esporos e crescimento das hifas (McKEEN et alii, 1986). LOEFFLER et alii (1986) verificaram que a inibição dos sintomas em plântulas de arroz infectadas com *Rhizoctonia solani* Kühn, determinada por um isolado de *B. subtilis* ("strain" F-29-3) é principalmente devida à ação do antibiótico fengimicina produzido por este bacilo.

O controle da murcha de *Verticillium* spp em beringela (*Solanum melongena* L.) por *Talaromyces flavus* (Klücker) Stolk & Samson parece estar associado à perda de viabilidade dos microescleródios do patógeno mediada pela ação de um metabólito de *T. flavus*, identificado como uma glucose oxidase (MAROIS et alii, 1982; FRAVEL et alii, 1987; KIM et alii, 1988).

ISENBECK & SCHULZ (1985) demonstraram que o controle da queima causada por *Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al. em plantas ornamentais, pode ser obtido pelo tratamento prévio das plantas com bactérias saprofíticas antagonicas isoladas a partir de arbustos ornamentais suscetíveis ao patógeno. Posteriormente os mesmos autores verificaram que a atividade inibidora "in vitro" dos isolados das bactérias saprofíticas, está associada à produção de um metabólito de baixo peso molecular, solúvel em água e metanol, estável ao aquecimento e ativo apenas sob condições ácidas. A aplicação deste metabólito em uma rosácea ornamental, reduziu a incidência de queima porém em menor grau do que a redução obtida pela aplicação dos antagonistas vivos. Os autores sugerem a necessidade das bactérias estarem permanentemente sintetizando o composto antibiótico (ISENBECK & SCHULZ, 1986).

Foi verificado que a severidade da sarna da macieira (*Pirus malus* L.) pode ser reduzida quando ascósporos de *Chaetomium globosum* Kunze ex. Fries são aplicados às folhas de macieira simultaneamente com conídios do patógeno *Venturia inaequalis* (CKe) Wint. Ascósporos de *Chaetomium* mortos por aquecimento controlam a sarna da macieira tão bem quanto ascósporos vivos, porém nenhum efeito é observado quando os ascósporos são aplicados posteriormente ao patógeno. Também foi verificada uma atividade inibitória "in vitro" dos extratos de cultura de *C. globosum* sobre *V. inaequalis*. Os autores sugerem que antibióticos provenientes dos ascósporos

de *C. globosum* podem se difundir passivamente na superfície da folha, impedindo a infecção por *V. inaequalis* (ANDREWS et alii, 1983; BOUDREAU & ANDREWS, 1987).

A competição como mecanismo antagônico aplicado ao controle biológico tem sido estudada por alguns autores principalmente em interações microbianas no solo.

Competição seria o esforço de dois (ou mais) microorganismos para adquirir a quantidade necessária de um suprimento a partir de um substrato onde este suprimento não é suficiente para ambos. A competição entre microorganismos é principalmente por nutrientes (carboidratos, nitrogênio, fatores de crescimento), espaço (sítios de infecção) e oxigênio.

ELAD & BAKER (1985) observaram que no controle biológico de *Fusarium* spp por pseudomonas fluorescentes, existe uma correlação da inibição da germinação dos clamidoporos do patógeno no solo com a produção de sideróforos pelas bactérias, sendo que esta inibição é revertida adicionando-se ferro ao sistema o que indica o envolvimento da competição por ferro neste mecanismo. Por outro lado, um mutante não produtor de sideróforos, também inibe em menor escala a germinação de isolados de algumas espécies de *Fusarium* sugerindo uma competição por outro nutriente essencial para a germinação dos propágulos, tal como o carbono.

ELAD & CHET (1987) observaram que de 130 bactérias isoladas da rizosfera de plantas infectadas com *Py-*

thium spp, seis são eficientes como agentes de controle biológico deste patógeno em condições de casa de vegetação, tendo sido obtida uma redução da doença que variou de 60 a 90% dependendo da planta hospedeira. Os autores observaram, ainda, uma correlação da diminuição da doença com um decréscimo na germinação dos oosporos do patógeno, determinado provavelmente pela competição por nutrientes entre as bactérias e os oosporos em germinação.

O controle biológico de patógenos de solo por espécies de *Pseudomonas* fluorescentes tem sido estudado por alguns autores e parece estar relacionado com a produção de sideróforos por estas bactérias e a consequente competição por ferro (SNEH et alii, 1984; BECKER & COOK, 1988; PARK et alii, 1988). Sideróforos são compostos fluorescentes que se ligam a ions de ferro, tornando este elemento menos disponível para aqueles microorganismos que não produzem semelhantes agentes transportadores de ferro (COOK & BAKER, 1983).

A competição por sítios de infecção (espaço) também tem sido evidenciada em alguns casos de controle biológico. DU PLESSIS et alii (1985) estudando a habilidade do "strain" K84 de *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck & Van Delden) Conn, produtor de agrocin-84, em controlar "strains" patogênicos de *Agrobacterium* spp, verificaram que nem sempre existe uma correlação do controle biológico observado "in vivo" com a sensibilidade "in vitro" dos "strains" patogênicos à agrocin 84. Assim, alguns "strains" insensíveis à agroci

na 84 podem ser controlados na planta pelo "strain" K84 indicando a existência de outro mecanismo que não a sensibilidade à agrocina. Os autores sugerem que nestes casos o bloqueio físico dos sítios de infecção pelo "strain" K84 possa estar envolvido.

HATTINGH et alii (1986) estudando o controle de *E. amylovora* por dois "strains" de *Erwinia herbicola* (Löh-
nis)Dye, observaram através de microscopia de varredura que em flores de macieira, o "strain" de *E. herbicola* que efetivamente inibe o crescimento de *E. amylovora*, multiplica-se preferencialmente na superfície do estigma ocupando o mesmo nicho que *E. amylovora*. O antagonismo é observado quando *E. herbicola* é aplicado pelo menos um dia antes do patógeno *E. amylovora*. Através destas observações os autores sugerem que o antagonista previne o estabelecimento do patógeno por impedir o acesso deste aos sítios de infecção.

Alguns antagonistas tem relação parasítica com o patógeno. O **parasitismo** é uma relação nutricional na qual um organismo, o parasita, retira tudo ou parte do que necessita a partir de partes funcionais vivas de outro organismo, o hospedeiro. Quando esta relação envolve um hospedeiro que por sua vez também é parasita de uma terceira espécie de organismo, falamos em **hiperparasitismo**.

Estudos de diversos autores tem enfocado o hi
perparasitismo como um mecanismo eficiente no controle biológico de patógenos de plantas (HOCH & ABAWI, 1979; FILONOW & LOCKWOOD, 1985; MITCHELL & TABER, 1986).

TU (1988) estudando a ação antagônica de *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman & Henrici, sobre *C. lindemuthianum*, verificou que *S. griseus* em meio de cultura produz uma substância que atua sobre *C. lindemuthianum*. Porém, a microscopia de varredura também revelou que quando as hifas de *S. griseus* entram em contato com hifas de *C. lindemuthianum*, o primeiro produz estruturas semelhantes a apressórios ou simplesmente cresce na superfície das hifas do segundo, ocorrendo parasitismo interno.

SRIVASTAVA et alii (1985) analisando os hiperparasitas de ferrugens, *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas e *Aphanocladium album* (Preuss) W.Gams verificaram que ambos são capazes de infectar de 90 a 95% dos teliosporos de *Puccinia horiana* P.Henn, quando aplicados a folhas de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) infectadas por este patógeno. Cinco dias após a aplicação dos hiperparasitas, os télios de *P. horiana* nas folhas de crisântemo apresentaram-se completamente colonizados por micélio dos hiperparasitas, sendo que o desenvolvimento destes se restringiu às regiões infectadas da folha por ferrugem. Tecidos sadios não foram colonizados. Os dois hiperparasitas também penetraram nos teliosporos de outras ferrugens como *Puccinia dianthi* DC, *Puccinia malvacearum* Bert ex Mont e *Puccinia glomerata* Grev, porém com menor frequência. Em todos os casos a penetração dos teliosporos se deu através do poro germinativo do esporo.

Nas interações antagônicas frequentemente é observada lise do patógeno. **Lise** é um termo geral para destruição, desintegração ou decomposição de materiais biológicos. Pode resultar de uma antibiose, de uma competição (enfraquecimento e posterior lise celular), ou de um parasitismo necrotrófico (ação de enzimas que digerem materiais do patógeno).

A ação lítica de alguns hiperparasitas tem sido observada por diversos autores. O fungo *V. lecanii* é um hiperparasita de grande interesse no controle biológico de patógenos do grupo das ferrugens e seu mecanismo de ação inclui a degradação da parede celular dos esporos do patógeno como consequente "lise", fato que pode ser observado citologicamente. Filtrados de cultura deste hiperparasita contêm numerosas enzimas líticas incluindo quitinases (MENDGEN, 1981; GRABSKI & MENDGEN, 1986).

LIFSHITZ et alii (1986) estudando o mecanismo do controle biológico de tombamento em ervilha (*Pisum sativum* L.) pelo tratamento das sementes com *Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma koningii* Oudem, verificaram que os antagonistas produzem um fator que determina a plasmólise de células das hifas de *Pythium* spp, sendo provavelmente a antibiose o mecanismo mais importante no controle biológico observado.

Usando sementes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) recobertas com micélio de *R. solani*, *Rhizoctonia cerealis* Van

der Hoeven e *Rhizoctonia fragariae* Husain & McKeen obteve-se um controle biológico de tombamento causado por *Pythium oligandrum* Drechsler tanto em solos natural como artificialmente infectados. Em meio de cultura foi observado que as três espécies de *Rhizoctonia* causam vacuolação, desaparecimento do citoplasma e lise das hifas de *P. oligandrum*. Os estudos "in vitro" indicam que o mecanismo antagônico operante pode resultar da atividade celulolítica de *Rhizoctonia* spp sobre *P. oligandrum* (WALTER & GINDRAT, 1987).

A bactéria *Serratia marcescens* Bizio, isolada a partir da rizosfera de plantas de feijão crescidas em solo infestado com *Sclerotium rolfsii* Sacc. é efetiva como agente de controle biológico contra este patógeno. Foi verificado que *S. marcescens* libera uma enzima quitinolítica quando crescida em diferentes polímeros como quitina, laminarina ou parede celular de *S. rolfsii* utilizados como fonte de carbono. Estudos de microscopia de varredura mostraram uma degradação direta de hifas quando micélio de *S. rolfsii* é usado como fonte de carbono para a bactéria sendo aparente, portanto, que a habilidade lítica de *S. marcescens* representa um mecanismo importante no controle biológico do fitopatógeno *S. rolfsii* (ORDENTLICH et alii, 1988).

Existem numerosos trabalhos a respeito do uso de microorganismos antagônicos para controlar doenças de plantas e a maioria destes estudos se referem às interações microbianas com patógenos no solo e sementes. Relativamente pou-

cos pesquisadores tem procurado estudar o potencial do controle biológico para patógenos do filoplano.

As superfícies das partes aéreas das plantas são um habitat para inúmeros microorganismos epifíticos, muitos dos quais são capazes de influenciar o crescimento de patógenos (BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982) e o controle biológico por estes microorganismos saprofíticos tem sido enfatizado por alguns autores.

LUZ (1985) demonstrou que em condições controladas, organismos neutros isolados do filoplano de trigo como *Sporobolomyces roseus* Kluyver & V.Nul, *Rhodorotula* spp e *Sporobolomyces* spp reduziram eficientemente as infecções foliares em trigo causadas por *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib) Drech ex Dastur e *Leptosphaeria nodorum* Müller. O autor indica que o efeito destas leveduras sobre os patógenos parece ser devido à competição por nutrientes na superfície foliar.

REDMOND et alii (1987) avaliaram o potencial de fungos e bactérias epifíticas isolados de pétalas de rosa (*Rosa* spp), como agentes de controle biológico da queima de rosas causada por *Botrytis cinerea* Pers. Foi verificado em avaliações preliminares que dos microorganismos isolados, quatro possuíam a habilidade de reduzir o número de lesões causada por *B. cinerea* em rosas, quando aplicados a rosas cortadas, um dia antes da inoculação com o patógeno. Destes microorganismos, o mais efetivo foi uma levedura, *Exophiala jeanselmei* (Langer) McGinnis & Padhye var. *lecanni-corni* (Bene-

dek & Specht) de Hoog, que determinou um nível de controle igual ao obtido pelo fungicida iprodione. Os autores sugerem a competição por nutrientes exógenos como um mecanismo possível para o controle biológico observado.

Apesar dos exemplos com sucesso de antagonismo em folhas, as observações sobre o controle biológico de patógenos foliares no campo tem sido bastante raras.

BAKER et alii (1985) demonstraram que, em condições de campo, a severidade da ferrugem do feijão causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers. ex Pers.) Unger (= *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. var. *typica* Arth.) foi reduzida em 75% pela aplicação de *B. subtilis* três vezes por semana. Foram testados dois isolados da bactéria sendo que um deles, além de promover o controle da doença, estimulou o crescimento das plantas reduzindo sua produção. Em certos tratamentos, a aplicação da bactéria 3 vezes por semana determinou um controle da doença equivalente à aplicação semanal do fungicida mancozeb.

COLIN & CHAFIK (1986) verificaram que a mancha bacteriana em tomate causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie, foi parcialmente controlada no campo pela aplicação semanal de duas *Pseudomonas* antagônicas ao patógeno. O nível de proteção obtida foi correspondente ao verificado com o tratamento de compostos cúpricos, indicando o potencial deste método no controle de doenças.

KNUDSEN & SPURR (1987) avaliaram o potencial de cinco preparações de bactérias liofilizadas em controlar, no campo, a mancha foliar do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) causada por *Cercospora arachidicola* Hori. As bactérias utilizadas como agentes de controle biológico foram: *B. thuringiensis* (HD-1), *B. thuringiensis* (HD-521), *B. cereus* var. *mycoides* e *Pseudomonas cepacia* Burkholder. As preparações liofilizadas destas bactérias foram aplicadas às folhas de amendoim a cada 2 semanas e foi observado que a curva de desenvolvimento e a severidade da doença no final da estação de crescimento foram significativamente mais baixas que nos controles não tratados. O tratamento com as bactérias, porém, foi menos eficiente que a aplicação do fungicida químico clorotalonil.

Na execução de alguns trabalhos sobre controle biológico, foi verificado que nenhuma atividade antagônica sobre o patógeno era observada. ICHIELEVICH-AUSTER et alii (1985) verificaram que um isolado não patogênico de *R. solani* protege plântulas de algodão, trigo e rabanete (*Raphanus sativus* L.) contra tombamento causado por isolados virulentos de *R. solani* e *Rhizoctonia zeae* Voorhees. Plantas crescidas em solos infestados pelo isolado não patogênico e, então, transferidas para solos infestados com os isolados patogênicos, permaneceram protegidas. Nenhum efeito de antibiose ou hiperparasitismo foi observado. Isto sugere uma ação sobre a planta do tipo de indução de resistência ou proteção cruzada.

Na proteção de plântulas de feijão contra a podridão de raiz causada por *Rhizoctonia* spp foi verificado que o tratamento com um fungo binucleado do tipo *Rhizoctonia* (BNR) antes da inoculação com o patógeno, determinou uma diminuição da doença. Nenhuma interação antagônica entre os dois microorganismos foi verificada "in vitro" e as plântulas de feijão se mantiveram protegidas mesmo quando o BNR foi retirado por uma esterilização superficial. Os resultados sugerem que o mecanismo de proteção neste sistema envolve uma resposta metabólica da planta que suprime o patógeno no sítio de infecção, resposta esta característica dos fenômenos de indução de resistência (CARDOSO & ECHANDI, 1987).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico em São Paulo/SP.

3.1. PLANTA HOSPEDEIRA

Foram utilizadas plantas de café suscetíveis à ferrugem (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) de um ano de idade, com 8 a 10 pares de folhas, aproximadamente. Estas plantas foram obtidas a partir de sementes provenientes da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas/SP e da Cooperativa dos Cafeicultores de Garça/SP. As sementes foram inicialmente colocadas para germinar em leito de areia contida em recipientes (1,20 x 0,80 x 1,0 m) cobertos com tampa de vidro, permanecendo em condições ambientais por volta de 3-4 meses quando, então, atingiram o estágio "orelha de onça" (aparecimento da folha primária). As plantinhas foram transferidas para sacos plásticos de 10 cm de diâmetro por 20 cm

de altura contendo uma mistura de solo, esterco de galinha, H_2PO_5 , KCl e $CaCO_3$ (100g: 1g: 0,5g: 0,1g: 0,1g; p/p/p/p/p) e mantidas em casa-de-vegetação, em condições ambiente, Mensalmente as plantas receberam uma solução nutritiva contendo $(NH_4)_2SO_4$, H_2PO_5 e KCl (2,5g: 5g: 1g: 1 litro de água; p/p/p/v).

3.2. PATÓGENO

Foram utilizados urediniosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., com predominância de raça II, coletados de lesões jovens em folhas de plantas de café (*C. arabica* cv. Mundo Novo) naturalmente infectadas no campo.

Os urediniosporos foram retirados das lesões pela raspagem cuidadosa das mesmas com tubo de polietileno. Uma vez coletados os urediniosporos foram peneirados (peneira Granutest; 0,149 mm) e estocados em nitrogênio líquido ($-196^\circ C$), dentro de criotubos, até o uso.

3.3. MICROORGANISMO ANTAGÔNICO OU INDUTOR DE RESISTÊNCIA

Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen na forma de fermento biológico comercial (fermento de padaria) produzido por Fleischmann e Royal Produtos Ali-

mentícios Ltda., adquirido no comércio local em embalagens de 20g cada e mantido sobre refrigeração (4°C) até o uso.

3.4. PREPARO DO INÓCULO

Os uredíniosporos de *H. vastatrix* foram utilizados na forma de suspensão em água destilada estéril na concentração de 2 mg/ml.

Os uredíniosporos foram retirados do nitrogênio líquido e, ainda dentro dos criotubos fechados, imediatamente transferidos para banho-maria em água a 40°C, durante 10 minutos (choque térmico). Em seguida, os esporos foram adicionados a um erlenmeyer contendo água destilada estéril e a suspensão submetida primeiramente a uma agitação por 10 minutos em placa agitadora magnética (IKA-WERK, mod. ES5), a ultra-som (SONOREX; mod. RK103) por 30 segundos (50 Hertz) e novamente à agitação por 5 minutos em placa agitadora magnética.

3.5. INOCULAÇÃO

A suspensão de uredíniosporos preparada como descrito no item 3.4, foi aplicada à superfície abaxial das folhas de plantas de café por aspersão, durante 5 segundos,

usando nitrogênio gasoso como propelente (pressão 0,5 bars). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de condições controladas durante 48 horas, no escuro, à 24° C de temperatura e 95% de umidade relativa. Em seguida, foram transferidas para um regime de fotoperíodo de 12 horas com iluminação de 4.000 lux, no topo da planta, 24°C de temperatura e 80% de umidade relativa, permanecendo nestas condições até o aparecimento dos sintomas (25-30 dias).

3.6. PREPARO E APLICAÇÃO DO MICROORGANISMO ANTAGÔNICO OU INDUTOR DE PROTEÇÃO

A levedura *S. cerevisiae* comercial foi utilizada como suspensão em água destilada estéril.

De acordo com as concentrações desejadas, quantidades adequadas de fermento biológico comercial foram adicionadas à erlenmeyers contendo água destilada estéril e as suspensões agitadas durante 10 minutos em agitador magnético. Cada suspensão assim obtida foi aplicada à superfície abaxial das folhas de plantas de café que foram mantidas nas condições ambientais até a inoculação. O intervalo de tempo entre a aplicação da levedura e a inoculação das plantas variou conforme o experimento considerado. A aplicação da suspensão da levedura foi feita por aspersão durante 5 segundos, usando nitrogênio gasoso como propelente (pressão de 0,5 bars).

3.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROTEÇÃO

O efeito de proteção foi avaliado após o aparecimento de sintomas na planta segundo metodologia de MORAES et alii (1976). Foi feita uma contagem do número de lesões por folha e a porcentagem de proteção (% P) das plantas tratadas em relação às controles foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\%P = \frac{\text{Média de lesões p/folha no controle} - \text{Média lesões p/folha no tratado}}{\text{Média de lesões por folha no controle}} \times 100$$

Para melhor visualização dos sintomas as folhas foram destacadas da planta e as lesões foram contadas com as folhas submersas em água contida numa placa de Petri de 20 cm de diâmetro, sob iluminação natural. Cada mancha clorótica foi considerada como uma lesão.

3.8. TESTES DE PROTEÇÃO

Os testes de proteção foram feitos com grupos de 10 plantas por tratamento. Foram feitas 3 repetições para cada ensaio. Dependendo do experimento considerado, foram utilizados os 2ºs, 3ºs e 4ºs ou 2ºs e 3ºs pares de folhas de cada planta, contados do ápice para a base. Para efeito de avaliação foram consideradas todas as folhas dos pares mencionados.

Em todos os experimentos um lote de plantas controle recebeu água destilada no lugar do tratamento com a levedura.

3.8.1. Influência da concentração da levedura na proteção de plantas de café

Visando determinar o efeito da concentração da levedura sobre a eficiência da proteção observada nas plantas de café, foram testadas suspensões em diferentes concentrações. Suspensões aquosas de *S. cerevisiae* nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/ml, foram preparadas e aplicadas nos 2ºs e 3ºs pares de folhas das plantas de café, conforme descrito no item 3.6. Os tratamentos com a levedura foram feitos 72 horas antes da inoculação das mesmas folhas com uredíniosporos de *H. vastatrix* conforme descrito no item 3.5. O efeito das diferentes concentrações na proteção das plantas foi avaliado após o aparecimento dos sintomas conforme item 3.7.

3.8.2. Influência do intervalo de tempo entre o tratamento com a levedura e a inoculação com *H. vastatrix* - duração do efeito de proteção

Plantas de café tiveram as folhas do 2º e 3º pares tratadas com uma suspensão de *S. cerevisiae* na concentração de 20 mg/ml, e posteriormente as mesmas folhas foram

inoculadas com suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*. O tratamento com a levedura e a inoculação seguiram o já descrito nos itens 3.5 e 3.6. Nos diferentes tratamentos o intervalo de tempo entre a aplicação da levedura e a inoculação variou em dias (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16) ou semanas (1, 2, 3, 4 e 5). Em um dos tratamentos a inoculação das plantas foi feita imediatamente após a aplicação da levedura. A avaliação da proteção, após o aparecimento de sintomas, seguiu o descrito no item 3.7.

3.8.3. Investigação sobre o caráter sistêmico ou não da proteção

Plantas de café foram submetidas aos seguintes tratamentos:

A - Plantas de café receberam na superfície abaxial dos 3ºs pares de folhas, uma aplicação de suspensão aquosa de *S. cerevisiae* na concentração de 20 mg/ml, como descrito no item 3.6. Após 3 dias do tratamento com a levedura, as plantas tiveram os 3ºs pares de folhas arrancados, e os 2ºs e 4ºs pares foram inoculados com suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* conforme descrito no item 3.5.

B - Como controle do tratamento A, plantas de café tiveram a superfície abaxial dos 3ºs pares de folhas tratadas com água destilada estéril. Após 3 dias, os 3ºs pares de folhas destas plantas foram também arrancados e os 2ºs

e 4ºs pares foram inoculados com suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* conforme item 3.5.

C - Plantas de café tiveram a superfície adaxial (superior) dos 2ºs, 3ºs e 4ºs pares de folhas tratadas com uma suspensão aquosa de *S. cerevisiae* na concentração de 20 mg/ml. A suspensão da levedura foi aplicada nas folhas com o auxílio de um pincel, a fim de se evitar o escorrimento para a face inferior. Três dias após, as folhas tratadas foram inoculadas na superfície abaxial (inferior) com uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5.

D - Plantas de café tiveram os 3ºs pares de folhas tratadas com suspensão aquosa de *S. cerevisiae* na concentração de 20 mg/ml, como descrito no item 3.6. Após 3 dias deste tratamento, as folhas dos 2ºs, 3ºs e 4º pares foram inoculadas com suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5.

E - Plantas de café tiveram uma das folhas dos 3ºs pares, tratadas com suspensão aquosa de *S. cerevisiae* na concentração de 20 mg/ml, como descrito no item 3.6. Três dias após, as duas folhas dos 3ºs pares foram inoculadas com uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5.

F - Como controle dos tratamentos C, D e E, plantas de café tiveram a superfície abaxial das folhas dos 2ºs, 3º e 4ºs pares, tratada com água destilada estéril. Após

3 dias, as mesmas folhas foram inoculadas com uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5.

Os tratamentos acima descritos foram efetuados em dois outros experimentos onde o intervalo de 3 dias entre a aplicação da levedura e a inoculação com o patógeno foi modificado em um dos experimentos para 7 dias e no outro para 10 dias.

A avaliação da proteção nos diferentes tratamentos foi feita após o aparecimento dos sintomas como descrito no item 3.7.

3.8.4. Avaliação sobre o efeito do tratamento com a levedura após a inoculação

Os 2ºs e 3ºs pares de folhas de 60 plantas de café foram inoculadas com suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de condições controladas, no escuro, à 24°C de temperatura e 95% de umidade relativa. Vinte e quatro horas após a inoculação com o patógeno, um lote de 10 plantas foi retirado e as folhas inoculadas foram tratadas com uma suspensão de *S. cerevisiae* na concentração de 20 mg/ml como descrito no item 3.6. Depois do tratamento com a levedura, as plantas foram colocadas sob regime de fotoperíodo de 12 horas, com iluminação de 4.000 lux, à 24°C de temperatura e 80% de umidade relativa. O mesmo procedimen-

to foi efetuado com outros 5 lotes de 10 plantas cada para períodos após a inoculação de 48, 72, 96 e 120 horas, tendo um lote de 10 plantas controles sido mantido sem tratamento com levedura.

A avaliação foi feita após o aparecimento de sintomas como descrito no item 3.7.

3.8.5. Comparação entre a eficiência da proteção determinada por células vivas ou autoclavadas da levedura e seus filtrados

3.8.5.1. Procedimento para obtenção das preparações da levedura

A 500 ml de água destilada estéril foram acrescentados 10 g de *S. cerevisiae* comercial para se obter uma suspensão na concentração de 20 mg/ml. A suspensão contida em erlenmeyer foi agitada por 30 minutos em placa agitadora magnética. Após este período de agitação, os 500 ml de suspensão foram divididos em 3 alíquotas, cada uma sendo submetida a diferentes processos de preparação:

1º - 100 ml foram mantidos sob refrigeração (4°C) até o uso (Amostra 1).

2º - 200 ml foram autoclavados por 15 minutos a 120°C. Destes, 100 ml foram resfriados e mantidos sob refrigeração (4°C) até o uso (Amostra 2). Os 100 ml restantes foram filtrados inicialmente em membrana preparativa (Sar

torius GmbH, pré-filtro de fibra de vidro, SM 13400, dimensão dos poros igual a 500 μm) e posteriormente em membrana de nitrato de celulose (Sartorius GmbH, SM 11306, dimensão dos poros igual a 0,45 μm). Os 100 ml de filtrado assim obtidos, foram mantidos sob refrigeração (4°C) até uso (Amostra 3). As células autoclavadas da levedura retidas na membrana da segunda filtração foram delicadamente raspadas com auxílio de uma espátula e ressuspensas em 100 ml de água destilada estéril, tendo esta suspensão sido colocada sob refrigeração - (4°C) até o uso (Amostra 4).

3º - 200 ml foram filtrados inicialmente em membrana preparativa (Sartorius GmbH, pré-filtro de fibra de vidro, SM 13400, dimensão dos poros igual a 550 μm) e posteriormente em membrana de nitrato de celulose (Sartorius GmbH, SM 11306, com dimensão dos poros igual a 0,45 μm). As células vivas da levedura retidas na membrana da segunda filtração foram delicadamente raspadas com auxílio de uma espátula e ressuspensas em 200 ml de água destilada estéril, sendo esta suspensão mantida sob refrigeração (4°C) até uso (Amostra 5). Os 200 ml de filtrado foram divididos em duas alíquotas de 100 ml cada, sendo uma delas mantida sob refrigeração (4°C) até o uso (Amostra 6) e a outra submetida à autoclavagem por 15 minutos a 120°C (Amostra 7).

Um resumo esquemático do procedimento de obtenção das diferentes amostras pode ser visualizado no esquema a seguir.

Figura 1. Esquema do procedimento de obtenção de amostras de células vivas ou autoclavadas de *S. cerevisiae* e seus filtrados.

3.8.5.2. Testes de proteção

As diferentes amostras obtidas como descrito no item 3.8.5.1. foram aplicadas na superfície abaxial das folhas do 2º e 3º pares de plantas de café como descrito no item 3.6.

Após 72 horas, as folhas tratadas foram inoculadas com uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5.

A avaliação do efeito de proteção foi feita após o aparecimento dos sintomas como descrito no item 3.7.

3.9. EFEITO DA LEVEDURA *S. cerevisiae* SOBRE O PATÓGENO *H. vastatrix*

Experimentos foram realizados com o objetivo de se verificar se a proteção observada é decorrente da ação da levedura sobre os uredíniosporos do patógeno. Nestes ensaios foram utilizadas preparações da levedura correspondentes às amostras 1, 3, 4, 6 e 7 obtidas como descrito no item 3.8.5.1.

Foram feitas 3 repetições de cada ensaio.

As amostras acima mencionadas, obtidas a partir do mesmo processo de preparação, foram utilizadas em 4 experimentos realizados simultaneamente:

3.9.1. Efeito sobre a germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* "in vitro"

3.9.1.1. Preparo dos testes de germinação

Uredíniosporos de *H. vastatrix* coletados e mantidos como descrito no item 3.2, foram retirados do nitrogênio líquido e imersos em banho-maria à 40°C, ainda dentro dos criotubos, por 10 minutos. Após o choque térmico, os uredíniosporos foram colocados para germinar em lâminas escavadas contendo as amostras acima mencionadas. Foram utilizados 10 µg de uredíniosporos adicionados à 50 µl de cada amostra contidos na cavidade da lâmina. As lâminas foram colocadas em placas de Petri de fundo estreito de 10 cm de diâmetro com 1,5 ml de água destilada estéril ao fundo, fechadas e mantidas durante 6 horas, no escuro, à 24°C de temperatura. Após este período, a germinação dos uredíniosporos foi interrompida pela adição, à suspensão, de 20 µl de solução de lactofenol-azul de algodão (fenol/azul de algodão/ácido láctico/glicerina/água: 20:0,1:16:31:33; g/g/ml/ml/ml).

Foram feitas 5 réplicas para cada amostra da levedura.

Como controle, uredíniosporos foram colocados para germinar em água destilada estéril.

3.9.1.2. Observação e contagem ao microscópio óptico

Depois de bloqueada a germinação, os uredínios

poros foram observados, sob aumento de 400 vezes, ao microscópio óptico comum (LEITZ; mod. SM-LUX) para cálculo da porcentagem de germinação e porcentagem de inibição da germinação segundo as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ de germinação} = \frac{\text{nº de esporos germinados}}{\text{nº de esporos observados}} \times 100$$

$$\% \text{ de inibição da germinação} = 100 - \left(\frac{\% \text{ germinação no tratamento}}{\% \text{ germinação no controle}} \times 100 \right)$$

Foram observados 500 urediniosporos por tratamento sendo 100 urediniosporos por réplica e destes o número de urediniosporos germinados foi anotado para os cálculos posteriores.

3.9.2. Efeito sobre a permanência dos urediniosporos na superfície foliar

3.9.2.1. Preparo dos discos de folhas

Plantas de café tiveram as folhas dos 2ºs e 3ºs pares tratadas conforme item 3.6, com as preparações de *S. cerevisiae* correspondentes às amostras 1, 3, 4, 6 e 7 obtidas como descrito no item 3.8.5.1. Setenta e duas horas após o tratamento, as plantas foram inoculadas com urediniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5. As plantas foram, então, mantidas nas condições ambientais por aproximadamente 30 minutos até o inóculo secar completamente. Após

este período, foram retirados discos de 0,5 cm de diâmetro, das folhas tratadas, com auxílio de um furador de papel, num total de 10 discos por tratamento. Os discos foram colocados em lâminas de microscopia, com a superfície abaxial da folha voltada para cima.

O método de coloração dos urediniosporos e a observação ao microscópio de fluorescência seguiu o descrito por MARTINS (1988).

3.9.2.2. Método de Coloração

A cada disco de folha foi adicionada uma gota de solução de lactofenol (fenol/ácido láctico/glicerina; 1:1:1; v/v/v) usada como fixador. Após 10 minutos, a solução foi retirada cuidadosamente com papel de filtro e os discos foram lavados 2 vezes com solução tampão TRIS/HCL 0,1M pH 8,5 gotejada sobre os discos e imediatamente retirada com papel de filtro. Em seguida, cada disco de folha recebeu 1 gota de fluorocromo dietanol (sal sódico de 4,4'-bis (2-dietanol-amino-4-(3 sulfofenilamino-S-tiozinil-6)-amino)-estilbeno-2,2-ácido dissulfônico; UVITEX, Ciba Geigy AG, Basel, Suíça) 0,25% em solução tampão TRIS/HCL 0,1M, pH 8,5. Após adicionada, a solução de fluorocromo foi imediatamente recolhida com papel de filtro e, novamente, os discos foram lavados 2 vezes com a mesma solução tampão. Em seguida, a cada disco foi adicionada uma gota de glicerina 50% que foi retirada depois

de 15 minutos também com auxílio de papel de filtro. Finalmente, os discos foram recobertos por glicerina 100% para serem observados ao microscópio de fluorescência.

3.9.2.3. Observação ao microscópio de fluorescência

Os uredíniosporos corados como descrito no item anterior foram observados sob aumento de 63 vezes (ocular 6,3X; objetiva 10X) em microscópio de fluorescência, modelo Orthoplan da Leitz (Wetzlar BDR) equipado com lâmpada de filamento de halogênio de 100W e 12W, filtro anticalorífico KG-1, filtro supressor de luz vermelha BG38, filtro excitador de luz UV e violeta BP 355-425, espelho divisor de feixes cromáticos RKP 455 e filtro oclutor LP 460.

Foram contados todos os uredíniosporos presentes em cada um dos 10 discos por tratamento e o número de uredíniosporos por cm² de folha, em cada tratamento, foi calculado segundo a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Nº médio de uredíniosporos/cm}^2 \text{ de folha} &= \frac{\text{média do nº de uredíniosporos por disco}}{\text{área do disco}} \\ &(\text{sendo a área do disco} = 1,57 \text{ cm}^2) \end{aligned}$$

3.9.3. Efeito sobre a germinação e formação de apressórios dos uredíniosporos de *H. vastatrix* "in vivo"

3.9.3.1. Preparo dos discos de folhas

Os 2ºs e 3ºs pares de folhas de plantas de ca

fê foram tratados conforme item 3.6. com preparações de *S. cerevisiae* correspondentes às amostras 1, 3, 4, 6 e 7 obtidas como descrito no item 3.8.5.1. Setenta e duas horas após o tratamento, as plantas foram inoculadas com uredíniosporos de *H. vastatrix* como descrito no item 3.5 e mantidas durante 16 horas, no escuro, à 24°C de temperatura e 95% de umidade relativa. Em seguida, com auxílio de um furador de papel, foram retirados discos das folhas tratadas, de 0,5 cm de diâmetro, em lotes de 10 discos por tratamento. Os discos foram dispostos em lâminas para microscopia com a superfície abaxial da folha voltada para cima.

3.9.3.2. Método de Coloração

O método de coloração utilizado para se observar o número de uredíniosporos germinados e com apressórios formados foi o mesmo descrito no item 3.9.2.2.

3.9.3.3. Observação ao microscópio de fluorescência

Para observação microscópica dos uredíniosporos germinados e com apressórios formados "in vivo", foi utilizado o mesmo equipamento descrito no item 3.9.2.3.

Foram observados sob aumento de 157,5 vezes (ocular 6,3X; objetiva 25X), cerca de 100 uredíniosporos por disco num total aproximado de 1.000 uredíniosporos por tratamento e destes, o número de uredíniosporos germinados e com

apressórios formados foi anotado, para cálculos posteriores, segundo as seguintes fórmulas:

$$\text{média de \% de germinação} = \frac{\text{média do nº de urediniosporos germinados}}{\text{média do nº de urediniosporos observados}} \times 100$$

$$\text{média da \% de formação de apressórios} = \frac{\text{média do nº de urediniosporos com apressórios}}{\text{média do nº de urediniosporos germinados}} \times 100$$

3.9.4. Testes de Proteção

Simultaneamente aos testes descritos nos itens 3.9.1, 3.9.2 e 3.9.3, foram realizados ensaios onde as preparações relativas às amostras 1, 3, 4, 6 e 7 já referidas foram utilizadas em testes de proteção de plantas de café, para comparação entre a proteção determinada e o efeito "in vitro" e "in vivo" sobre o patógeno.

Para tanto, plantas de café tiveram as folhas do 2º e 3ºs pares tratadas com as preparações da levedura como descrito no item 3.6. Setenta e duas horas após, as folhas tratadas foram inoculadas como descrito no item 3.5. A avaliação da proteção foi feita após o aparecimento dos sintomas como descrito no item 3.7.

3.10. FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste traba-

lho foram feitas com uma câmara fotográfica Leitz VARIO - ORTHOMAT (24 x 36 mm com fator 0,32), ocular VARIO (5X a 12,5X) e fotômetro automático, acoplada ao microscópio Orthoplan da Leitz descrito no item 3.9.2.3.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância.

A diferença entre as médias do controle e dos tratamentos foram testadas através do Teste-T de Student para significância ao nível de $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados referem-se aos dados de um experimento considerado como o mais representativo entre as repetições. Para escolha dos dados a serem apresentados, foram calculadas as médias dos resultados das 3 repetições e o experimento escolhido foi aquele cujos dados mais se aproximam das médias obtidas.

4.1. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA LEVEDURA NA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE CAFÉ

Os dados apresentados na Tabela 1 mostram que folhas de plantas de café previamente tratadas com *S. cerevisiae*, apresentaram-se protegidas contra *H. vastatrix*. Observa-se que a proteção aumenta de acordo com o aumento da concentração da levedura, sendo que o melhor efeito de proteção, $\pm 70\%$, é obtido para concentrações iguais ou maiores que 20 mg/ml. O efeito de proteção se traduz em um menor número de lesões por folha (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1. Proteção de plantas de café contra *H. vastatrix* pelo tratamento prévio das folhas com suspensões de *S. cerevisiae* em diferentes concentrações.

Concentração de <i>S. cerevisiae</i> (mg/ml) ¹	Média de lesões/folha ²	Proteção (% do controle)
1	34,8 ± 6,6**	29,4
2	32,9 ± 4,4**	33,3
5	28,9 ± 3,2**	41,4
10	24,4 ± 4,3**	50,5
15	20,5 ± 4,2**	58,4
20	13,7 ± 3,2**	72,2
25	13,9 ± 4,2**	71,8
30	12,3 ± 2,9**	75,1
Controle	49,3 ± 5,9	

¹ Suspensão de *S. cerevisiae* comercial em água destilada aplicada 72 hs antes da inoculação das folhas com *H. vastatrix*.

² Valores representam média de 40 folhas (2º e 3º pares de 10 plantas) ± erro padrão. Médias seguidas por dois asteriscos (**) são significativamente diferentes do controle ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste-T de Student.

Figura 2. Sintomas em folhas de cafeeiro cv. Mundo Novo, inoculadas com *H. vastatrix*.

A - controle, água destilada estéril aplicada às folhas 48 hs antes da inoculação; B - tratado, suspensão de células vivas de *S. cerevisiae* aplicada às folhas 48 hs antes da inoculação.

4.2. INFLUÊNCIA DO INTERVALO DE TEMPO ENTRE O TRATAMENTO COM A LEVEDURA E A INOCULAÇÃO COM *H. vastatrix* - DURAÇÃO DO EFEITO DE PROTEÇÃO

Através dos resultados apresentados na Tabela 2 verifica-se que o maior efeito de proteção é observado após 4 dias do tratamento das folhas com *S. cerevisiae*. A proteção permanece nos seus maiores níveis no período entre 4 dias e 2 semanas ($\pm$ 60-70% de proteção) decrescendo depois disto (30-50%). Nos intervalos menores que 4 dias, também se observa um efeito protetor (50%), que é obtido mesmo quando a inoculação é feita imediatamente após o tratamento com a levedura (46%).

4.3. INVESTIGAÇÃO SOBRE O CARÁTER SISTÊMICO OU NÃO DA PROTEÇÃO

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que não se verifica um efeito sistêmico de proteção. A proteção só é observada localmente, isto é, somente quando as folhas inoculadas foram previamente tratadas com a levedura é que houve um decréscimo significativo do número de lesões por folha (Tratamento D - 3º par de folhas; Tratamento E - folha tratada). Não existe uma proteção sistêmica acima ou abaixo das folhas tratadas (Tratamento A e D - 2º e 4º pares),

Tabela 2. Influência do intervalo de tempo entre o tratamento com *S. cerevisiae* e a inoculação com *H. vastatrix*, na proteção de plantas de café à ferrugem.

Intervalo de tempo ¹ (dias)	Média . Lesões/folha ²	Proteção (% do controle)
0 ³	43,5 ± 7,8**	46,4
1	39,2 ± 6,3**	51,7
2	40,9 ± 6,8**	49,6
4	23,7 ± 4,7**	70,8
6	19,1 ± 2,5**	76,5
8	24,2 ± 3,0**	70,2
10	27,3 ± 2,8**	66,4
12	30,9 ± 3,6**	61,9
14	36,9 ± 5,1**	54,5
16	33,8 ± 6,5**	58,4
Controle	81,2 ± 10,1	
Intervalo de tempo ¹ (semanas)	Média Lesões/folha ²	Proteção (% do controle)
1	23,8 ± 6,9**	72,4
2	23,9 ± 4,5**	72,3
3	36,4 ± 3,8**	57,9
4	46,2 ± 8,2**	46,5
5	58,7 ± 13,2**	32,1
Controle	86,4 ± 22,8	

¹ Suspensão de *S. cerevisiae* comercial em água destilada (20 mg/ml) aplicada à superfície abaxial das folhas nos intervalos de tempo definidos, antes da inoculação com *H. vastatrix*.

² Valores representam média de 40 folhas (2ºs e 3ºs pares de 10 plantas) ± erro padrão. Médias seguidas por dois asteriscos (**) são significativamente diferentes do controle ($P < 0,05$) de acordo com o Teste-T de Student.

³ Inoculação feita imediatamente após a aplicação de *S. cerevisiae* nas folhas.

Tabela 3. Efeito de proteção local em folhas de café contra *Hemileia vastatrix* pelo tratamento com *S. cervisiae*.

Tratamento ¹	Posição do par	Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação					
		3 DIAS		7 DIAS		10 DIAS	
		Média de Lesões/folha ²	Proteção (% do controle)	Média de Lesões/folha ²	Proteção (% do controle)	Média de Lesões/folha ²	Proteção (% do controle)
A	2ª	85,6 ± 13,2*	-	141,7 ± 18,3*	-	48,8 ± 5,1*	5,2
	4ª	145,4 ± 16,1*	-	82,4 ± 10,5*	6,5	33,0 ± 5,5*	-
B	2ª	52,2 ± 9,9*	-	137,2 ± 9,7*	-	51,5 ± 7,7*	-
	4ª	139,2 ± 19,7*	-	88,1 ± 9,2*	-	29,9 ± 3,9*	-
C	2ª	128,2 ± 26,2*	-	76,8 ± 12,7*	11,0	60,6 ± 9,8*	-
	3ª	169,3 ± 17,1*	-	87,7 ± 13,0*	-	59,9 ± 8,4*	-
	4ª	179,0 ± 18,2*	-	62,3 ± 10,7*	-	49,2 ± 8,0*	-
D	2ª	62,6 ± 11,8*	17,6	78,6 ± 8,4*	8,9	50,1 ± 8,9*	4,0
	3ª	52,5 ± 6,8**	52,7	21,1 ± 2,6**	75,6	19,1 ± 3,9**	64,4
	4ª	116,2 ± 12,3*	12,8	53,1 ± 8,7*	4,3	42,8 ± 11,8*	-
E	3ª folha tratada	67,9 ± 12,0**	38,8	25,5 ± 4,0**	70,5	20,7 ± 4,0**	61,4
	3ª folha oposta	135,8 ± 17,6	-	73,2 ± 6,7*	15,3	65,3 ± 8,0*	-
F	2ª	76,0 ± 12,8	-	86,3 ± 9,2	-	52,2 ± 6,9	-
	3ª	110,9 ± 12,6	-	86,4 ± 8,6	-	53,6 ± 5,2	-
	4ª	133,3 ± 16,2	-	55,5 ± 5,7	-	32,2 ± 4,6	-

¹ Tratamento conforme descrição no texto (item 3.8.3.)

² Valores representam média de 20 folhas ± erro padrão. Médias seguidas de dois asteriscos (**) são significativamente diferentes do controle ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste-F de Student. Médias seguidas por um asterisco (*) não diferem do controle.

lateral (Tratamento E - folha oposta à tratada) e nem mesmo de uma face para a outra da folha (Tratamento C). Não se observa desenvolvimento de uma resposta sistêmica mesmo para períodos maiores entre o tratamento com *S. cerevisiae* e a inoculação, pois a proteção não se manifesta em folhas não tratadas seja para a inoculação 3, 7 ou 10 dias após o tratamento da planta com a levedura.

4.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM A LEVEDURA APÓS A INOCULAÇÃO

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados que mostram que a levedura *S. cerevisiae* não exerce um efeito curativo em folhas de café já infectadas por *H. vastatrix*. Nenhum efeito de proteção foi observado nos tratamentos com a levedura realizados após a inoculação com o patógeno. Para alguns tratamentos (24, 48 e 72 hs) observou-se, inclusive, infecção maior nas folhas tratadas em relação às controle mostrando que o tratamento com a levedura após a inoculação parece ter propiciado um aumento na infecção.

Tabela 4. Efeito de *S. cerevisiae* na proteção de plantas de café a *H. vastatrix*, quando aplicado após a inoculação.

Tratamento ¹ (horas após a inoculação)	Média Lesões/folha ²	Proteção (% do controle)
24	33,4 ± 7,5**	-
48	46,1 ± 6,3**	-
72	47,9 ± 12,2**	-
96	30,0 ± 5,5*	-
120	21,5 ± 3,1*	13,6
Controle	24,9 ± 3,9	

¹ Suspensão de *S. cerevisiae* comercial em água destilada (20 mg/ml) aplicada na superfície abaxial das folhas nos intervalos de tempo definidos após a inoculação com *H. vastatrix*.

² Valores representam média de 40 folhas (2º e 3º pares de 10 plantas) ± erro padrão. Médias seguidas por dois asteriscos (**) são significativamente diferentes do controle ($P \leq 0,05$) de acordo com o Teste-T de Student. Médias seguidas por um asterisco (*) não diferem do controle.

4.5. COMPARAÇÃO ENTRE A EFICIÊNCIA DA PROTEÇÃO DETERMINADA POR CÉLULAS VIVAS OU AUTOCLAVADAS DA LEVEDURA E SEUS FILTRADOS

Pelos resultados apresentados na Tabela 5, observa-se que uma maior proteção foi obtida pelo tratamento com suspensão de células vivas de *S. cerevisiae*. Verificou-se que a autoclavagem destas células diminui o seu efeito protetor porém a lavagem das células vivas ou autoclavadas alterou muito pouco a proteção por elas determinada. Filtrados de células vivas ou autoclavadas não determinaram uma proteção significativa.

4.6. EFEITO DA LEVEDURA *S. cerevisiae* SOBRE O PATÓGENO *H. vastatrix*

Através dos resultados apresentados na Tabela 6 observa-se que nos tratamentos onde foram utilizadas células vivas ou autoclavadas da levedura, verifica-se maior inibição da germinação "in vitro", "in vivo", bem como um decréscimo acentuado do número de uredíniosporos de *H. vastatrix* presentes na superfície das folhas de café. Paralelamente, estes são os tratamentos que mostraram uma efetiva proteção à ferrugem, da ordem de 72 e 65%, respectivamente.

Tabela 5. Proteção determinada por células vivas ou autoclavadas de *S. cerevisiae* e seus filtrados.

Tratamento ¹ (amostra)	Média de Lesões/folha ²	Proteção (% do controle)
1. suspensão de células autoclavadas	58,9 ± 11,6**	48,6
2. suspensão de células autoclavadas, lavadas	53,6 ± 11,9**	53,2
3. filtrado da suspensão de células autoclavadas	96,7 ± 15,7*	15,6
4. suspensão de células vivas	30,5 ± 4,4**	73,4
5. suspensão de células vivas lavadas	36,9 ± 6,6**	67,8
6. filtrado da suspensão de células vivas	85,4 ± 10,8*	25,5
7. filtrado autoclavado de suspensão de células vivas	92,3 ± 10,9*	19,5
Controle	114,6 ± 16,5	

¹ Preparações obtidas conforme descrito no texto (item 3.8.5.1.), aplicadas na superfície abaxial das folhas 72 hs antes da inoculação com *H. vastatrix*.

² Valores representam média de 40 folhas (2º e 3º pares de 10 plantas) ± erro padrão. Médias seguidas por dois asteriscos (**) são significativamente diferentes do controle ($P < 0,05$) de acordo com o Teste-T de Student. Médias seguidas por um asterisco (*) não diferem do controle.

Tabela 6. Proteção determinada por células vivas ou autoclavadas de *S. cerevisiae* e seus filtrados e o efeito sobre a germinação "in vitro" e "in vivo", formação de apressórios e permanência, na superfície foliar, dos urediniosporos de *H. vastatrix*.

Tratamento ¹	"IN VITRO"		"IN VIVO"			PROTEÇÃO	
	GERMINAÇÃO		germinação		nº de esporos por cm ² de folha	Médias	%
	% 2	inibição	% 2	inibição	Média ²	lesões/folha	
Suspensão de células autoclavadas	33,7 ± 5,1**	35,4	41,1 ± 3,7**	25,4	22,3 ± 2,5**	68,3	52,9 ± 12,2** 65,5
Filtrado da suspensão de células autoclavadas	46,8 ± 3,4*	10,3	52,6 ± 2,1*	4,5	53,1 ± 2,8**	24,6	121,4 ± 17,1* 20,9
Suspensão de células vivas	24,5 ± 3,0**	53,1	40,5 ± 2,9**	26,5	23,6 ± 1,7**	66,5	42,6 ± 6,8** 72,2
Filtrado da suspensão de células vivas	38,0 ± 3,8**	27,2	50,0 ± 3,1*	9,2	55,5 ± 2,4**	21,2	113,7 ± 15,8* 25,9
Filtrado autoclavado da suspensão de células vivas	37,6 ± 1,9**	28,0	45,7 ± 3,4*	17,1	54,7 ± 3,1**	22,3	107,4 ± 15,3** 30,0
Controle	52,2 ± 1,9		55,1 ± 2,8		70,4 ± 5,2		153,4 ± 16,9

¹ Preparações obtidas conforme descrito no texto (item 3.8.5.1.).

² Valores representam média ± erro padrão. Médias seguidas por dois asteriscos (**) são significativamente diferentes do controle ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste-T de Student. Médias seguidas por um asterisco (*) não diferem do controle.

Nos tratamentos onde foram utilizados os filtrados de células da levedura, autoclavadas ou vivas, observou-se um efeito de inibição da germinação "in vitro" e "in vivo" bem mais baixo, assim como uma menor influência sobre a permanência dos uredíniosporos nas folhas, com uma proteção correspondentemente mais baixa ou inexistente.

Em nenhum dos tratamentos foi observada interferência na formação de apressórios.

Pode-se verificar uma clara correlação da proteção com uma diminuição do número de uredíniosporos presentes na superfície foliar, associada a um efeito inibidor da germinação, que pode ser observado tanto "in vivo" como "in vitro".

A observação sob microscopia de fluorescência revelou que as células da levedura *S. cerevisiae* parecem se depositar nas depressões existentes na superfície foliar, preenchendo espaços mais baixos da topografia, presentes entre as células epidérmicas (Figura 3).

Na Figura 4 pode-se observar o efeito de células vivas da levedura inibindo a germinação "in vivo" dos uredíniosporos de *H. vastatrix*, bem como reduzindo o número destes na superfície das folhas.

Figura 3. Aspecto ao microscópio de fluorescência de células vivas de *S. cerevisiae* na superfície abaxial de folhas de cafeeiro.
L - células da levedura *S. cerevisiae*; E - estômato.
Aumento: Foto A, X400; Foto B, X640.

Figura 4. Aspecto ao microscópio de fluorescência de urediniosporos de *H. vastatrix* após a germinação na superfície abaxial de folhas de cafeeiro.

A - controle, água destilada estéril aplicada às folhas 48 hs antes da inoculação; B - tratado, suspensão de células vivas de *S. cerevisiae* aplicada às folhas 48 hs antes da inoculação; U - urediniosporos; T - tubo germinativo. Aumento X64.

5. DISCUSSÃO

Quando folhas de plantas de café são tratadas com suspensão de células de *S. cerevisiae* comercial, tornam-se protegidas contra a inoculação posterior com uredíniosporos de *H. vastatrix*. Os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho sugerem fortemente que a proteção à ferrugem observada é devida basicamente a um efeito antagônico da levedura sobre o patógeno *H. vastatrix*, não existindo evidências de que este microorganismo atue sobre a planta hospedeira ativando seu mecanismo de resistência.

Através dos resultados apresentados na Tabela 6, verifica-se uma clara correlação da proteção obtida nos tratamentos com células da levedura, com um efeito de inibição da germinação dos uredíniosporos do patógeno, bem como com uma redução do número destes uredíniosporos que permanecem na superfície das folhas de café. Estes resultados associados aqueles que demonstram ser a proteção somente local e não sistêmica, bem como aqueles que mostram que a levedura tem efeito protetor e não curativo, indicam que estamos diante de um fenômeno tipo controle biológico e não de indução de resistência.

Os dados apresentados na Tabela 3 demonstram que o tratamento de folhas de cafeeiro com suspensão de células de *S. cerevisiae* determina uma proteção local à ferrugem que não se manifesta sistemicamente na planta. A indução sistêmica de proteção é um fenômeno observado em diversas interações e tem como característica a necessidade de um certo intervalo de tempo entre o tratamento com o microorganismo indutor e sua manifestação. Para algumas interações este tempo pode ser relativamente longo. COHEN & KUČ (1981) verificaram que a inoculação de *P. tabacina* próxima à base das hastes de plantas de fumo, determinou uma resistência sistêmica a este mesmo patógeno, que se manifestou na parte superior da planta duas a três semanas mais tarde. Porém, em cafeeiros, alguns autores demonstraram que a indução de proteção sistêmica pode ser observada em períodos de tempo bem mais curtos. BERETTA et alii (1977) observaram que o tratamento de folhas de plantas com filtrado da suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, realizado 96 horas antes da inoculação, determinou uma proteção sistêmica a este patógeno. GUZZO et alii (1987a) verificaram que plantas de café tratadas com exopolissacarídeos extraídos de cápsulas de *Xanthomonas campestris* pv. *manihoti* (Arthaud-Berthet) Starr e inoculadas com *H. vastatrix* 72 horas após, apresentaram-se sistemicamente protegidas contra o patógeno. Mais recentemente, ROVERATTI et alii (1989) verificaram um efeito de proteção sistêmica à *H. vastatrix*, que se manifesta em plantas de

café inoculadas com o patógeno 48 horas após o tratamento das folhas com um preparado comercial de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Uma vez que as características do fenômeno de indução de resistência parecem estar relacionadas à planta hospedeira e não ao indutor utilizado, pode-se concluir pelos resultados do presente trabalho, que o fato de não se ter observado uma proteção sistêmica nas plantas tratadas com *S. cerevisiae* não está relacionado ao tempo necessário para se observar a resposta, visto que, em plantas de café, esta já pode ser verificada entre 48 e 96 horas. Os dados da Tabela 3 mostram que mesmo quando a inoculação com o patógeno é feita 7 a 10 dias após o tratamento com a levedura, não se verificou uma resposta sistêmica de proteção à ferrugem, evidenciando que em plantas de café tratadas com suspensão de células de *S. cerevisiae* este fenômeno não ocorre. Somente ficou bem caracterizada a manifestação de uma proteção local que parece ser devida a um efeito da levedura sobre o patógeno.

Outra observação compatível com o fenômeno de controle biológico é a ausência de um efeito pós-inoculação que tem sido observada em diversos trabalhos sobre o assunto. ISENBECK & SCHULZ (1985) observaram que bactérias com considerável atividade antagônica contra *E. amylovora* tanto "in vitro" como "in vivo", não mostraram antagonismo contra este fitopatógeno quando aplicadas em plantas ornamentais (*Cotoneaster* spp), 24 horas depois da inoculação com o patógeno;

redução significativa da doença só foi verificada quando as bactérias foram aplicadas 24 horas antes da inoculação. Também foi observada pequena redução da doença quando as bactérias foram aplicadas simultaneamente com o patógeno, sendo que esta última observação também é condizente com o verificado no presente trabalho para o tratamento de folhas de café com *S. cerevisiae* efetuado imediatamente antes da inoculação com *H. vastatrix* (Tabela 2), onde também se observou proteção, embora mais baixa que nos tratamentos em que o intervalo de tempo até a inoculação foi maior.

BOUDREAU & ANDREWS (1987) também verificaram que a severidade da sarna da macieira foi reduzida pela aplicação de ascósporos de *Chaetomium* simultaneamente com os conídios do patógeno *V. inaequalis*, porém nenhum efeito foi observado quando os ascósporos foram aplicados posteriormente a inoculação do patógeno.

A existência de um efeito de proteção obtido pela aplicação de *S. cerevisiae* imediatamente antes da inoculação com *H. vastatrix* indica que a proteção observada independe da ação da levedura sobre o mecanismo de resistência da planta de café uma vez que o fenômeno de indução de resistência envolve respostas da planta hospedeira que necessitam de um certo período de tempo para se expressar. Desta forma, a não manifestação de uma proteção sistêmica (Tabela 3),

o não-efeito pós-inoculação (Tabela 4), a existência de uma proteção nos tratamentos com a levedura efetuados imediatamente antes da inoculação (Tabela 2), a clara correlação da proteção com um efeito inibidor da germinação "in vivo" e "in vitro" e com um decréscimo no número de uredíniosporos por área foliar (Tabela 6), indicam uma interação direta entre o microorganismo *S. cerevisiae* e o patógeno *H. vastatrix*.

Segundo COOK & BAKER (1983), o antagonismo entre microorganismos na superfície das plantas inclui principalmente competição e antibiose, mas também pode envolver hiperparasitismo.

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam a antibiose como sendo um dos mecanismos envolvidos na proteção à ferrugem observada em plantas de café pelo tratamento com a levedura.

Uma das indicações é a correspondência entre os efeitos antagônicos observados "in vitro" e "in vivo". Na Tabela 6 verifica-se que células vivas ou autoclavadas da levedura *S. cerevisiae* exercem um efeito inibidor da germinação dos uredíniosporos de *H. vastatrix*. Este tipo de efeito tem sido verificado por outros autores. BAKER et alii (1983) verificaram que a aplicação de *B. subtilis* em plantas de feijão antes da inoculação com o patógeno *U. phaseoli* determinou redução dos sintomas de ferrugem. Pela observação ao microscópio foi verificado que a germinação dos uredosporos do patógeno sobre as folhas foi bastante reduzida, sendo que,

em testes "in vitro" a inibição da germinação também foi observada. A purificação do filtrado de cultura desta bactéria demonstrou que um produto metabólico do bacilo é responsável pela inibição da germinação de *U. phaseoli* tanto "in vitro" como "in vivo", tratando-se portanto de um efeito de antibiose.

ISENBECK & SCHULZ (1985 e 1986) observaram que 3 strains de bactérias isoladas de tecidos de plantas ornamentais e de pera, infectadas por *E. amylovora*, mostraram considerável atividade antagônica contra este patógeno tanto "in vitro" como "in vivo". Verificaram que quando estas bactérias são aplicadas na planta ornamental *Cotoneaster* spp 24 horas antes da inoculação com *E. amylovora* ou simultaneamente com o patógeno, ocorre uma redução da doença. Os autores verificaram claramente que a atividade inibitória das bactérias sobre este patógeno está baseada na ocorrência de um princípio antibiótico.

Nas interações antagônicas além da antibiose, o efeito inibidor sobre a germinação de esporos do patógeno pode ser atribuída à competição por nutrientes. ELAD & BAKER (1985) verificaram que pseudomonas fluorescentes podem controlar o fitopatógeno *Fusarium* spp inibindo a germinação dos clamidosporos deste no solo. Esta inibição está relacionada com a produção de sideróforos pelas bactérias, sendo revertida pela adição de ferro ao sistema o que indica uma competição por ferro durante a germinação.

ELAD & CHET (1987) observaram que diversas bactérias são eficientes no controle biológico de *Pythium* spp., existindo uma correlação da diminuição da doença com a inibição da germinação dos oosporos do patógeno. Os autores sugerem que esta inibição é determinada provavelmente pela competição por nutrientes entre as bactérias e os oosporos em germinação.

Uma vez que no presente trabalho, foi verificado que células da levedura mortas por aquecimento (Tabela 6) também exercem um efeito inibidor da germinação dos urediniosporos de *H. vastatrix* tanto "in vitro" como "in vivo", a possibilidade de uma competição por nutrientes fica eliminada, sendo reforçada a hipótese de um efeito de antibiose.

BOUDREAU & ANDREWS (1987) verificaram que ascosporos de *C. globosum* tanto vivos como mortos por aquecimento, controlam a sarna da macieira quando aplicados às folhas simultaneamente com o patógeno *V. inaequalis*. Foi observada uma atividade inibitória dos extratos de cultura de *C. globosum* sobre *V. inaequalis* "in vitro", sugerindo que na superfície da folha, antibióticos provenientes dos ascosporos vivos ou mortos de *C. globosum* podem se difundir passivamente inibindo a infecção por *V. inaequalis*.

A existência de metabólitos com atividade antibiótica tem sido associada ao efeito antagônico (antibiose) de vários microorganismos utilizados em controle biológico, como já referido nesta discussão. Muitos destes metabó-

litos tem sido encontrados nos meios de cultura dos respectivos microorganismos (BAKER et alii, 1983; ISENBECK & SCHULZ, 1986; BOUDREAU & ANDREWS, 1987; KIM et alii, 1988).

Os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6 mostram que filtrados de suspensão de células de *S. cerevisiae* não são eficientes em proteger plantas de café contra *H. vastatrix*, indicando que se houver um metabólito com atividade inibitória envolvido na proteção observada, este não se difundiu, ou se difundiu pouco para o líquido externo das células em suspensão. Esta possibilidade é reforçada pela observação de que células lavadas da levedura, vivas ou mortas (Tabela 5, tratamentos 2 e 5) não perdem sua atividade de proteção. No caso das células vivas, metabólitos uma vez retirados pelo procedimento de lavagem utilizado, poderiam ser sintetizados novamente. Mas, o fato de células autoclavadas lavadas manterem sua capacidade protetiva indica que o princípio envolvido neste efeito não foi retirado das células uma vez que não poderia ter sido novamente produzido.

O fato deste princípio com atividade antibiótica, se existir, não ter se difundido em quantidade suficiente para mostrar efeito nos filtrados, pode estar relacionado com sua solubilidade e com o pouco tempo a que as células foram mantidas em suspensão, que foi de apenas 30 minutos. FRAVEL et alii (1987) verificaram que um metabólito de *Talaromyces* provavelmente está envolvido no controle de *V. dahliae* por aquele microorganismo. Os autores observaram que

a produção máxima do metabólito é obtida em cultura de 5 dias de *T. flavus* em meio líquido. Desta forma, estes resultados de modo algum comprometem as evidências de uma antibiose como provável mecanismo envolvido na proteção observada uma vez que na superfície da folha este princípio poderia se difundir lentamente a partir das células da levedura, atuando sobre os uredíniosporos de *H. vastatrix*.

Ainda no que se refere aos filtrados, mais uma vez os resultados da Tabela 6 mostram que, na ausência de um efeito inibidor da germinação e redutor da permanência dos uredíniosporos na superfície foliar, a proteção à ferrugem não se manifesta, indicando a correlação destes fenômenos.

Além das evidências de uma antibiose, fica claro pelos resultados apresentados na Tabela 6 que a presença de células vivas ou autoclavadas da levedura na superfície foliar dificulta a permanência dos uredíniosporos do patógeno nas folhas, sendo este efeito, inclusive, bem mais marcante do que a inibição da germinação.

O antagonismo de um microorganismo sobre o outro através da presença física nas superfícies da planta hospedeira tem sido descrito por alguns autores, principalmente como competição por espaço.

HATTINGH et alii (1986) observaram que o controle de *E. amylovora* em flores de maçã por *E. herbícola* "strain" 252, é obtido se *E. herbícola* for aplicada um dia antes do patógeno. Pela observação por microscopia de varredura

ra, os autores concluíram que estas duas bactérias se multiplicam no mesmo nicho na superfície do estigma. Quando aplicado primeiro, o antagonista multiplica-se e não permite que o patógeno tenha acesso aos sítios de infecção.

No presente caso, como pode ser observado na Figura 3, a observação ao microscópio de discos de folhas tratadas revelou que as células da levedura depositam-se em depressões existentes nas junções entre células da epiderme. Devido a isso, talvez ocorra uma alteração da topografia da superfície foliar o que pode dificultar a aderência e/ou permanência dos uredíniosporos nesta superfície.

Os resultados da Tabela 6 mostram que nas folhas contendo células vivas ou mortas da levedura, o número de uredíniosporos que permanecem sobre a planta hospedeira é reduzido em torno de 60% comparado com as plantas controle.

Em observações durante a condução dos experimentos, foi verificado que nas folhas tratadas com células da levedura, a suspensão de uredíniosporos durante a inoculação tende a escorrer mais facilmente das mesmas. Existe a possibilidade de que as células da levedura depositadas nas folhas de café, poderiam alterar de alguma forma a tensão superficial das gotículas do inóculo provocando o deslocamento dos uredíniosporos para fora das folhas.

Desta forma, as várias evidências aqui mencionadas indicam claramente que a proteção à ferrugem observada em folhas de cafeeiros tratadas com células da levedura

S. cerevisiae, é devida a uma ação deste microorganismo sobre os uredíniosporos de *H. vastatrix* podendo esta ação ser dividida em pelo menos 2 mecanismos distintos: o primeiro componente seria um efeito da levedura diminuindo o número de uredíniosporos que permanecem na superfície das folhas e, o segundo seria um efeito de antibiose que inibe a germinação "in vivo" dos uredíniosporos restantes, fatos que podem ser observados na Figura 4.

Uma vez que uma ação direta da levedura sobre os uredíniosporos de *H. vastatrix* foi evidenciada conforme os resultados já discutidos, os dados apresentados na Tabela 1 deveriam ser esperados. Tais dados mostram que a proteção obtida é dependente da concentração da levedura, aumentando proporcionalmente ao aumento da concentração de *S. cerevisiae* comercial utilizada. A proteção máxima alcançada fica em torno de 70% e é obtida para concentrações da levedura de 20 mg/ml ou mais altas.

A mesma dependência-concentração do antagonista/proteção-, tem sido observada por outros autores. NELSON & POWELSON (1988) verificaram que um isolado de *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bainer proveniente de folhas de feijão mulatinho, reduz a podridão das vagens desta planta causadas por *Botrytis cinerea* quando aplicado às flores do hospedeiro antes ou simultaneamente à inoculação com os conídios do patógeno. Os autores observaram que o efeito de proteção é dependente da concentração de esporos de *T. hamatum* utilizada.

Flores de feijão foram pulverizadas com 5 ml de uma suspensão de *T. hamatum* contendo 10^3 , 10^4 , 10^5 ou 10^6 esporos/ml, e o controle da podridão das vagens obtido foi de 77, 97, 100 e 100%, respectivamente, indicando que a máxima proteção é alcançada para concentrações da suspensão do antagonista de 10^4 esporos/ml.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que o controle biológico é mais efetivo durante um certo intervalo de tempo após a aplicação da levedura viva nas plantas. O período de proteção máxima vai dos 4 dias a 2 semanas sendo que depois disto ocorre um decréscimo na proteção.

BAKER et alii (1983) verificaram que no controle da ferrugem do feijão por *B. subtilis*, uma proteção de 90% é obtida quando a bactéria é aplicada nas folhas da planta, de 2 a 120 horas antes da inoculação com o patógeno.

Um fator que deve ser comentado é que a observação ao microscópio revelou que a levedura viva, nas condições mencionadas nos experimentos, é capaz de se multiplicar rapidamente na superfície foliar, elevando sua concentração inicial. Isto talvez possa explicar porque a aplicação da levedura imediatamente antes da inoculação determina uma proteção menor do que quando o tratamento é feito 1 ou 2 dias antes da aplicação do patógeno. Isto é, a concentração da levedura na superfície das folhas 1 ou 2 dias após o tratamento torna-se maior do que no momento de sua aplicação e, como foi verificado, a proteção determinada tem uma relação

com a concentração da levedura. Esta multiplicação da levedura "in vivo", poderia também explicar porque em alguns experimentos se observa um efeito de proteção maior com a utilização de células vivas em relação às células autoclavadas.

Uma vez que o efeito da antibiose e de diminuição da aderência dos uredíniosporos de *H. vastatrix* nas folhas, são os componentes importantes na proteção observada no presente trabalho, a perda de efeito com o tempo poderia ser devida à diluição dos princípios inibidores pela sua difusão através da superfície da folha, pela sua degradação ou por ambos. Os princípios inibidores, sejam eles metabólitos ou as próprias células da levedura, também poderiam ser retirados lentamente da superfície das folhas pela ação de fatores físicos do ambiente.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos para o presente trabalho, através dos resultados obtidos pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. O microorganismo *S. cerevisiae* comercial tem a capacidade de proteger plantas de café contra o patógeno *H. vastatrix*.

2. A proteção observada é devida a uma interação direta da levedura com o patógeno *H. vastatrix* tratando-se, portanto, de um efeito tipo controle biológico; não foi verificada nenhuma evidência de um efeito de indução de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.H.; BERBEE, F.M.; NORDHEIM, E.V. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Phytopathology, St. Paul, 73: 228-234, 1983.
- BAHAMISH, H.S. & WOOD, R.K.S. Induction of susceptibility and resistance of wheat leaves by preinoculation with high and low virulence races of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. Phytopathol. Z., Berlin, 113: 97-112, 1985.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Disease, St. Paul, 69: 770-772, 1985.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustures on bean leaves. Phytopathology, St. Paul, 73: 1148 - 1152, 1983.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. Role of the antagonist in Biological control. In: BAKER, K.F. & COOK, R.J., ed. Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1976. cap. 7, p.170-216.

- BALDER, H. & SCHOENBECK, F. The efficiency of induced resistance under practical culture conditions. II - Rust of chrysanthemum and carnation, downy mildew of rape, cucumber and lettuce. Journal of Plant Diseases and Protection, 90(2): 200-206, 1983.
- BECKER, J.O. & COOK, R.J. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. Phytopathology, St. Paul, 78: 778-782, 1988.
- BELL, A.A. & PRESLEY, J.T. Heat-inhibited or heat - killed conidia of *Verticillium albo-atrum* induce disease resistance and phytoalexin synthesis in cotton. Phytopathology, St. Paul, 59: 1147-1151, 1969.
- BERETTA, M.J.G.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Induced protection to *Hemileia vastatrix* at a distance from the site of the inducing action in coffee plants. Summa Phytopathol., Piracicaba, 3: 66-70, 1977.
- BERGAMIN FILHO, A. & PAIVA, S.E. A ferrugem do cafeeiro: uma revisão. Summa Phytopathol., Piracicaba, 9(3/4): 155-178, 1983.
- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Reviews of Phytopathology, Palo Alto, 20: 167-192, 1982.
- BOUDREAU, A.M. & ANDREWS, J.J.H. Factors influencing antagonism of *Chaetomium globosum* to *Venturia inaequalis*: a case study in failed biocontrol. Phytopathology, St. Paul, 77: 1470-1475, 1987.

- BROWN, N.A. Experiments with paris-daisy and rose to produce resistance to crown gall. Phytopathology, St.Paul, 13: 87-99, 1923.
- CARDOSO, J.E. & ECHANDI, E. Nature of protection of bean seedlings from rhizoctonia root rot by a binucleate *Rhizoctonia* - like fungus. Phytopathology, St. Paul, 77: 1548-1551, 1987.
- CARROL, R.B. & LUKEZIC, F.L. Induced resistance in alfalfa to *Corynebacterium insidiosum* by prior treatment with avirulent cells. Phytopathology, St. Paul, 62: 555-564, 1972.
- CARUSO, F.L. & KUČ, J. Protection of watermelon and muskmelon against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology, St. Paul, 67: 1285-1289, 1977a.
- CARUSO, F.L. & KUČ, J. Field protection of cucumber, watermelon and muskmelon against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology, St.Paul, 67: 1290-1292, 1977b.
- CARUSO, F. & KUČ, J. Induced resistance of cucumber to anthracnose and angular leaf spot by *Pseudomonas lachrymans* and *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant. Pathol., London, 14: 191-201, 1979.
- CHO, B.H. & SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Induction of resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in Near-Isogenic Barley Lines. Phytopathology, St. Paul, 76: 301-305, 1986.
- CLOUD, A.M.E. & DEVERALL, B.J. Induction and expression of systemic resistance to the anthracnose disease in bean. Plant Pathology, Oxford, 36: 551-557, 1987.

- COHEN, Y. & KUČ, J. Evaluation of systemic resistance to blue mold induced in tobacco leaves by prior stem inoculation with *Peronospora hyoscyami tabacina*. Phytopathology, St. Paul, 71: 783-787, 1981.
- COLIN, J.E. & CHAFIK, Z. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. Plant Disease, St. Paul, 70: 1048-1050, 1986.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. Components of Biological Control. In: COOK, R.J. & BAKER, K.F., ed. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. cap. 3, p.57-83.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & MANDRYK, M. The effect of stem infestation of tobacco with *Peronospora tabacina* Adam. on foliage reaction to blue mold. J. Aust. Inst. Agric. Sci., Australia, 26: 369-72, 1960.
- DEAN, R.A. & KUČ, J. Induced systemic protection in plants. Trends in Biotechnology, Lexington, 3(5): 125-129, 1985.
- DEAN, R.A. & KUČ, J. Induced systemic protection in Cucumber: effects of inoculum density on symptoms development caused by *Colletotrichum lagenarium* in previously infected and uninfected plants. Phytopathology, St. Paul, 76: 186-189, 1986.
- DEHNE, H.W.; STENZEL, K.; SCHOENBECK, F. The efficiency of induced resistance under practical culture conditions. III. Reproduction of powdery mildew on induced resistant plants. Journal of Plant Diseases and Protection, 91(3): 255-265, 1984.
- DOKE, N.; RAMIREZ, A.V.; TOMIYAMA, K. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. J. Phytopathology, Berlin, 119: 232-239, 1987.

- DU PLESSIS, H.J.; HATTINGH, M.J.; VAN VUUREN, H.J.J. Biological control of crown gall in South Africa by *Agrobacterium radiobacter* Strain K84. Plant Disease, St. Paul, 69: 302-305, 1985.
- ELAD, Y. & BAKER, R. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp by *Pseudomonas* spp. Phytopathology, St. Paul, 75: 1053-1059, 1985.
- ELAD, Y. & CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping off by bacteria. Phytopathology, St. Paul, 77: 190-195, 1987.
- ELLISTON, J.E.; KUČ, J.; WILLIAMS, E.B. Induced resistance to bean anthracnose at a distance from the site of the inducing interaction. Phytopathology, St. Paul, 61: 1110-1112, 1971.
- ELLISTON, J.E.; KUČ, J.; WILLIAMS, E.B. Protection of *Phaseolus vulgaris* against anthracnose by *Colletotrichum* species nonpathogenic to bean. Phytopathol. Z., Berlin, 86: 117-126, 1976.
- FILONOW, A.B. & LOCKWOOD, J.L. Evaluation of several actinomyces and the fungus *Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. Plant Disease, St. Paul, 69: 1033-1036, 1985.
- FRAVEL, D.R.; KIM, K.K.; PAPAVIZAS, G.C. Viability of microsclerotia of *Verticillium dahliae* reduced by a metabolite produced by *Talaromyces flavus*. Phytopathology, St. Paul, 77: 616-619, 1987.

- GRABSKI, G.B. & MENDGEN, K. Die parasitierung des Bohnenros-
tes *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* durch den
Hyperparasiten *Verticillium lecanii*: Untersuchungen zur
Wirt Erkennung, penetration und Abbau der Rostpilzaporen.
J. Phytopathology, Berlin, 115: 116-123, 1986.
- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F.; BACH, E.E.; MORAES, W.B.C.; MAR-
SIGLIO, A.F.; LOPES, A.M.Q.; PUCCA, L.E. Indução de re-
sistência em cafeeiros suscetíveis à *Hemileia vastatrix*
por exopolissacarídeos de *Xanthomonas campestris* pv. *ma-
nihotis*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12: 130.
1987a (Resumo)
- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Induced protec-
tion of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial
purification of the extracellular inducer from heat-killed
urediniospores of the pathogen. Fitopatologia Brasileira,
Brasília, 4: 76-84, 1987b.
- HAHN, M.G. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIV.
Isolation and partial characterization of an elicitor from
yeast extract. Plant Physiology, Rockville, 62: 107-111,
1978.
- HAMMERSCHMIDT, R. & KUČ, J. Lignification as a mechanism for
induced systemic resistance in cucumber. Physiol. Plant
Pathol., London, 20: 61-71, 1982.
- HAMMERSCHMIDT, R.; MUCKLES, E.; KUČ, J. Association of enhan-
ced peroxidase activity with induced systemic resistance
of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant
Pathol., London, 20: 73-82, 1982.

- HATTINGH, M.J.; BEER, S.V.; LAWSON, E.W. Scanning electron microscopy of apple blossoms colonized by *Erwinia amylovora* and *E. herbicola*. Phytopathology, St. Paul, 76: 900-904, 1986.
- HELLER, W.E. & GESSLER, C. Induced systemic resistance in tomato plants against *Phytophthora infestans*. J. Phytopathology, Berlin, 116: 329-337, 1986.
- HILLOCKS, R.J. Cross protection between strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* and its effect on vascular resistance mechanisms. J. Phytopathology, Berlin, 117: 216-225, 1986.
- HOCH, H.C. & ABAWI, G.S. Mycoparasitism of oospores of *Pythium ultimum* by *Fusarium merismoides*. Mycologia, New York, 71(3): 621-625, 1979.
- HUBERT, J.J. & HELTON, A.W. A translocated resistance phenomenon in *Prunus domestica* induced by initial infection with *Cytospora cineta*. Phytopathology, St. Paul, 57:1094-1098, 1967.
- ICHIELEVICH-AUSTER, M.; SNEH, B.; KOLTIN, Y.; BARASH, I. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia* species by a nonpathogenic isolate of *R. solani*. Phytopathology, St. Paul, 75: 1080-1084, 1985.
- ISENBECK, M. & SCHULZ, F.A. Biological control of fireblight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) on Ornamentals. I. Control of the pathogen by antagonistic bacteria. J. Phytopathology, Berlin, 113: 324-333, 1985.

- ISEMBECK, M. & SCHULZ, F.A. Biological control of fire-blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) on Ornamentals. II. Investigation about the mode of action of the antagonistic bacteria. J. Phytopathology, Berlin, 116: 308-314, 1986.
- JENNS, A. & KUČ, J. Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. Phytopathology, St. Paul, 69: 753-756, 1979.
- JENNS, A. & KUČ, J. Characteristics of anthracnose resistance induced by localized infection with tobacco necrosis virus. Physiol. Plant Pathol., London, 17: 81-91, 1980.
- JENNS, A.E.; CARUSO, F.L.; KUČ, J. Non-specific resistance to pathogens induced systemically by local infection of cucumber with tobacco necrosis virus, *Colletotrichum lagenarium* or *Pseudomonas lachrymans*. Phytopathologia Mediterranea, 18: 129-134, 1979.
- KIM, K.K.; FRAVEL, D.R.; PAPAVIZAS, G.C. Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in biocontrol of *Verticillium dahliae*. Phytopathology, St. Paul, 78: 488-492, 1988.
- KIMATI, H. Resistência de fitopatôgenos a defensivos agrícolas. Summa Phytopathol., Piracicaba, 13: 72-76, 1987.
- KNUDSEN, G.R. & SPURR, H.W. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. Plant Disease, St. Paul, 71: 442-445, 1987.

- KUČ, J. Induced systemic resistance to plant disease and phytointerferons-are they compatible? Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10: 17-40, 1985.
- KUČ, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet, H.P., ed. Offprints from innovative approaches to plant disease control. USA, John Wiley & Sons, Inc., 1987. cap. 12, p.255-274.
- KUČ, J. & RICHMOND, S. Aspects of the protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology, St. Paul, 67: 533-536, 1977.
- KUČ, J.; SHOCKLEY, G.; KEARNEY, K. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant Pathol., London, 7: 195-199, 1975.
- LIFSHITZ, R.; WINDHAM, M.T.; BAKER, R. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. Phytopathology, St. Paul, 76: 720-725, 1986.
- LITTEFIELD, L.J. Flax rust resistance induced by prior inoculation with an avirulent race of *Melampsora lini*. Phytopathology, St. Paul, 59: 1323-1328, 1969.
- LOEFFLER, W.; TSCHEN, J.S-M.; VANITTANAKON, N.; KUGLER, M.; KNORPP, E.; HSIEH, T-F.; WU, T-G. Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. J. Phytopathology, Berlin, 115: 204-213, 1986.
- LOVREKOVICH, L. & FARKAS, G.L. Induced protection against wild fire disease in tobacco leaves treated with heat - killed bacteria. Nature, London, 205: 823-824, 1965.

- LOZANO, J.C. & SEQUEIRA, L. Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco leaves by heat-killed bacterial cells. Phytopathology, St. Paul, 60: 875-879, 1970.
- LUZ, W.C. Efeito dos microorganismos do filoplano sobre as manchas fúngicas foliares de trigo. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10: 73-78, 1985.
- MAROIS, J.J.; JOHNSTON, S.A.; DUNN, M.T. & PAPAVIDAS, G. C. Biological control of verticillium wilt of eggplant in the field. Plant Disease, St. Paul, 66: 1166-1168, 1982.
- MARTINS, E.M.F. Sequência de eventos primários do desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* em folhas de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. Piracicaba, 1988. 149p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MARTINS, E.M.F.; BERETTA, M.J.G.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 10: 521-529, 1985.
- MARTINS, E.M.F.; DE MARIA, A.C.; STOCKER, G.G.; MORAES, W.B. C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat-treatment. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 11: 899-909, 1986.
- MATTIELLO, J.B. et alii. In: Cultura de Café no Brasil, Manual de Recomendações, Rio de Janeiro, IBC-GERCA, 5ª edição, 1985. p.580.

- McINTYRE, S.L.; KUČ, J.; WILLIAMS, E.B. Protection of pear against fireblight by bacteria and bacterial sonicates. Phytopathology, St. Paul, 63: 872-877, 1973.
- McKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathology, St. Paul, 76: 136-139, 1986.
- MEDEIROS, A.G. Informe sobre "*Hemileia vastatrix*" em café, em Bahia, Brasil, Rio de Janeiro. Com. Exec. Pl. Recup. Econ. Rural Lav. Cacaueira, 1970.
- MENDGEN, K. Growth of *Verticillium lecanii* in pustules of stripe rust (*Puccinia striiformis*). Phytopathol. Z., Berlin, 102: 301-309, 1981.
- MÉTRAUX, J.P. & BOLLER, Th. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infections. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, 28: 161-169, 1986.
- MITCHELL, J.K. & TABER, R.A. Factors affecting the biological control of *Cercosporidium* leaf spot of peanuts by *Dicyma pulvinata*. Phytopathology, St. Paul, 76: 990-994, 1986.
- MONACO, L.C. Consequences of the introduction of coffee rust into Brasil. Annals of New York Academy of Sciences, New York, 287: 57-71, 1977.
- MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; MUSEMECI, M.R.; BERETTA, M. J.G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. Summa Phytopathol., Piracicaba, 2: 39-43, 1976.

- NELSON, M.E. & POWELSON, M.L. Biological control of grey mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. Plant Disease, St. Paul, 72: 727-729, 1988.
- ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* of Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology, St. Paul, 78: 84-88, 1988.
- OSTAZESKI, S.A. Resistance induced by race 1 of *Colletotrichum trifolii* to race 2 in alfalfa resistant to race 1. Plant Disease, St. Paul, 68: 285-288, 1984.
- OUCHI, S.; OKU, H.; HIBINO, C.; AKIYAMA, I. Induction of accessibility and resistance in leaves of barley by some races of *Erysiphe graminis*. Phytopathol. Z., Berlin, 79: 24-34, 1974.
- PARK, C-S; PAULITZ, T.C.; BAKER, R. Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, St. Paul, 78: 190-194, 1988.
- PASCHOLATI, S.F.; MORAES, W.B.C.; FIGUEIREDO, M.B.; OLIVEIRA, A.F. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculation with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 11: 507-514, 1986.
- REDMOND, J.C.; MAROIS, J.J.; MacDONALD, J.C. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. Plant Disease, St. Paul, 71: 799-802, 1987.
- RICHMOND, S.; KUČ, J.; ELLISTON, J.E. Penetration of cucumber leaves by *Colletotrichum lagenarium* in leaves of barley by some races of *Erysiphe graminis*. Physiol. Plant Pathol., London, 14: 329-333, 1979.

- ROSS, A.F. Systemic acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. Virology, New York, 14: 329-339, 1961.
- ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.R.R.; MORAES, W.B.C. Controle alternativo da ferrugem do cafeeiro pela utilização de produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12: 137. 1987 (Resumo)
- ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.R.R.; MORAES, W.B.C. *Bacillus thuringiensis* - A new perspective for an induced protection to coffee leaf rusts. J. Phytopathology, Berlin, 126: 149-159, 1989.
- SCHIEBER, E. & ZENTMYER, G.A. Coffee rust in the Western Hemisphere. Plant Disease, St. Paul, 68(2): 89-93, 1984.
- SCHOENBECK, F.; DEHNE, H.W.; BEIGHT, W. Activation of unespecific resistance mechanisms in plants. Journal of Plant Disease and Protection, 87(10/11): 654-666, 1980.
- SEQUEIRA, L. Mechanism of induced resistance in plants. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto, 37: 51-79, 1983.
- SHAW, D.; BOURKE, R.M.; BELL, S.; SHAW, B. Implication of the 1986 outbreak of coffee rust in Papua New Guinea. Australia National Centre for Development Studies. The Australian National University, 1986. 110p. Islands/Australia Working Paper nº 86/45.
- SINHA, A.K. & TRIVEDI, W. Resistance induced in rice plants against *Helminthosporium* infection. Phytopathol. Z., Berlin, 74: 182-191, 1972.

- SKIPP, R.A. & DEVERAL, B.S. Studies on cross-protection in the anthracnose disease of bean. Physiol. Plant Pathol., London, 3: 299-313, 1974.
- SMITH, E.F.; BROWN, N.A.; TOWNSEND, C.O. Crown gall of plants: its cause and remedy. U.S. Dept. Ag. Bur. Plant Indust. Bull., 213: 1911.
- SNEH, B.; DUPLER, M.; ELAD, Y.; BAKER, R. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a Fusarium-suppressive soil. Phytopathology, St.Paul, 74:1115-1124, 1984.
- SRIVASTAVA, A.K.; DEFAGO, G.; KERN, H. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. Phytopathol. Z., Berlin, 114: 73-78, 1985.
- SULE, S. Induced resistance in tomato against *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by prior inoculation with *Pseudomonas syringae* pathovars. J. Phytopathology, Berlin, 122: 343-350, 1988.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. & SMEDGARD-PETERSEN, V. Comparison of resistance-inducing abilities of virulent and avirulent races of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and a race of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* in barley. Plant Pathology, Oxford, 37: 20-27, 1988.
- TRIVEDI, N. & SINHA, A.K. Resistance induced in rice plants against *Helminthosporium* - infection by treatment with various fungal fluids. Phytopathol. Z., Berlin, 86: 335-344, 1976.
- TU, J.C. Antibiosis of *Streptomyces griseus* against *Colletotrichum lindemuthianum*. J. Phytopathology, Berlin, 121: 97-102, 1988.

- TUZUN, S. & KUČ, J. A modified technique for inducing systemic resistance to blue mold and increasing growth in tobacco. Phytopathology, St. Paul, 75: 1127-1129, 1985a.
- TUZUN, S. & KUČ, J. Movement of a factor in tobacco infected with *Peronospora tabacina* Adam which systemically protects against blue mold. Plant Pathol., London, 26: 321-330, 1985b.
- TUZUN, S. & KUČ, J. Persistence of induced systemic resistance to blue mold in tobacco plants derived via tissue culture. Phytopathology, St. Paul, 77: 1032-1035, 1987.
- TUZUN, S.; NESMITH, W.; FERRISS, R.S. & KUČ, J. Effects of stem injections with *Peronospora tabacina* on growth of tobacco and protection against blue mold in the field. Phytopathology, St. Paul, 76: 938-941, 1986.
- WALTHER, D. & GINDRAT, D. Antagonism of *Rhizoctonia* spp. to *Pythium oligandrum* and damping-off fungi. J. Phytopathology, Berlin, 119: 248-254, 1987.
- WELTZIEN, H.C. & KETTERER, N. Control of downy mildew, *Plasmopara viticola* (de Bary) Berlese et de Toni, on grapevine leaves through water extracts from composted organic wastes. J. Phytopathology, Berlin, 116: 186-188, 1986.
- YARWOOD, C.E. Cross protection with two rust fungi. Phytopathology, St. Paul, 46: 540-544, 1956.