



MARIE CAROLINE FERREIRA LABORDE

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS SAPRÓBIOS NA
SOBREVIVÊNCIA DE *Cercospora coffeicola***

LAVRAS - MG

2014

MARIE CAROLINE FERREIRA LABORDE

AVALIAÇÃO DE FUNGOS SAPRÓBIOS NA SOBREVIVÊNCIA DE
Cercospora coffeicola

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

Orientador

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

LAVRAS – MG

2014

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

Laborde, Marie Caroline Ferreira.

Avaliação de fungos sapróbios na sobrevivência de *Cercospora coffeicola* / Marie Caroline Ferreira Laborde. – Lavras : UFLA, 2014.

48 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros.

Bibliografia.

1. *Phialomyces macrosporus*. 2. Sobrevivência. 3. Biocontrole.
4. Mancha de olho pardo. 5. Coffea arábica. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 633.73932

MARIE CAROLINE FERREIRA LABORDE

AVALIAÇÃO DE FUNGOS SAPRÓBIOS NA SOBREVIVÊNCIA DE
Cercospora coffeicola

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

APROVADA em 15 de agosto de 2014.

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

LAVRAS – MG

2014

À minha família, pela contribuição para que esta etapa fosse realizada

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros, pela orientação e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Projeto SISBIOTA FAPESP e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café) e aos professores Sérgio Paqscholati e Mário Lúcio V. de Resende, respectivamente, seus coordenadores, pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende, pela amizade e confiança e também por ceder seu laboratório para a realização dos trabalhos.

A Dayana Botrel e Rodolfo Teixeira pela ajuda na condução dos ensaios e amizade construída desde o início do desenvolvimento dos trabalhos.

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

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial a pós-doutoranda Deila Magna do Santo pela paciência e disposição para ensinar.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos meus pais Patrick e Dalva e a minha irmã Emiliel, pelo amor e apoio que me deram por toda a vida.

Enfim, a todas as pessoas que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para que esta etapa fosse cumprida.

RESUMO

Fungos sapróbios podem contribuir para o controle de doenças de plantas e esse controle pode se dar pela proteção de plantas tratadas preventivamente ou pela redução da sobrevivência de patógenos necrotróficos nos restos culturais. Fungos sapróbios foram avaliados quanto à habilidade em inibir o desenvolvimento de *Cercospora coffeicola* em restos culturais, bem como os mecanismos de ação envolvidos no biocontrole. Em um primeiro ensaio, foi selecionado o fungo sapróbio, considerado mais promissor no controle de *C. coffeicola*. Utilizou-se como controle positivo, nesse ensaio, o produto comercial Compost-Aid® em associação com Soil Set, e, o controle negativo, água. No segundo ensaio, foi avaliada a habilidade do sapróbio em controlar a doença, quando exposto a condições de estresse abiótico, com o objetivo de simular condições de campo. Os períodos de interrupção do molhamento foliar foram as zero e 61 horas após a aplicação dos tratamentos. Em seguida, as folhas foram incubadas e, posteriormente, foi determinada a viabilidade e quantidade de conídios do patógeno. Para a determinação dos mecanismos de ação utilizados no biocontrole, foi avaliada a contribuição da antibiose. A antibiose e produção de voláteis em três diferentes meios de cultura foi avaliada pela inibição direta do patógeno em placas durante 10 dias. Para antibiose, as variáveis respostas analisadas foram crescimento micelial e número de conídios, já, para a produção de voláteis, as variáveis foram crescimento, germinação e quantidade de conídios. Para verificar o mecanismo de competição por nutrientes, foi realizada análise da determinação e quantificação de enzimas pectinolíticas. A partir desses resultados, avaliou-se a contribuição exclusiva dos conídios, sobrenadante, conídios + sobrenadante e do sobrenadante contendo a enzima poligalacturonase, produzida pelo fungo sapróbio, na aceleração da degradação do tecido foliar. Para isso, foram coletadas amostras de folhas de café naturalmente infectadas por *C. coffeicola*. Após o período de incubação, foi determinado o número de conídios de *C. coffeicola* e a contribuição de cada tratamento, na aceleração da degradação das lesões. O fungo *Phialomyces macrosporus* foi o mais eficiente na redução da viabilidade do patógeno em restos culturais. Esse fungo reduziu a viabilidade dos conídios do patógeno em 40%. Não foi possível determinar a contribuição de cada estrutura fúngica na diminuição do número de conídios do patógeno, tampouco na aceleração da degradação da lesão de mancha de olho pardo. Portanto, *P. macrosporus* tem potencial para ser utilizado na redução da viabilidade de *C. coffeicola* em restos culturais, sendo os possíveis mecanismos de ação utilizados por esse bioagente a produção de compostos antimicrobianos.

Palavras-chave: *Phialomyces macrosporus*. Sobrevivência. Biocontrole. Mancha de olho pardo. *Coffea arabica*.

ABSTRACT

Saprobic fungi might contribute to in controlling plant diseases and this control might occur by means of the protection of plants preventively treated or by the reduction of the survival of necrotrophic pathogens in the culture residue. Saprobic fungi were evaluated regarding the ability of inhibiting the development of *Cercospora coffeicola* in culture residue, as well as the action mechanisms involved in the biocontrol. In a first trial, a saprobic fungi considered the most promising in controlling *C. coffeicola* was selected. In this trial, the commercial product Compost-Aid[®] was used as positive control in association with Soil Set and, as negative control, water. In the second trial, the ability of the saprobic in controlling the disease when exposed to abiotic stress conditions was evaluated, with the objective of simulating field conditions. The interruption of foliar wetting periods were zero and 61 hours after applying the treatments. Subsequently, the leaves were incubated and, posteriorly, the viability and quantity of pathogen conidia were determined. To determine the action mechanism used in the biocontrol, the contribution of antibiosis was evaluated. The antibiosis and the production of volatiles in three different culture mediums was evaluated by direct inhibition of the pathogen in dishes during 10 days. For the antibiosis, the analyzed response variables were mycelial growth and number of conidia, which for the production of volatiles the variables were growth, germination and number of conidia. To verify the nutrient competition mechanism, analyses of the determination and quantification of the pectinolytic enzymes was performed. With these results, the exclusive contribution of the conidia, supernatant, conidia + supernatant and the supernatant containing the polygalacturonase enzyme, produced by the saprobic fungi in the acceleration of foliar tissue degradation, were evaluated. In order to do this, samples of coffee leaves naturally infected by *C. coffeicola* were collected. After the incubation period, the number of *C. coffeicola* conidia and the contribution of each treatment in the acceleration of lesion degradation were evaluated. The *Phialomyces macrosporus* fungi was the most efficient in reducing the viability of the pathogen in culture residue. This fungus reduced the viability of the pathogen conidia in 40%. It was impossible to determine the contribution of each fungal structure in the decrease in the number of pathogen conidia, as well as in the acceleration of lesion degradation of the brown-eye spot. Therefore, *P. macrosporus* has potential for use in the reduction of the viability of *C. coffeicola* in culture residue, with the possible action mechanisms used by this bioagent being the production of antimicrobial compounds.

Keywords: *Phialomyces macrospores*. Survival. Biocontrol. Brown-eye spot. *Coffea Arabica*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	A cultura do cafeeiro	12
2.2	Cercosporiose do cafeeiro	12
2.3	Controle biológico	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Obtenção das mudas	18
3.2	Cultivo e ajuste da concentração dos fungos sapróbios	18
3.3	<i>Cercospora coffeicola</i>	19
3.4	Seleção dos isolados	19
3.5	Efeito da aplicação do fungo selecionado na supressão da esporulação de <i>C. coffeicola</i> sobre condições de estresse abiótico	21
3.6	Produção de voláteis	22
3.7	Teste de antagonismo com confrontação direta	22
3.8	Análise do isolado <i>Phialomyces macrosporus</i> quanto à produção de pectinase total em meio sólido por meio do halo de degradação de pectina	23
3.9	Manutenção da cultura	23
3.10	Condições de cultivo de <i>Phialomyces macrosporus</i> em agitador orbital para a produção da enzima poligalacturonase	24
3.11	Avaliação da produção de massa micelial	24
3.12	Determinação da atividade de poligalacturonase	24
3.13	Efeito da contribuição exclusiva dos conídios, sobrenadante, conídios + sobrenadante e do sobrenadante, contendo a enzima poligalacturonase produzida pelo fungo sapróbio, a aceleração da degradação do tecido foliar	25
4	RESULTADOS	27
4.1	Seleção dos isolados sapróbios	27
4.2	Efeito da aplicação do fungo selecionado na supressão da esporulação de <i>C. coffeicola</i> sobre condições de estresse abiótico	28
4.3	Antagonismo com confrontação direta	29
4.4	Produção de voláteis	31
4.5	Produção de pectinase total em meio sólido	32
4.6	Determinação da atividade de enzima poligalacturonase e massa micelial	33
4.7	Efeito da contribuição exclusiva dos conídios, sobrenadante, conídios + sobrenadante e do sobrenadante contendo a enzima poligalacturonase produzida pelo fungo sapróbio, o na aceleração da degradação do tecido foliar	35

5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como o maior produtor e exportador mundial de café, sendo essa cultura uma das principais *commodities* produzidas no país. Destacam-se as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canéphora* como as mais importantes economicamente (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). A estimativa de produção para a safra 2014, no Brasil, é de, aproximadamente, 44,56 milhões de sacas, sendo a produção de café arábica correspondente a 75,1% do volume total produzido pelo país, o qual tem como maior produtor o estado de Minas Gerais (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

Uma série de fatores limitam a produtividade da cultura do café, tais como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais e, principalmente, a presença de pragas e doenças (KUTYWAYO et al., 2013). A cercosporiose do cafeeiro, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berkeley e Cooke é um fungo necrotrófico exclusivo do gênero *Coffea*. Os danos ocasionados pela doença podem ser quantitativos, como a redução no rendimento e produção da cultura e, qualitativos depreciando o produto e a qualidade da bebida (LIMA; CUSTÓDIO; GOMES, 2008; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

O controle da cercosporiose envolve, basicamente, o uso de fungicidas, os quais, além de aumentar os custos da produção, também contaminam o meio ambiente e são tóxicos ao homem (CARVALHO et al., 2008). Assim, a adoção de métodos alternativos no controle de doenças é importante para diminuir o uso de agrotóxicos. Dentre esses, o biocontrole por meio da utilização de microrganismos se destaca, em razão da diversidade de mecanismos de ação que podem atuar em conjunto no controle da doença.

Os fungos sapróbios têm recebido atenção especial no biocontrole de doenças do cafeeiro. Acredita-se que, pelo fato destes terem sido isolados de

regiões de clima adverso, eles possuam a capacidade de estabelecimento e manutenção do controle em ampla faixa de temperatura e umidade. Esses fungos, além de serem promissores agentes de biocontrole de doenças, também desempenham importante função na manutenção do equilíbrio do ecossistema, por meio da decomposição de compostos orgânicos (MOORE et al., 2004).

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de selecionar fungos sapróbios na supressão de *Cercospora coffeicola* presente em restos culturais, bem como determinar o (s) seus(s) mecanismo(s) de controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do cafeeiro

O café é uma planta originária do continente africano, das regiões de altitude elevada na Etiópia (OLIVEIRA; OLIVEIRA; MOURA, 2012). É uma planta de porte arbustivo ou arbóreo, de caule lenhoso, lignificado, reto, com sistema radicular pivotante (MATIELLO et al., 2005). É perene de clima tropical, adaptada à sombra, pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* (BRIDSON, 1994). Dentre as espécies, apenas duas são cultivadas comercialmente: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P., sendo a primeira responsável por 75% da produção mundial, enquanto a segunda, apenas por 25% dessa produção (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

O café é uma das commodities mais negociadas no comércio internacional e o Brasil encontra-se, atualmente, como maior produtor e exportador mundial dessa cultura (FURLAN JÚNIOR et al., 2007). Segundo a Companhia Nacional de abastecimento – CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014) estima-se que o Brasil produzirá entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas de café. A produção de café arábica correspondente a 75,1% do volume de café produzido pelo país, o qual tem como maior produtor o estado de Minas Gerais. No entanto, sua produção é frequentemente afetada por diversas doenças dentre estas, destaca-se a cercosporiose do cafeeiro.

2.2 Cercosporiose do cafeeiro

A mancha-de-olho-pardo ou cercosporiose, cujo agente causal é a *Cercospora coffeicola*, é uma das doenças mais antigas do cafeeiro. A doença foi reportada, primeiramente, na Jamaica, em 1881 e em 1901. Esta já se encontrava

no Brasil, em plantas de café cultivadas na região de Araraquara e Campinas no estado de São Paulo (NOACK, 1901).

A doença pode ocorrer tanto em viveiros como em plantas já estabelecidas no campo sendo considerada mais severa em situações de estresse hídrico ou/e deficiências nutricionais (GARCÍA JÚNIOR, 2003; CARVALHO et al., 2008). A cercosporiose do cafeeiro era considerada doença secundária relacionada a deficiências nutricionais, no entanto, nas últimas décadas, com a implantação de lavouras nas regiões do cerrado e em regiões altas com solos pouco férteis a doença vem ganhando cada vez mais importância (RICCI; ARAÚJO; FRANCH, 2002).

O agente causal da doença é patógeno necrotrófico, o qual pertence à classe dos fungos mitospóricos, ordem Moniliales e família Dematiaceae (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

A fase teleomórfica do patógeno é desconhecida. As características morfológicas de *C. coffeicola* são formação de estruturas reprodutivas, conidióforos e conídios no centro das lesões em ambas as faces das folhas (ZAMBOLIM et al., 1997). Os conidióforos são cilíndricos e septados, agrupando-se em conformação de esporodóquio. Na extremidade de cada conidióforo formam-se conídios hialinos, multisseptados, de extremidade afilada (CHUPP, 1953; GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997).

As condições favoráveis ao desenvolvimento da doença são umidade relativa em torno de 80% e temperatura média entre 18 e 24 °C (POZZA; ALVES; 2008). Período de molhamento foliar de 6 a 12 horas, resulta em máxima severidade da cercosporiose, sendo o período de incubação médio de 16 dias (FERNANDES et al., 1991). Os conídios de *C. coffeicola* podem permanecer viáveis por quase nove meses em restos culturais (FERNANDES, 1988), aguardando condições favoráveis para sua germinação, como

temperaturas ótimas, em torno de 24 °C, para, então, dar início a novas infecções.

O fungo pode infectar folhas e frutos. Os sintomas nas folhas manifestam-se pelo aparecimento de manchas circulares, de coloração castanho-claro a escura, com o centro branco acinzentado, quase sempre envolvidas por um halo amarelo. Já, nos frutos, aparecem manchas escuras com o aspecto seco (SOUZA et al., 2011). As lesões coalescem formando áreas necróticas e ocorre assim, a desfolha precoce da planta. Já, nos frutos, as lesões surgem próximas à maturação, caracterizadas por pequenas manchas necróticas, deprimidas de coloração marrom ou arroxeadas, dando aos frutos uma aparência de ressecamento, além de causar a maturação acelerada dos frutos, reduzindo sua qualidade (CASTAÑO, 1956; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Na falta de um manejo adequado e sob condições favoráveis para o desenvolvimento da doença as perdas na produção de café podem chegar a 50% (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

As medidas de manejo dessa doença, estão praticamente restritas ao uso de fungicidas e a práticas culturais, como formação de viveiros em local arejado, utilização de substratos balanceados em nutrientes, controle da irrigação e do excesso de insolação nas mudas. Já, em relação ao controle químico da cercosporiose, podem ser utilizados fungicidas cúpricos, benzimidazóis e estrobirulinas. São utilizados fungicidas cúpricos alternados com fungicidas sistêmicos (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005; PATRICIO et al., 2008).

Assim, um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos de controle eficientes, os quais acarretem baixo impacto ambiental, procurando preservar a microbiota e garantir a qualidade final do produto. Dessa forma, o controle biológico seria uma interessante ferramenta a ser utilizada no manejo da doença.

2.3 Controle biológico

A exigência por produtos saudáveis associada à preservação ambiental, tem atraído grande atenção para formas de controle alternativo de doenças. Nesse contexto, o controle biológico de doenças de plantas se destaca como uma importante ferramenta. O controle biológico é definido como a redução do inóculo ou das atividades determinantes da doença, realizado por meio de um ou mais organismos que não seja o homem (HELYER; CATTILIN; BROWN, 2014).

As interações antagônicas envolvidas no biocontrole de patógenos necrotróficos podem ser, de maneira geral, produção de compostos antimicrobianos, micoparasitismo e competição por nutriente, podendo ocorrer apenas um mecanismo ou uma associação entre estes (KOHL; FOKKEMA, 1998).

A antibiose pode ser definida como uma interação específica em que o microrganismo alvo é suprimido por compostos tóxicos provenientes do metabolismo secundário do antagonista (ALABOUVETTE et al., 2009; HAAS; DÉFAGO, 2005).

As moléculas voláteis são compostas com baixa massa molecular e podem pertencer a diversas classes químicas como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre (CHIRON; MICHELOT, 2005; KORPI; JAMBERG; PASANEN, 2009; ORTIZ-CASTRO et al., 2009).

Compostos antimicrobianos produzidos pelo isolado E325 de *Pantoea agglomerans*, quando aplicados em estigma de flores de maçã, foram responsáveis pela supressão do patógeno *Erwinia amylovora*, demonstrando ter importante função no biocontrole desse patógeno (PUSEY, 2011).

Carolina et al. (2014) avaliaram a ação antagônica de espécies de *Trichoderma* contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. Algumas espécies do antagonista em estudo chegaram a suprimir o

desenvolvimento do patógeno em até 70%, sendo a antibiose considerada um dos principais mecanismos de ação desse bioagente.

A aplicação dos metabólitos de bioagentes obtidos via cultivo massal ou por meio de síntese química, pode viabilizar a obtenção de novos biofertilizantes e biopesticidas, baseados em compostos bioativos. Assim, esses compostos, em associação com a tecnologia “ômica” representam nova fronteira de bioprospecção, sendo uma área extremamente promissora no controle de doenças de plantas (SHANNON et al., 2012).

O biocontrole por meio do micoparasitismo resulta em complexa interação entre o patógeno e o agente de controle biológico, o que envolve uma sequência de eventos, incluindo reconhecimento, ataque e subsequente penetração e morte do hospedeiro, por meio de produção ou não de enzimas hidrolíticas (LI et al., 2002).

Em relação ao mecanismo de competição, uma nova abordagem está sendo feita por meio da utilização de enzimas hidrolíticas, produzidas por microrganismos, na aceleração da degradação de resíduos orgânicos (SCHIMPF et al., 2013). A parede celular dos vegetais é estrutura complexa e dinâmica dividida em três regiões estruturais: parede primária, parede secundária e lamela média (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Essas regiões estruturais são constituídas em maior abundância por polissacarídeos, proteínas e, algumas vezes, por lignina (CAFFAL; MOHNEN, 2009). Os polissacarídeos, por sua vez, são, geralmente, divididos em celulose, hemicelulose e pectina, sendo a última responsável por 30% da composição da parede celular (CAFFAL; MOHNEN, 2009). A pectina, apesar de heterogenia é bem definida, sendo composta por homogalacturano, ramnogalacturano I, ramnogalacturano I e xilogalacturano, os quais são ligados entre si por meio de ligações covalentes. A quantidade de cada unidade de polissacarídeo varia de acordo com a espécie, no entanto, de maneira geral, homogalacturano constitui aproximadamente 65% da

estrutura de pectina (HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010). Considerando a heterogeneidade da pectina, é necessário um conjunto de enzimas pectinolíticas atuando em conjunto, de forma coordenada para sua completa degradação (YADAV et al., 2009).

As pectinases são classificadas segundo alguns critérios, com base no modo de ação, podendo ser poligalacturonases, pectina esterase, pectina liase e pectato liase dependendo se as clivagens são aleatórias ou longitudinalmente (endo ou exo) e com base nos requisitos de pH ideal para a atividade enzimática, temperatura entre outros fatores (FALMY et al., 2008; AHLAWAT et al., 2009).

Essas enzimas são utilizadas em larga escala, na indústria alimentícia, durante as etapas de maceração ou extração de suco de frutas e vinhos, dentre outras aplicações (PEDROLLI et al., 2009).

Entretanto, além do uso das enzimas pectinolíticas para a indústria alimentícia, alguns trabalhos relatam sua eficácia na aceleração da degradação de compostos orgânicos (WANG; DAI, 2011).

Os gêneros *Phoma*, *Phomopsis* e *Alternaria* isolados de *Colophospermum mopane* apresentaram atividade celulósica, acelerando a deiscência de vagens o que resultou em rápida germinação das sementes (JORDAAN; TAYLOR; ROSSENKLAN, 2006).

Diversos estudos comprovam a eficácia dos fungos sapróbios na degradação da matéria orgânica, por meio da produção de enzimas hidrolíticas, tendo, portanto, importante função no equilíbrio do ecossistema. Esses fungos têm recebido atenção especial em relação ao seu uso no controle biológico de plantas, seja como potenciais indutores de resistência ou outros mecanismos (MOORE et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das mudas

Sementes de café (Cultivar Mundo Novo IAC 376-4) foram adquiridas da EPAMIG e semeadas em bandejas de plástico contendo areia como único substrato. Posteriormente, as mudas foram transferidas para sacos de cultivo, contendo como substrato terra e areia, na proporção de 3:1, juntamente com os adubos Super simples (300g) e N.P.K (900G) na mistura. As mudas permaneceram em casa de vegetação durante todo o experimento.

3.2 Cultivo e ajuste da concentração dos fungos sapróbios

Os fungos sapróbios foram obtidos da Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), situada na Universidade Estadual de Feira de Santana-BA (Tabela 1).

Tabela 1 Classificação e local de coleta de fungos sapróbios

Fungo	Classificação	Local de coleta
<i>Phialomyces macrosporus</i>	Ascomycota	Buíque, Pernambuco
<i>Curvularia inaequalis</i>	Ascomycota	Serra da Jibóia, Bahia
<i>Curvularia eragrostidis</i>	Ascomycota	Serra da Jibóia, Bahia

Os fungos foram cultivados em meio CMA (Cenoura 30,0g; Milho 30,0g; Agar 20,0g; 1 L de água) durante 7 dias. Após esse período, retirou-se um disco contendo micélio e esporo do fungo, o qual foi adicionado em Erlenmeyer contendo 100mL de meio CMA líquido. O Erlenmeyer foi mantido por 10 dias em Shaker (25-27° C), em rotação constante de 120 rpm. Após o cultivo, o conteúdo foi triturado e homogeneizado em liquidificador. Foi feita a

quantificação por meio da diluição em série, de unidades formadoras de colônia. Sendo a concentração utilizada nas pulverizações padronizadas para 3×10^4 ufc/mL.

3.3 *Cercospora coffeicola*

O isolado foi obtido da coleção de *Cercospora coffeicola* do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, localizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foi utilizada, com algumas modificações, a técnica da secagem micelial para induzir a esporulação de *C. coffeicola* (SOUZA; MIZUBUTI; MAFFIA, 2005). Sete discos de micélio (cada um com 1 cm de diâmetro) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer, contendo 10 mL de V8 e, permaneceram sob agitação constante em Shaker (25° C) a 120 rpm, durante quatro dias. Posteriormente, o conteúdo do Erlenmeyer foi transferido para placas de Petri, contendo ágar – água (15g ágar- 1L água) as quais, foram incubadas câmara de crescimento tipo B.O.D por dois dias, com o objetivo de induzir a esporulação do fungo. Após dois dias, 10mL de água destilada foi adicionada a cada placa e, com o auxílio de um bastão de vidro foram, superficialmente, raspadas. A suspensão obtida foi filtrada em gaze, e a concentração de esporos determinada por meio da contagem de esporos em hemocitômetro.

3.4 Seleção dos isolados

A seleção dos fungos sapróbios foi realizada em duas etapas. Primeiramente, plantas de café foram inoculadas com o patógeno a uma concentração de 3×10^4 conídios/mL. Após a inoculação, as plantas permaneceram por dois dias em câmara úmida e, posteriormente, foram

transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram para a realização dos ensaios. A partir do aparecimento dos primeiros sintomas característicos da cercosporiose, as mudas foram pulverizadas com os fungos sapróbios (10^4 conídios/mL), dando início às primeiras avaliações.

As avaliações foram feitas aos 0, 7 e 14 dias, após o aparecimento dos sintomas. Dez folhas sintomáticas foram coletadas por cada tratamento, estas foram transferidas para sacos plásticos juntamente com algodão umedecido e, permaneceram à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C e fotoperíodo de 12 horas) por 14 dias consecutivos.

A quantidade e viabilidade dos conídios de *C. coffeicola* foi determinado em cada período de avaliação. A lesão de cada folha foi recortada, e os fragmentos transferidos, juntamente com 1 mL de água destilada, contendo Tween a 20% (v/v), para tubos de ensaio com capacidade para 10 mL. Os tubos foram agitados em vortex, durante um minuto e, a partir dessa amostra, foi retirada uma alíquota para se fazer a quantificação dos conídios em hemocitômetro e, também, para avaliar a sua viabilidade.

Alíquotas de 400 μ L da suspensão final de cada tratamento foram transferidas para placas de Petri de 90x15mm de diâmetro, contendo, aproximadamente, 5 mL de ágar-água a 2%. As placas foram mantidas em B.O.D. e, após 6 h, aferiu-se o número de esporos germinados com o auxílio de microscópio ótico, a 100X. Foram considerados como conídios germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo igual ou maior que a metade do comprimento do esporo (BECKMAN; PAYNE, 1983).

Nessa etapa, foram utilizados três isolados de fungos sapróbios. Água destilada e o produto comercial Compost-Aid® (20g/L), juntamente com Soil set (5mL/L) como um único tratamento, foram utilizados como testemunhas negativa e positiva respectivamente. O produto comercial utilizado nos experimentos é um maturador de compostos, com potencial de uso para acelerar

a decomposição de folhas de citros (BELLOTTE et al., 2009). Foi considerado um isolado promissor para o controle da doença, aquele que diminuiu a esporulação ou viabilidade dos esporos do patógeno. O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados, sendo três blocos contendo cinco plantas em cada tratamento.

3.5 Efeito da aplicação do fungo selecionado na supressão da esporulação de *C. coffeicola* sobre condições de estresse abiótico

Nesta etapa, foi utilizado o fungo selecionado no item 3.4, o qual foi testado quanto a sua habilidade em controlar a doença sobre estresse abiótico, ou seja, sob variação de umidade e luz. A metodologia utilizada para a avaliação foi adaptada a partir do trabalho de Kohl et al (1995).

A quantidade e viabilidade dos conídios de *C. coffeicola* foi determinado a cada período de avaliação. A partir do aparecimento dos sintomas as folhas foram coletadas e acomodadas em caixas de Gerbox, contendo duas folhas de papel filtro previamente umedecidas com 4 mL de água destilada esterilizada. O ensaio foi instalado em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Com o objetivo de simular estresse abiótico, as caixas de Gerbox permaneceram abertas, durante 9 horas, em câmara de fluxo laminar com luz contínua. Durante esse período, o molhamento foliar foi suspenso nos tempos zero e 61 horas, após a aplicação do antagonista. A temperatura e umidade foram registradas com o auxílio de termo higrômetro.

Após o período de estresse, as folhas de papel filtro foram novamente umedecidas com 4 mL de água destilada esterilizada e as caixas de Gerbox foram acomodadas em câmara de crescimento. A partir do item 3.4, foi determinado que o período de incubação de sete dias é o mais eficaz no controle

da doença pelo antagonista. Assim, após esse período, foram feitas as avaliações referentes à quantidade e viabilidade dos conídios do patógeno. Por meio dos dados coletados com o auxílio de um termohigrometro, pode-se observar que a média da umidade relativa para o experimento foi de 60 %.

3.6 Produção de voláteis

Para avaliar a produção de voláteis pelo sapróbio selecionado, utilizaram-se placas de plástico estéreis e bipartidas. Em um dos lados, verteu-se o meio V8 para o cultivo da *C. coffeicola* e, no outro lado da placa verteu-se o meio para o cultivo do sapróbio. Os meios testados para o sapróbio foram V8, CMA e BDA. O antagonista foi repicado para as placas simultaneamente com o patógeno. As placas foram incubadas em B.O.D. durante 10 dias a 25°C, luz constante. O ensaio foi realizado em esquema fatorial (3x2), o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. A cada dois dias, foi avaliado o diâmetro da colônia do patógeno.

3.7 Teste de antagonismo com confrontação direta

Discos de micélio e esporo de *P. macrosporus* foram colocados em placas de Petri (90 mm), contendo os meios V8, CMA e BDA a uma distância de aproximadamente 1 cm da borda. Simultaneamente, realizou-se a repicagem de *C. coffeicola* na posição oposta à colônia do antagonista. As culturas foram incubadas em B.O.D. durante 10 dias a 25°C, luz constante. Avaliou -se, a cada dois dias, o diâmetro da colônia do patógeno. O ensaio foi realizado em esquema fatorial (3x2), o delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento. Ao final das avaliações, foi registrada a taxa de esporulação do patógeno.

3.8 Análise do isolado *Phialomyces macrosporus* quanto à produção de pectinase total em meio sólido por meio do halo de degradação de pectina

O fungo foi cultivado em meio mineral tamponado 55mM, pH 7,2 (2,0 g KH_2PO_4 , 7,0 g K_2HPO_4 , 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g pectina cítrica, extrato de levedura 0,06% (p/v), 13 g ágar em 1000 mL de água destilada.) a 27°C por cinco dias. Em seguida, discos de 7 mm de diâmetro contendo micélio foram transferidos para meio sólido com tampão Mac Ilvaine (0,2 M NaH_2PO_4 , 0,1 M ácido cítrico, 13 g/L ágar- pH 6,0), acrescido com pectina cítrica (0,25%) e incubados a 40°C por 48 horas. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e coradas com solução Iodo/Iodeto (5g de KI, 1g de Iodo em 330 mL de água destilada), para a detecção do halo de degradação de pectina.

3.9 Manutenção da cultura

Para a determinação das atividades da enzima poligalacturonase (PG) e produção micelial de *P. macrosporus* o fungo foi cultivado a 25°C por 7 dias, em placas de Petri, contendo meio mínimo sólido (MM) (6,0 g NaNO_3 ; 1,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g KCL; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g FeSO_4 ; 0,01 g ZnSO_4 ; 10,0 g glicose; 15 g de ágar em 1000 mL de água destilada, pH 6,8).

Após o crescimento, foi feita suspensão de esporos em solução contendo Tween 80 a 0,2% (v/v) e água estéril. A suspensão foi homogeneizada em Vortex e, a concentração de esporos padronizada para 10^6 esporos /mL.

3.10 Condições de cultivo de *Phialomyces macrosporus* em agitador orbital para a produção da enzima poligalacturonase

O fungo foi cultivado em meio mineral não tamponado, contendo K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $(NH_4)_2SO_4$, extrato de levedura, sendo, ambos, suplementados com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 % e adicionada pectina cítrica nas concentrações de 1% ou 2%. O meio mineral, o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e a fonte de carbono foram esterilizados, separadamente, a 120 °C durante 20 minutos. O experimento foi conduzido em shaker, a 26 °C, a uma agitação constante de 120 rpm. Foram coletadas amostras de 100 mL a cada 24 horas, durante 120 horas.

3.11 Avaliação da produção de massa micelial

A metodologia utilizada foi de acordo com o trabalho de Calam (1969). A produção de massa micelial foi quantificada por meio de filtração das amostras coletadas, em peneira de 400 malhas/pol² (37 µm), seguida por lavagem em água destilada, sendo, posteriormente, acondicionada em forminhas de papel-alumínio, as quais foram secadas a 105 C por 24 horas.

O sobrenadante foi estocado a -20 °C para a posterior utilização nas dosagens das atividades enzimáticas.

3.12 Determinação da atividade de poligalacturonase

Para verificar a produção de poligalacturonase (PG), foi realizado um ensaio enzimático. A mistura da reação constitui-se de 1,5 mL de ácido poligalacturônico 1,33% P-3889 (p/v) em tampão acetato de sódio e NaCl 2,5 M, pH 4,8 e 0,5 mL do sobrenadante da cultura mantidos a 40 °C por 20 minutos. Aliquotas de 0,125mL foram retiradas nos tempos 0 e 20 minutos e

adicionadas em 0,5 mL de DNS (Ácido Dinitrossalicílico). A atividade de poligalacturonase foi determinada pela dosagem de açúcar redutor, segundo o método do DNS, descrito por Miller (1959). O ácido poligalacturônico foi utilizado na determinação da curva padrão de açúcar redutor para atividade de PG. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de ácido poligalacturônico, em μ moles, liberado na mistura da reação por minuto.

3.13 Efeito da contribuição exclusiva dos conídios, sobrenadante, conídios + sobrenadante e do sobrenadante, contendo a enzima poligalacturonase produzida pelo fungo sapróbio, a aceleração da degradação do tecido foliar

Neste ensaio, objetivou-se determinar qual o efeito dos conídios, do sobrenadante da enzima poligalacturonase e do sobrenadante do fungo selecionado, (todos cultivados durante 120 horas) na supressão dos conídios do patógeno e na aceleração da degradação do tecido foliar.

Folhas com sintomas característicos da mancha de olho pardo foram coletadas de campo de café livre da aplicação de fungicidas. As lesões presentes nas folhas foram recortadas e separadas em blocos, de acordo com o tamanho da lesão. Blocos que contivessem lesões maiores teriam 5 lesões por tratamento e, aqueles que contivessem lesões menores, teriam 8 lesões por tratamento.

Foi determinado, inicialmente, o número de conídios (descrito no item 3.4) e o peso inicial da metade de cada lesão. Posteriormente, foi feita a aplicação dos tratamentos, por meio de um pulverizador manual, estes consistiam em: conídios de *P. macrosporus* cultivado em meio sólido por 120 horas; sobrenadante da enzima poligalacturonase às 120 horas; *P. macrosporus* cultivado em meio líquido durante 120 horas; *P. macrosporus* cultivado em meio líquido por 120 horas e, posteriormente, centrifugado e água.

Após a aplicação dos tratamentos, a outra metade da lesão correspondente a cada tratamento foi acomodada em caixas de Gerbox, contendo duas folhas de papel filtro previamente umedecidas com 4 mL de água destilada esterilizada. O ensaio foi instalado em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Depois do período de incubação de sete dias, foram realizadas as avaliações referentes à quantidade de conídios e o peso da metade da lesão, os últimos foram determinados com o auxílio de balança de precisão. O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados, sendo quatro blocos contendo de cinco a oito lesões por cada tratamento.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção dos isolados sapróbios

Foram analisadas as variáveis referentes ao número e à germinação de conídios em folhas com sintomas da mancha de olho pardo (*Cercospora coffeicola*), para a seleção do sapróbio mais promissor para a redução da sobrevivência do patógeno. As avaliações foram feitas aos 7 e 14 dias após o tratamento com os fungos sapróbios.

Para a variável número de conídios produzidos pelo patógeno, não foram observadas diferenças significativas para a interação ($p= 0,4681$) ou quaisquer dos fatores ($p= 0,2184$ e $p= 0,0014$). A média do número de conídios produzidos foi de $2,53 \times 10^4$ cm/ml, independente do período de avaliação ou tratamento.

Em relação à variável germinação de conídios do patógeno, não foi observado efeito significativo para a interação tratamentos x período de avaliação ($p =0,1465$), assim como não houve efeito significativo para o fator período em que foram feitas as avaliações ($p= 0,0335$). No entanto, ainda para essa mesma variável, foi encontrada diferença significativa ($p=0,0003$) entre os três fungos sapróbios testados em relação às testemunhas positiva (Compost-Aid® + Soil Set) e, a testemunha negativa água.

Quando as médias dos tratamentos foram comparadas, verificou-se que o tratamento com o fungo sapróbio *P. macrosporus*, independente da época de avaliação (7 ou 14 dias) diminuiu a taxa de germinação do patógeno em 40%. Em relação ao tratamento Compost-Aid® + Soil Set embora tenha diminuído a taxa de germinação do patógeno (20%), sua média não diferiu significativamente do tratamento água (Figura 1).

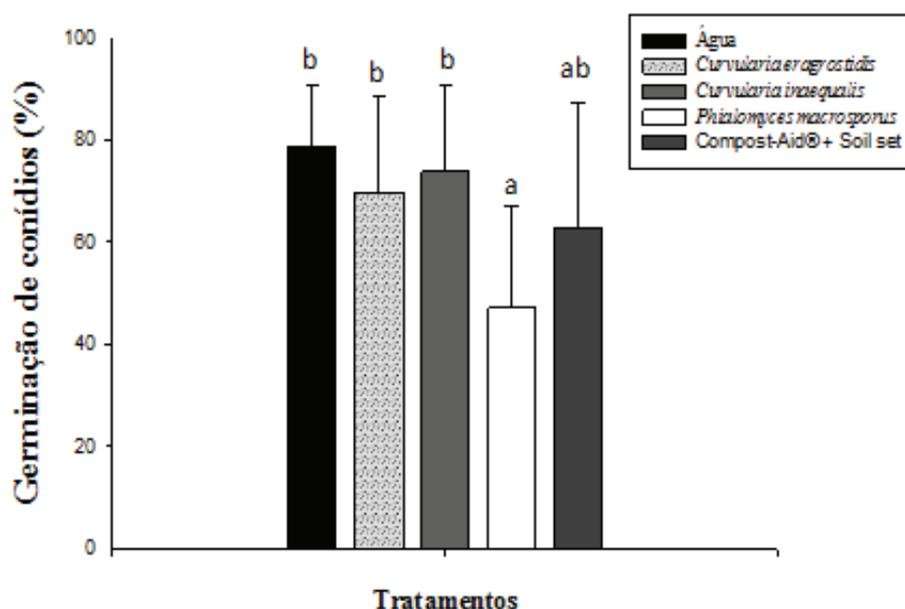


Figura 1 Efeito da aplicação dos diferentes tratamentos na germinação de conídios de *Cercospora coffeicola* avaliados nos tempos 0, 7 e 14 dias após a aplicação dos sapróbios. Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.2 Efeito da aplicação do fungo selecionado na supressão da esporulação de *C. coffeicola* sobre condições de estresse abiótico

A partir dos resultados do ensaio do Item 4.1, em que o antagonista *P. macrosporus* reduziu a viabilidade dos conídios do patógeno em estudo independente do período de avaliação, as demais avaliações foram, então, realizadas aos 7 dias de a aplicação do sapróbio, e, este foi testado quanto a sua habilidade em suprimir a esporulação do patógeno sobre condições artificiais de estresse abiótico.

Não houve interação entre os fatores tratamentos x épocas de interrupção do molhamento foliar (zero e 61 horas) para a variável número de

conídios ($p=0,8221$), assim como para a variável germinação de conídio de *C. coffeicola* ($p=0,9546$).

Em relação à variável número de conídios de *C. coffeicola* não houve efeito significativo ($p=0,1844$) entre o tratamento com o antagonista *P. macrosporus*, quando comparado ao controle negativo (plantas tratadas somente com água) em relação à variável resposta número de conídios.

Para a variável germinação de conídios, quando as médias foram comparadas, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,0054$), sendo observada redução de 37,73% da viabilidade dos conídios do patógeno, quando tratados com o isolado *P. macrosporus*.

Ainda em relação à variável resposta número de conídios germinados, pode-se observar diferença significativa entre as épocas em estudo ($p=0,0369$). Sendo a exposição ao estresse imediato após a aplicação dos tratamentos (zero horas), o período em que observou-se maior redução no número de esporos germinado, em torno de 26% em relação à 61 horas, após a aplicação dos tratamentos.

4.3 Antagonismo com confrontação direta

A partir dos resultados dos Itens 4.1 e 4.2 os próximos ensaios foram feitos com o objetivo de determinar qual o(s) possível(s) mecanismo(s) de ação utilizado(s) pelo sapróbio para o controle da doença. Podendo ser competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira e produção de compostos antimicrobianos (STROBEL, 2002).

Para o teste de antagonismo com confrontação direta, observou-se, para todos os meios utilizados no ensaio, redução significativa no crescimento micelial de *C. coffeicola*, quando na presença de *P. macrosporus* em relação à testemunha (Figuras 2 e 4).

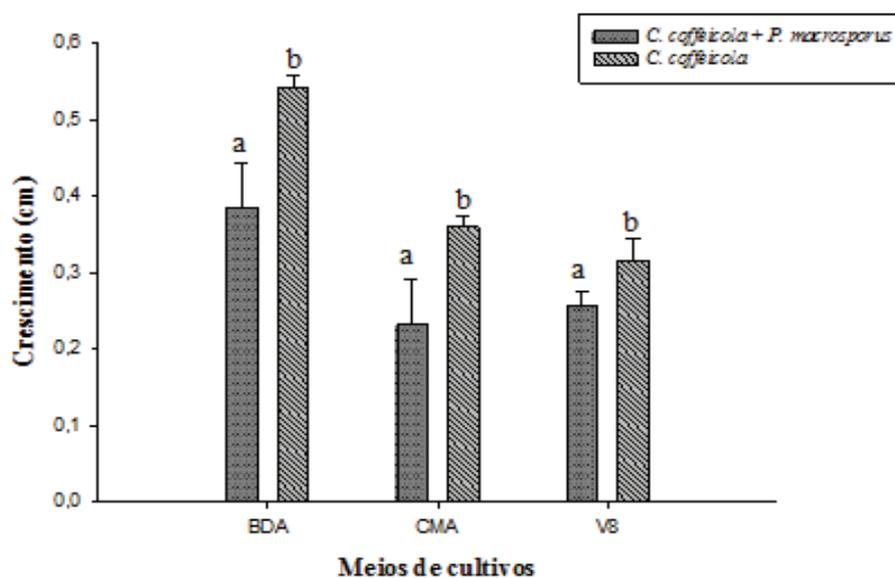


Figura 2 Crescimento do fungo *C. coffeicola* com e sem a presença de *P. macrosporus* nos meios BDA, CMA e V8. Gráfico referente a análise do desdobramento dos tratamentos (*C. coffeicola* e *C. coffeicola* + *P. macrosporus*) em de cada nível do fator meio de cultura

Para variável resposta número de conídios pode-se observar que houve diferença significativa para o tratamento *C. coffeicola* com *P. macrosporus* em relação à testemunha, somente quando cultivados nos meios CMA e V8 (Figura 3).

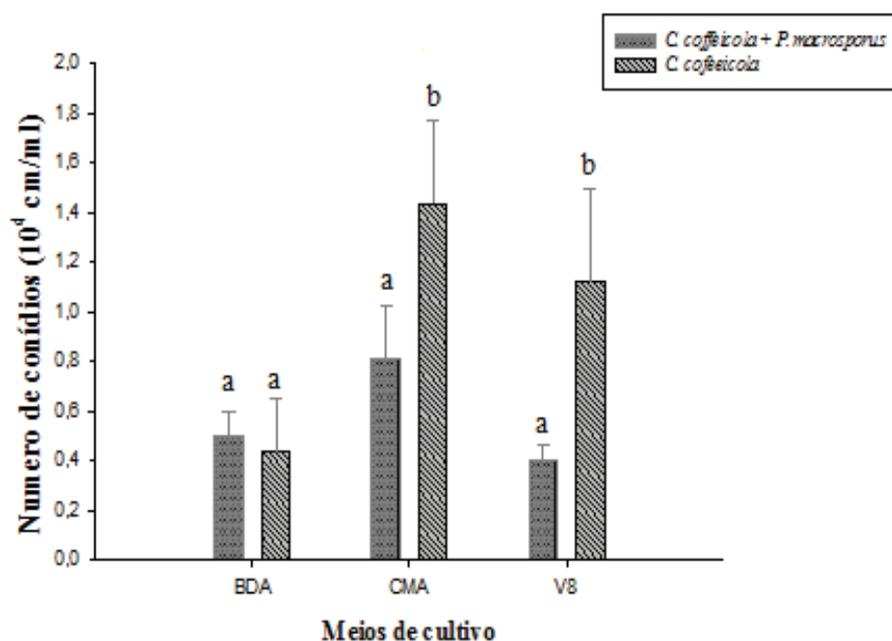


Figura 3 Número de conídios do fungo *C. coffeicola* com e sem a presença de *P. macrosporus* nos meios BDA, CMA e V8. Gráfico referente a análise do desdobramento dos tratamentos (*C. coffeicola* e *C. coffeicola* + *P. macrosporus*) dentro de cada nível do fator meio de cultura. Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$)

4.4 Produção de voláteis

No teste de produção de voláteis, observou-se inibição no crescimento do patógeno quando inoculado na presença do antagonista *P. macrosporus*, independente do meio de cultura utilizado. Além da redução no crescimento micelial do patógeno, também foi observada diminuição no número de conídios e redução na viabilidade dos mesmos (Figura 4 A, B e C).

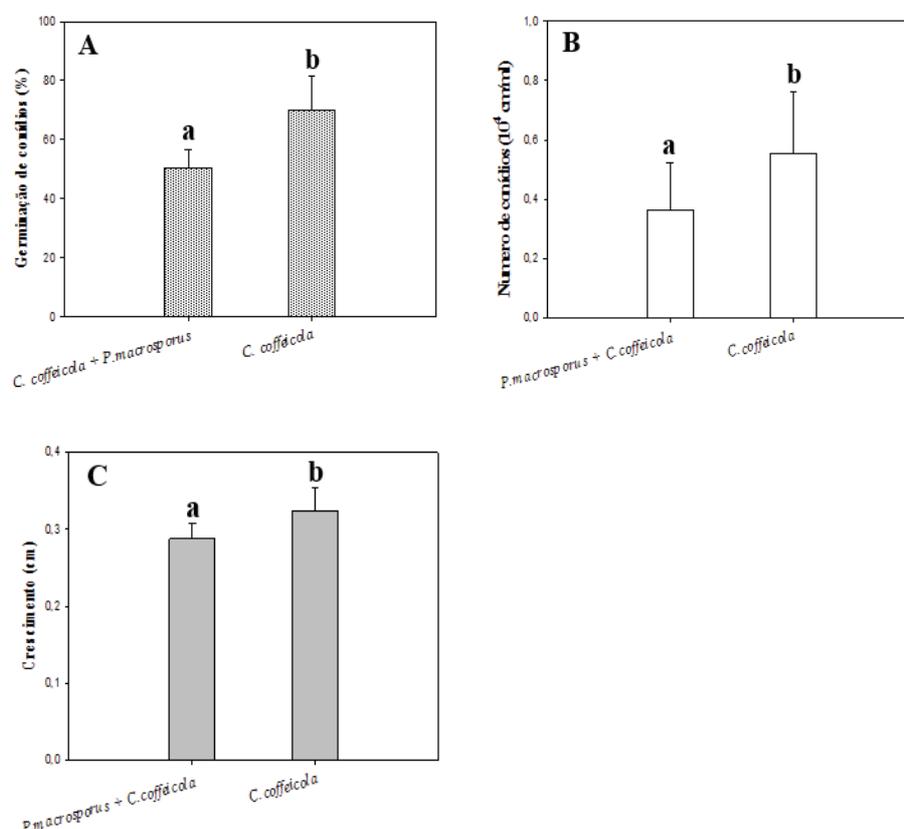


Figura 4 Produção de voláteis. Os gráficos A, B e C representam germinação de conídios (%), número de conídios e crescimento micelial (cm) do fungo *C. coffeicola* com ou sem a presença de *P. macrosporus*

4.5 Produção de pectinase total em meio sólido

Dentre os mecanismos de controle da doença utilizado pelo fungo, um deles poderia ser a competição por nutrientes. Assim, foi feita a determinação da atividade de enzimas relacionadas à degradação do tecido da planta.

A degradação dos substratos contendo ácido galacturônico e ácido poligalacturônico como indutores de pectinases, pode ser visualizada por meio

da formação de um halo resultante da produção de enzimas pectinolíticas (Figura 6).

As médias dos diâmetros do halo formado foi de 0,93 para ácido poligalacturônico e de 0,70 para o ácido galacturônico.

4.6 Determinação da atividade de enzima poligalacturonase e massa micelial

Na Figura 5, mostra-se a massa micelial seca e atividade de PG, ao longo do tempo de 120 horas de cultivo. A maior massa micelial seca foi observada no tempo de 120 horas de cultivo.

A atividade enzimática de PG, detectada no sobrenadante da cultura, apresenta aumento gradual, ao longo do tempo de cultivo, sendo a maior atividade (7442,685 U/mL) em 120 horas (Figura 5 A e B).

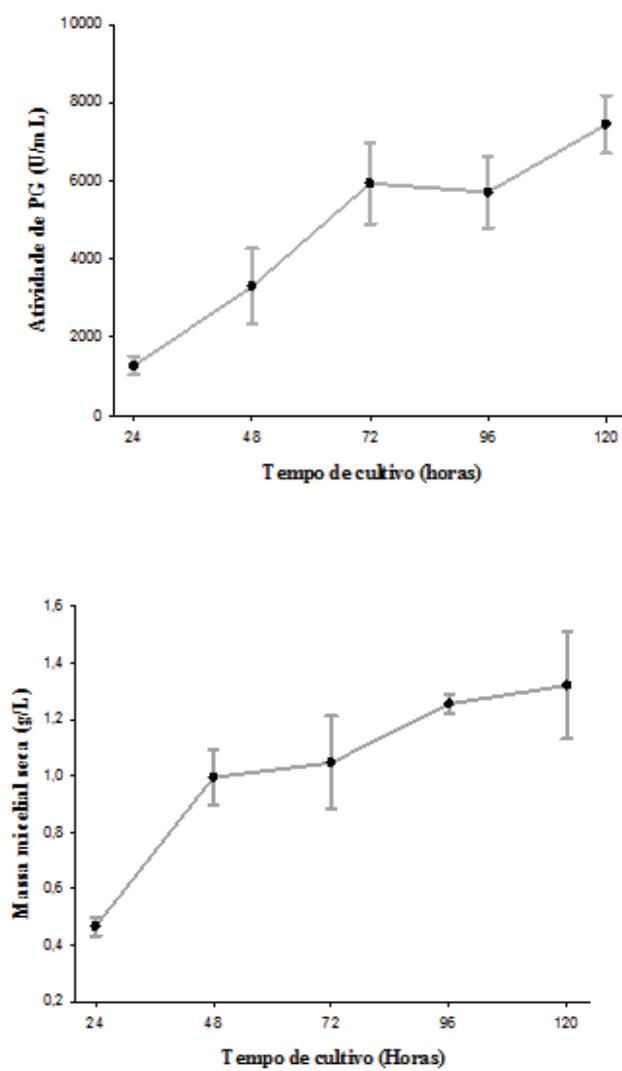


Figura 5 Análise da curva de crescimento e da atividade de PG do fungo *Phialomyces macrosporus*. (A) Massa micelial seca. (B) Atividade de PG no sobrenadante da cultura

4.7 Efeito da contribuição exclusiva dos conídios, sobrenadante, conídios + sobrenadante e do sobrenadante contendo a enzima poligalacturonase produzida pelo fungo sapróbio, o na aceleração da degradação do tecido foliar

Em relação à diferença entre o peso inicial e final das lesões de cada tratamento, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,9156$). Assim como para a variável número de conídios produzidos por *C. coffeicola* nenhum dos tratamentos diferiu entre si ($p=0,4437$), sendo a média do número de conídios de $7,2 \times 10^3$ cm/mL.

5 5 DISCUSSÃO

Os ensaios *in vivo* demonstraram que a aplicação de *P. macrosporus* sobre lesões causadas pelo patógeno reduziu a viabilidade de *C. coffeicola* em 40%, a partir dos 7 dias e, esse efeito perdura por, pelo menos, 14 dias após a aplicação do antagonista em estudo (Figura 1), demonstrando que o fungo sapróbio não apenas é capaz de reduzir a viabilidade do patógeno, mas que esse efeito ocorre já aos 7 dias após o tratamento. Odile, Daniel e David-Mathieu (2006) trabalharam com isolados de *Microsphaeropsis ochacea* em lesões de folhas de cebola em processo de senescência, e verificaram a redução da esporulação de *Botrytis squamosa*, a partir de dez dias de aplicação do antagonista.

No presente trabalho, não foi avaliada a contribuição da redução do inóculo de *Cercospora* na epidemia da mancha de olho pardo no campo, mas trabalho semelhante, realizado por Galletti et al. (2008) mostraram que quando *Trichoderma* sp. foi aplicado sobre folhas de beterraba infectados com *Cercospora beticola*, foi observada diminuição da viabilidade dos conídios do patógeno, o que resultou em atraso da epidemia na safra seguinte.

No presente trabalho, independente do momento (zero e 61 horas) em que *P. macorporus* foi exposto ao estresse, este foi capaz de reduzir a viabilidade dos conídios do patógeno em até 37,72 %. Isso pode estar relacionado com o fato desses fungos terem sido isolados da região semiárida do nordeste, o que garante a estes, sobrevivência em ambientes hostis e, portanto, demonstrarem atividade biológica independente do regime hídrico presente, conforme demonstrado por Yohalem et al. (2004), que avaliou a supressão da esporulação de *Botrytis aclada* por *Ulocladium atrum* em tecido morto de cebola infectado em condições de interrupções de umidade, com reduções de 90 a 100% depois de seis e oito dias de incubação.

Ainda não avaliamos a contribuição da variação da temperatura na eficiência do fungo sapróbio na redução da sobrevivência do patógeno, mas Kohl et al. (1995) observaram resultados semelhantes de manutenção de biocontrole, com diferentes períodos de interrupção de molhamento e, também, verificou esse mesmo efeito, para a variação de umidade e temperatura.

Em relação ao patógeno, quando este foi exposto às condições de estresse imediato (zero horas), após a aplicação dos tratamentos, ocorreu diminuição do número de esporos germinados. Já, 61 horas após a aplicação do antagonista, resultou em maior esporulação, possivelmente o maior tempo sob condições favoráveis ao patógeno antes da exposição ao estresse abiótico, garantiu maior estabilidade ao fungo e, conseqüentemente, maior esporulação. Trabalhos de Echandi (1959) e Fernandes et al. (1991) demonstraram que *C. coffeicola* necessita de 6 a 12 horas de período de molhamento foliar e umidade relativa de 92% para que se inicie a esporulação e que se tenha a máxima severidade da doença.

Além da avaliação do potencial do fungo sapróbio em controlar o patógeno independente do estresse em que este é exposto, a qual visa à busca da sustentabilidade da técnica de controle, devem-se avaliar os mecanismos de ação do agente de biocontrole. Um dos mecanismos mais comuns de redução da sobrevivência de patógenos é a antibiose. Yoshida et al. (2002) observaram redução na sobrevivência de *Colletotrichum dematium* em folhas de amora infectadas, quando tratadas com *Bacillus amyloliquefaciens*, confirmando ser a produção de compostos antifúngicos, o principal mecanismo de ação utilizado pelo antagonista em estudo.

Em ensaios *in vitro* em que foram testadas as produções de não-voláteis, constatou-se interação positiva entre os meios de cultura V8 e CMA e a produção de compostos não-voláteis, resultando em maior controle do patógeno (Figuras 3 e 4). Dessa forma, sugere-se que tais meios de cultura induzam à

produção de maior quantidade ou diversidade de compostos com ação inibitória a *C. coffeicola*.

A utilização do fungo *P. macrosporus* como agente de biocontrole de doenças no cafeeiro foi notificada por outros autores. Botrel e Medeiros (2013) observou em teste de produção de voláteis inibição do crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*, quando inoculada na presença de *P. macrosporus* cultivado tanto em meio BDA, como em CMA. Pinto, Abreu e Medeiros (2013) inoculou o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de *P. macrosporus* e observou redução de 57% no IVCm e 42,5% na esporulação do patógeno, quando comparado com a testemunha.

A redução no número de conídios produzidos pelo patógeno somente foi observada em ensaios *in vitro*, quando ambos foram cultivados simultaneamente, o que sugere que a associação entre aplicação curativa e preventiva poderia diminuir ainda mais a incidência e severidade da doença. Heyens et al. (2010) trabalharam com a mofo- cinzento do tomateiro e observaram redução de 30 % no progresso da doença, quando aplicado de forma curativa, já, quando a aplicação foi feita preventivamente, observou-se redução de 90 % das infecções.

O mecanismo de competição entre os microrganismos em colonizar a área necrosada foi testado, a partir da determinação e quantificação de enzimas pectinolíticas. Essas enzimas degradam o tecido vegetal morto e liberam nutrientes tanto para o patógeno quanto o sapróbios. Trane et al (2000) monitoraram, por meio de transformação genética, a colonização de isolados do fungo sapróbio *Trichoderma* em plantas de pepino, quando infectadas por *Pythium ultimum* e observaram que ambos os isolados de *Trichoderma* foram capazes de absorver os nutrientes presentes no tecido vegetal de maneira mais eficiente que o patógeno, e, portanto, confirmaram ser a competição por nutrientes um mecanismo importante no biocontrole desse patossistema.

Sabe-se, por meio de trabalhos realizados por Ahmad et al. (2003), que *P. macrosporus* foi encontrado colonizando frutos de café tanto na variedade robusta como na arábica. Dessa forma, acredita-se que, assim como isolados do fungo, também endolítico do café, *Cladosporium* sp possui a capacidade de proteger os frutos de café contra a ação deletéria de diversos fungos, *P. macrosporus* tenha a habilidade de produzir enzimas pectinolíticas e que possa, de alguma forma, ser também um agente de biocontrole de doenças associadas a essa cultura.

No presente trabalho, foi identificada a produção das enzimas poligalacturonase, por meio da formação do halo correspondente a produção da enzima. No entanto, quando comparamos *P. macrosporus* com microrganismos que possuem a capacidade de secretar grandes quantidades de proteínas, podemos afirmar que, em relação à enzima poligalacturonase, esse fungo não é considerado um grande produtor.

Diversos estudos comprovam a eficácia de enzimas pectolíticas na degradação de matéria orgânica. Kenneth et al. (2009) observaram que o endofítico *Acremonium zeae* produz quantidade suficiente de enzimas hidrolíticas para uso na conversão de biomassa lignocelulósica em matéria-prima para a indústria.

No presente trabalho, verificou-se que a aplicação do sobrenadante de PG cultivado a 120 horas, quando foi observado o máximo de produção dessa enzima (Figura 8B), não foi eficaz na degradação do tecido lesionado, assim como nenhum componente fúngico, no tempo de avaliação de 7 dias, cultivado durante o mesmo período, sugerindo a necessidade de maior tempo de cultivo para um tratamento eficiente e essa enzima possa ter efeito com maior tempo de exposição do fungo ao resíduo vegetal e ter um efeito sinérgico no biocontrole.

A produção das enzimas pectinolíticas pelo bioagente representa potencial para a competição por nutrientes com o patógeno. No entanto, não foi evidenciado esse mecanismo como o principal para a redução da sobrevivência de *C. coffeicola*, pelo menos em relação à enzima poligalacturonase.

Portanto, o fungo sapróbio selecionado, *Phialomyces macrosporus* tem potencial para controle de doenças do cafeeiro (Botrel e Pinto), esse efeito é independente do período de molhamento e funciona pela redução da viabilidade de conídios associados a restos culturais, atuando, provavelmente, pela produção de substâncias antimicrobianas.

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho, surgem novas perspectivas para o manejo integrado da mancha de olho pardo, uma vez que *P. macrosporus* possui um amplo espectro de ação sobre o patógeno, sendo esta uma das características cruciais para o sucesso de um bioagente.

6 CONCLUSÕES

P. macrosporus quando aplicado em folhas de café em estado de senescência, possui a capacidade de suprimir a esporulação de *C. coffeicola*.

O possível mecanismo de biocontrole é a antibiose pela produção de compostos voláteis e não-voláteis.

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, S. et al. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process Biochemistry**, London, v. 44, n. 5, p. 521–526, May 2009.
- AHMAD, R. et al. Impact of gamma irradiation on the monsooning of coffee beans. **Journal of Stored Products**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 149-157, July 2003.
- ALABOUVETTE, C. et al. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusariumoxysporum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 184, n. 3, p. 529-544, July 2009.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos: volume 1**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 550-557.
- BECKMAN, P. M.; PAYNE, G. A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercosporazeae-maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 2, p. 286-289, Aug. 1983.
- BELLOTTE, J. A. M. et al. Acceleration of the decomposition of Sicilian lemon leaves as an auxiliary measure in the control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 71-76, Apr. 2009.
- BOTREL, D. A.; MEDEIROS, F. H. V de. **Fungos sapróbios do semiárido nordestino como agentes de biocontrole da mancha aureolada**. 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BRIDSON, D. M. Additional notes on Coffee (Rubiaceae) from Tropical East Africa. **Kew Bulletin**, New York, v. 49, n. 2, p. 331-342, June 1994.
- CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, June 2009.

CALAM, C. T. The evaluation of micelial growth. In: NORRIS, J. B.; RIBBONS, D. W. (Ed.). **Methods in microbiology**: volume 1. London: Academic Press, 1969. p. 567-591.

CAROLINA, O. I. et al. Antagonistic action and bioactive metabolites of *Trichoderma* spp. against the pathogens *Sclerotiumrolfsii* and *Verticillium dahlia*. **SummaphyTopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 34-41, Jan./Mar. 2014.

CAROLINE, L. A. **Aplicação do agente biológico Cladosporiumcladosporioides (Fresen) e Vries “Cladosporin” comobioprotetor da qualidade do café (coffea arábica L.)**. 2012. 321 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CARVALHO, V. L. et al. Influência do zinco na incidência de doenças do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 804-808, maio/ jun. 2008.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, v. 1, p. 42-49, nov. 2011.

CASTAÑO, A. J. J. Mancha de hierro delcafé. **Boletín Informativo**, Buenos Aires, v. 82, p. 313-327, 1956.

CHIRON, N.; MICHELOT, D. Odeurs de champignons: chimie et role dans les interactions biotiques d'une revue. **Mycologie**, Paris, v. 26, n. 4, p. 299-364, 2005.

CHUPP, C. A. **Monograph of the fungus genus cercospora**. Ithaca: American Association for the Advancement of Science, 1953.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: 3ª estimativa café, safra 2014**. Brasília: Conab, 2014.

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

COOKE, M. C. *Cercospora coffeicola*. **Grevillea**, [S.l.], v. 9, p. 99, 1881.

COORDENAÇÃO DO PROGRAMA INTEGRADO DE APOIO À CAFEICULTURA. **Pró café**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

ECHANDI, E. **La chasparria de loscafetos causada por elhongo Cercospora coffeicola Berkand Cooke**. Turrialba, San José, v. 9, n. 2, p. 54-67, Jan./Feb. 1959.

FALMY, A. S. et al. Characterization of an exopoly galacturonase from aspergillusniger. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 149, n. 3, p. 205-217, 2008 June

FERNANDES, C. D. **Efeito de fatores do ambiente e da concentração de inóculo sobre a cercosporiose do cafeeiro**. 1988. 37 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

FERNANDES, C. D. et al. Influência da concentração de inóculo de *Cercosporacoffeicola* e do período de molhamento foliar na intensidade da cercosporiose do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 39-43, 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/countries_by_commodity/E>. Acesso em: 30 jul. 2014.

FURLAN JÚNIOR, E. F. et al. Avaliação de cultivares de café arábica em região marginal. **Acta ScientiarumAgronomy**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 197-203, 2007.

GALLETTI, S. et al. Trichoderma as a potencial biocontrol agente for Cercosporaleaf spot of sugar beet. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, n. 6, p. 917-930, Dec. 2008.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, jun. 2003.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffeaarabica* L.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas: volume 2**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 184-200.

GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1967.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 4, p. 307–319, Apr. 2005.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 153, n. 2, p. 384–395, June 2010.

HELYER, N.; CATTILIN, N. D.; BROWN, K. C. **Biological control in plant protection: a colour handbook**. New York: CRC Press, 2014.

HEYENS, K. et al. Biological control of *Botrytis cinerea* in tomato. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOMATO DISEASE, 3., 2010, Italy. **Proceedings...** Italy: ISHS, 2010. p. 361-363.

JORDAAN, A.; TAYLOR, J. E.; ROSSENKHAN, R. Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 245–255, May 2006.

KENETH, M. B. et al. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. **Current Microbiology**, New York, v. 58, n. 5, p. 499-503, May 2009.

KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas: volume 2**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

KOHL, J. et al. Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis-allii* and *Botrytis-cinerea* by antagonists on dead onion leaves. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, n. 6, p. 627-637, Mar. 1995.

KOHL, J.; FOKKEMA, N. J. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: BOLAND, G. J.; KUYKENDALL, L. D. (Ed.). **Plant-microbe interaction and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 49–88.

KORPI, A.; JAMBERG, J.; PASANEN, A. L. Microbial volatile organic compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 39, n. 2, p. 139-193, Feb. 2009.

KUTYWAYO, D. et al. The impact of climate change on the potential distribution of agricultural pests: the case of the coffee white stem borer (*Monochamusleuconotus* P.) in Zimbabwe. **PLoSOne**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. 1-13, Aug. 2013.

- LI, G. Q. et al. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 43, n. 3, p. 211-218, July 2002.
- LI, G. Q.; HUANG, H. C.; ACHARYA, S. N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, Orlando, v. 28, n. 1, p. 11-18, Sept. 2003.
- LIMA, P. A.; CUSTÓDIO, A. A. P.; GOMES, N. M. Produtividade e rendimento do cafeeiro nas cinco primeiras safras irrigado por pivô central em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1832-1842, nov./dez. 2008.
- MATTIELO, J. B et al. **Cultura do café no Brasil**: manual de recomendações. Varginha: MAPA, 2005.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analysis Chemical**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.
- MOORE, J. C. et al. Detritus, trophic dynamics, and biodiversity. **Ecology Letters**, Oxford, v. 7, p. 584-600, Mar. 2004.
- NOACK, F. Die krankheiten des kaffeebaumes in Brasilien. **Zeitschrift Fur Pflanzkrankheiten**, Elmsford, v. 11, p. 196-203, 1901.
- ODILE, C.; DANIEL, R.; DAVID-MATHIEU, T. Effect of *Microsphaeropsis ochracea* on production of sclerotia-borne and airborne conidia of *Botrytis squamosa*. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 107-126, Feb. 2006.
- OLIVEIRA, I. P. D.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. D. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Montes Belo, v. 5, n. 3, p. 18-32, maio 2012.
- ORTIZ-CASTRO, R. et al. The role of microbial signals in plant growth and development. **Plant Signaling & Behavior**, Washington, v. 4, n. 8, p. 701-712, Aug. 2009.
- PASANEN, P. et al. Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust. **Environment International**, New York, v. 23, n. 4, p. 425-43, Mar. 1997.

PATRICIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzo-lar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 152, p. 29-39, Feb. 2008.

PEDROLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, Amsterdam, v. 3, p. 9-19, July 2009.

PINTO, F. A. M. F.; ABREU, M. S de.; MEDEIROS, F. H. V de. **Controle da mancha manteigosa com fungos sapróbios em cafeeiro**. 2013. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

POZZA, E. A.; ALVES, M. C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. (Ed.). **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2008. p. 216-233.

PUSEY, P. L. et al. Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol Strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 10, p. 1234-1241, Oct. 2011.

RICCI, M. S. F.; ARAÚJO, M. C. F.; FRANCH, C. M. C. **Cultivo orgânico do café: recomendações técnicas**. Brasília: EMBRAPA, 2002.

SCHIMPF, U. et al. Improving the efficiency of large-scale biogas processes: pectinolytic enzymes accelerate the lignocellulose degradation. **Journal of Sustainable Energy & Environment**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 53-60, Jan. 2013.

SHANNON, U. et al. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potencial. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 26, n. 2-3, p. 73-83, July 2012.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, Jan. 2011.

SOUZA, A. G. C.; MIZUBUTI E. S. G.; MAFFIA, L. A. Esporulação *in vitro* de *Cercospora coffeicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 116, 2005.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22, n. 4, p. 315-333, Jan. 2002.

THRANE, C. Substrate colonization, strain competition, enzyme production in vitro, and biocontrol of *Pythiummultimum* by *Trichoderma* spp. isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 3, p. 215-225, Nov. 2000.

WANG, Y.; DAI, C. C. Endophytes: a potencial resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 207-215, Aug. 2011.

YADAV, S. et al. Petinlyase: a reviewe. **Process Biochemistry**, London, v. 44, n. 1, p. 1-10, Sept. 2009.

YOHALEM, D. S. et al. Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 297-303, Jan. 2004.

YOSHIDA, S. et al. Ecological characteristics and biological control of mulberry anthracnose. **Japan Agricultural Research**, Tokyo, v. 36, n. 2, p.89-92,2002.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: Vale, F. X. R. do; Zambolim, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas: volume 1**. Viçosa: Editora da UFV, 1997. p. 83-180

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas: volume 2**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 165-180.