



**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE  
FILTRADOS DE RIZOBACTÉRIAS SOBRE  
*Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. DO  
CAFEEIRO**

**GILVANE APARECIDA DE CARVALHO**

**2004**

**GILVANE APARECIDA DE CARVALHO**

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE FILTRADOS DE  
RIZOBACTÉRIAS SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ.  
DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Carvalho, Gilvane Aparecida de  
Efeito *in vitro* e *in vivo* de filtrados de rizobactérias sobre  
*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. do cafeeiro / Gilvane Aparecida de  
Carvalho. -- Lavras : UFLA, 2004.  
55 p. : il.

Orientador: Mario Sobral de Abreu.  
Dissertação (Mestrado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Café. 2. Doença bacteriana. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7398

GILVANE APARECIDA DE CARVALHO

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE FILTRADOS DE  
RIZOBACTÉRIAS SOBRE *Colletotrichum*  
*gloeosporioides* PENZ. DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre".


APROVADA em 19 de fevereiro de 2004

Prof. Dr. Mário Lúcio V. Resende

UFLA

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

UFLA

  
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Roberto e Inê;

Ao meu irmão, Gilmar;

Aos meus sobrinhos, Vinícius e Ana Flávia;

Ao meu esposo, Álvaro pela compreensão,  
amor e apoio em todos os momentos,

**OFEREÇO.**

À minha fonte de inspiração,  
minha filha Leticia,

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

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

Aos Professores Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende e ao Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, pelas valiosas sugestões e por participarem da banca de defesa de dissertação.

Ao Prof. Vicente Paulo Campos, do Departamento de Fitopatologia, responsável pelo Laboratório de Nematologia (UFLA) e colaboradores, pelo isolamento das rizobactérias.

Ao Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, do Departamento de Química, responsável pelo Laboratório de Produtos Naturais e colaboradores, pela extração e cessão dos filtrados rizobacterianos.

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

Ao colega José Zilton Lopes Santos, pelo grande auxílio nos trâmites finais e correções da dissertação.

## SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 <i>Colletotrichum</i> e a cultura do café.....	4
2.1.1 Mancha manteigosa do cafeeiro .....	5
2.2 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs).....	6
2.3 Controle alternativo de doenças de plantas .....	8
2.3.1 Controle biológico .....	11
2.3.2 Indução de resistência .....	12
2.4 Emprego de filtrados de rizobacterias no controle de fitopatógenos .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1 Obtenção dos filtrados de rizobactérias .....	15
3.2 Obtenção do inóculo de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	16
3.3 Experimento <i>in vitro</i> .....	16
3.4 Experimento <i>in vivo</i> .....	18
3.5 Análises estatísticas .....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
4.1 Filtrados de rizobactérias com ação antifúngica <i>in vitro</i> .....	23
4.2 Efeito de filtrados de rizobactérias no controle da mancha manteigosa .	29
4.2.1 Crescimento vegetativo do cafeeiro.....	29
4.2.2 Severidade da mancha manteigosa .....	33
5 CONCLUSÕES .....	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
ANEXO .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Critérios de avaliação do espectro de reação a <i>Colletotrichum</i> sp. apresentado por plantas de café .....	20
2	Altura (cm) de plantas de cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	30
3	Matéria seca (g) total de plantas de cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	32
4	Matéria seca (g) da parte aérea do cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	32
5	Matéria seca (g) de raízes do cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	33
6	Índice de doença (%) da mancha manteigosa do cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	34



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sintomas de caracterização do grau de severidade da mancha manteigosa, considerados na definição da escala de notas.....	21
2	Germinação de esporos do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na presença de filtrados de rizobactérias em concentrações crescentes (1ª bateria do ensaio <i>in vitro</i> ) .....	24
3	Germinação de esporos do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na presença de filtrados de rizobactérias em concentrações crescentes (2ª bateria do ensaio <i>in vitro</i> ) .....	25
4	Germinação de esporos do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na presença de filtrados de rizobactérias em concentrações crescentes (3ª bateria do ensaio <i>in vitro</i> ) .....	26
5	Número médio de plantas mortas nos tratamentos do experimento com o cafeeiro .....	36

## RESUMO

CARVALHO, Gilvane Aparecida de. Efeito *in vitro* e *in vivo* de filtrados de rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. do cafeeiro. 2004. 55p. Dissertação (Mestrado Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*

Tradicionalmente, o controle das doenças fúngicas na cultura do café baseia-se na aplicação de fungicidas ou uso de variedades resistentes. Contudo, a busca por formas de controle alternativo de doenças, pela utilização de produtos naturais, vem ganhando importância na agricultura moderna. Algumas rizobactérias produzem substâncias com propriedades antimicrobianas que podem ser empregadas no biocontrole de fitopatógenos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de filtrados derivados de culturas de rizobactérias na inibição da germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* e confirmar sua ação antifúngica em relação à mancha manteigosa em mudas de cafeeiro. Ensaio *in vitro* foram conduzidos para comparar 42 filtrados de culturas rizobacterianas em cinco diferentes concentrações, identificando-se os tratamentos com maior capacidade de inibir a germinação de esporos do *C. gloeosporioides*. Posteriormente, os filtrados mais promissores foram testados quanto à eficácia no controle da mancha manteigosa do cafeeiro. Plântulas de café foram submetidas à inoculação com *C. gloeosporioides* e pulverização com os filtrados em experimento com delineamento de blocos casualizados e quatro repetições. Os tratamentos foram organizados num esquema fatorial 4x4+2, combinando a aplicação de quatro filtrados (F1, F2, F3 e F4) com quatro modos de inoculação do fungo (ausência de inoculação e inoculação dois dias antes, junto, ou dois dias depois da aplicação dos filtrados). Uma testemunha absoluta (sem filtrado ou inóculo) e outra testemunha que recebeu somente o inóculo do fungo constituíram os tratamentos adicionais. Após 35 dias, foram avaliados o crescimento vegetativo do cafeeiro e a severidade da mancha manteigosa, determinando-se o índice de doença. Os filtrados apresentaram ampla variação quanto à atividade antifúngica *in vitro* e cinco deles chegaram a inibir completamente a germinação de esporos do *C. gloeosporioides*. No experimento com plântulas de café, os quatro filtrados avaliados mostraram eficácia similar no controle da mancha manteigosa. Entretanto o controle da doença foi parcial (35%). A aplicação dos filtrados resultou em efeito depressivo ao crescimento do cafeeiro, proporcionando menor produção de matéria seca em relação à testemunha absoluta.

---

\* Comitê Orientador: Prof. Mário Sobral de Abreu- UFLA (Orientador)  
Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA,  
Prof. Edson Ampélio Pozza - UFLA

## ABSTRACT

CARVALHO, Gilvane Aparecida de. *In vitro* and *in vivo* effect of rhizobacteria filtrates on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from coffee plants. 2004. 55p. Thesis (Master in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Traditionally, the control of coffee fungous diseases is based on fungicides application or on the use of resistant varieties. However, the search for alternative practices of disease control by using natural products is an important issue in modern agriculture. As some rhizobacteria may produce substances with antibiotic properties that can be used in the biocontrol of plant pathogens, the objective of this study was to evaluate the effect of rhizobacteria metabolites on *Colletotrichum gloeosporioides* spores germination and to confirm their antifungic activity against the buttery spot disease in coffee seedlings. *In vitro* bioassays, carried out with 42 rhizobacteria filtrates in five different concentrations, allowed the identification of five filtrates able to completely inhibit the spore germination. Then, the most promising filtrates were tested for efficiency on coffee buttery spot control. Coffee seedlings were inoculated with *C. gloeosporioides* and sprayed with the filtrates in a complete randomized block design with four replications. The treatments were organized in a 4x4+2 factorial scheme, combining the application of four filtrates (F1, F2, F3 and F4) with four procedures of *C. gloeosporioides* inoculation (inoculation absence, inoculation two days before, together, or two days after the filtrates application). A check treatment (1) without filtrate or pathogen and other check (2) that received only the pathogen inoculation constituted the additional treatments. After 35 days, the vegetative growth of the seedlings and the severity of the buttery spot were assessed by determining a disease index. All four filtrates showed similar effectiveness in the control of the buttery spot. However, the disease control was partial (35%) and the filtrates application was harmful to coffee growth, providing less dry matter production in relation to the check treatment (1).

---

\* Guidance Committee: Prof. Mário Sobral de Abreu - UFLA (Major Professor)  
Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende - UFLA  
Prof. Edson Ampélio Pozza - UFLA

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que atacam a cultura do café (*Coffea arabica* L.), as de origem fúngica são muito representativas e causam perdas significativas quando não são tomadas medidas de controle adequadas. Embora as principais doenças fúngicas do cafeeiro sejam relativamente bem conhecidas e já se disponham de sistemas de manejo satisfatórios para seu controle, outras doenças representam grande risco potencial para a cafeicultura brasileira. Na maioria das regiões produtoras de *Coffea arabica* no país, a “mancha manteigosa” do cafeeiro, provocada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., enquadra-se neste risco potencial devido ao aumento de plantas com sintomas nas lavouras, o que causa perdas significativas.

Até o momento, a aplicação de fungicidas, juntamente com a utilização de cultivares resistentes, tem sido a base para o controle das doenças provocadas por *Colletotrichum* spp. no cafeeiro. Por outro lado, cada vez mais, é preciso considerar a possibilidade de adoção de estratégias de controle alternativo de doenças de plantas, dentre elas, o controle biológico e a indução de resistência. Os potenciais benefícios associados a tecnologias dessa natureza vêm ganhando importância no tocante aos aspectos econômico, social e, principalmente, ambiental.

De acordo com Cook & Baker (1983), o controle biológico consiste da supressão de um microrganismo fitopatogênico por meio da ação direta de um microrganismo antagônico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência. Já a indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Esses mecanismos de resistência podem incluir o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (Pascholati & Leite, 1994).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Colletotrichum* e a cultura do café

As principais doenças no patossistema *Colletotrichum*-café, descritas na literatura, são a antracnose, a CBD (“coffee berry disease”) e a mancha manteigosa (Noak, 1902; Mc Donald, 1926; Vargas & Gonzales, 1972; Rodrigues et al., 1991; Waller et al., 1993; Orozco Miranda et al., 2002a,b).

A ocorrência de espécies de *Colletotrichum* tem sido relatada nas regiões cafeeiras brasileiras com certa frequência (Figueiredo & Mariotto, 1978; Alves & Castro, 1998). No estado de São Paulo, Bittancourt (1958), ao estudar manchas da folha do cafeeiro, identificou a antracnose e caracterizou o agente causal como *Colletotrichum coffeanum*, um parasita secundário, capaz de invadir os tecidos do hospedeiro quando mortos ou alterados por outras causas. Esse autor considerou insignificante a importância econômica do patógeno, não havendo necessidade de tratamentos de controle. Entretanto, a antracnose possui ocorrência generalizada na maioria das regiões onde a cultura do cafeeiro se desenvolve, havendo variações na natureza e intensidade dos danos provocados (Galli & Carvalho 1980).

Dentre as espécies de *Colletotrichum*, o *Colletotrichum kahawae*, agente causal da CBD, é a mais temida no continente africano, pois ataca bagas verdes em desenvolvimento, reduzindo a produção dos cafezais (Galli & Carvalho 1980). No Brasil, existem relatos do ataque de *Colletotrichum* em café, causando manchas em folhas e danos em frutos, semelhantemente ao patógeno da CBD (Nechet, 1999).

Wellman (1957), na Costa Rica, descreveu pela primeira vez a mancha manteigosa em *Coffea arabica* como sendo de natureza virótica. Posteriormente, a doença passou a ser associada à presença do fungo *Colletotrichum*

Com base nesses antecedentes, pode-se pressupor que, uma vez colocadas em contato com as plantas de interesse, as substâncias presentes em filtrados de culturas de rizobactérias seriam capazes de desencadear processos naturais de supressão de fitopatógenos, reduzindo a severidade ou eliminando o risco de infecção por fungos causadores de doenças nas culturas.

Em decorrência, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de filtrados derivados de culturas de rizobactérias na inibição da germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* e confirmar sua ação antifúngica em relação à mancha manteigosa em mudas de cafeeiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Colletotrichum* e a cultura do café

As principais doenças no patossistema *Colletotrichum*-café, descritas na literatura, são a antracnose, a CBD (“coffee berry disease”) e a mancha manteigosa (Noak, 1902; Mc Donald, 1926; Vargas & Gonzales, 1972; Rodrigues et al., 1991; Waller et al., 1993; Orozco Miranda et al., 2002a,b).

A ocorrência de espécies de *Colletotrichum* tem sido relatada nas regiões cafeeiras brasileiras com certa frequência (Figueiredo & Mariotto, 1978; Alves & Castro, 1998). No estado de São Paulo, Bittancourt (1958), ao estudar manchas da folha do cafeeiro, identificou a antracnose e caracterizou o agente causal como *Colletotrichum coffeanum*, um parasita secundário, capaz de invadir os tecidos do hospedeiro quando mortos ou alterados por outras causas. Esse autor considerou insignificante a importância econômica do patógeno, não havendo necessidade de tratamentos de controle. Entretanto, a antracnose possui ocorrência generalizada na maioria das regiões onde a cultura do cafeeiro se desenvolve, havendo variações na natureza e intensidade dos danos provocados (Galli & Carvalho 1980).

Dentre as espécies de *Colletotrichum*, o *Colletotrichum kahawae*, agente causal da CBD, é a mais temida no continente africano, pois ataca bagas verdes em desenvolvimento, reduzindo a produção dos cafezais (Galli & Carvalho 1980). No Brasil, existem relatos do ataque de *Colletotrichum* em café, causando manchas em folhas e danos em frutos, semelhantemente ao patógeno da CBD (Nechet, 1999).

Wellman (1957), na Costa Rica, descreveu pela primeira vez a mancha manteigosa em *Coffea arabica* como sendo de natureza virótica. Posteriormente, a doença passou a ser associada à presença do fungo *Colletotrichum*

*gloeosporioides*. No Brasil, Bittancourt (1958) descreveu a ocorrência da doença como uma enfermidade de pouca importância econômica, nomeando-a de “mancha oleosa”. Na Nova Guiné, Shaw & Doroty (1968), citados por Vargas & Gonzales (1972), a designaram de “Wellman’s fruit and leaf spot”.

### 2.1.1 Mancha manteigosa do cafeeiro

Wellman (1957) e Nechet & Abreu (2002) relatam, como sintomas da mancha manteigosa em folhas jovens, a presença de manchas circulares de 2-10 mm de diâmetro, não necróticas, de coloração verde claro a amarelo, ligeiramente deprimidas e menos brilhante que a superfície normal da folha. Em estágio avançado, uma necrose apresenta-se no centro das manchas que coalescem e a folha cai. Em ramos e frutos, surgem lesões menores, deprimidas e necróticas, de cor marrom-claro e bordas irregulares. Folhas e ramos novos são objeto de ataques mais intensos. As folhas caem, os ramos secam progressivamente e dá-se a morte da planta. Em lavouras adultas, com mais de 4 anos, as plantas muito susceptíveis já estão mortas (Nechet & Abreu, 2002).

Na Costa Rica, desde o surgimento da doença, realizou-se, como medida de controle, a eliminação de todas as plantas doentes mas, novos casos surgiam (Bianchini, 1960). Também na Costa Rica, Vargas & Gonzales (1972) verificaram que progênies de plantas sadias e F1, obtidas de cruzamentos de plantas sadias e doentes, não apresentaram sintomas quando inoculadas com *Colletotrichum*. Devido a isso, os autores sugeriram a existência de um caráter genético que condiciona a susceptibilidade à enfermidade.

No Brasil, a presença de mancha manteigosa em café Conillon, no estado do Espírito Santo, foi relatada por Mansk & Mantiello (1977). Foram observados ataques intensos em folhas e ramos novos de plantas adultas e presença de sintomas em mudas de viveiro. Na região norte daquele estado, e em expansão para o sul, a mancha manteigosa causa perdas superiores a 10%,



principalmente quando, na etapa de produção das mudas, não é feita uma avaliação fitossanitária das plantas matrizes (Tatagiba, J.S. et al., 2002).

No início da década de 1990, Dorizzoto & Abreu (1993) constataram a presença de mancha manteigosa em lavouras de *Coffea arabica* do município de Cristais MG, causando manchas nas folhas e morte dos cafeeiros. As manchas localizavam-se na parte ventral das folhas, em áreas circulares localizadas, de cor verde-claro, com diâmetro de 3-5 mm e, no centro destes círculos, desenvolviam-se áreas necróticas em cor marrom-claro.

O controle da antracnose normalmente é feito por meio de aplicações de fungicidas à base cobre, enquanto que, para a mancha manteigosa, ainda não foram padronizados métodos de controle.

## **2.2 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)**

O solo possui uma grande diversidade de microrganismos, muitos dos quais vivem próximos à rizosfera ou no rizoplano de plantas, ambientes na interface solo-raiz onde há intensa atividade microbiana graças à expressiva liberação, pelas plantas, de substâncias que servem de substrato aos microrganismos. Nesses ambientes, diversos grupos de organismos multiplicam-se, interagem e sobrevivem vencendo a pressão antagonística do restante da microflora e microfauna do solo. Parte desses microrganismos é constituída pelas rizobactérias. A interação das plantas com as rizobactérias pode resultar em efeito nocivo, nulo ou benéfico para o vegetal (Kloepper et al., 1992; Silveira et al., 1995; Kloepper, 1996; Luz, 1996; Moreira & Siqueira, 2002; Freitas et al., 2003).

Freitas (1989) verificou que plântulas de café inoculadas com isolados de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* foram beneficiadas, apresentando maior peso de matéria seca em relação àquelas não inoculadas. Contudo, os processos envolvidos nesse estímulo do crescimento não foram caracterizados.

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) podem ser classificadas de acordo com a influência exercida sobre o vegetal. Podem ser biofertilizadoras (como, por exemplo, aquelas que fixam o nitrogênio atmosférico e o disponibilizam para a planta), fitoestimuladoras, (aquelas que promovem o crescimento e o aumento de produtividade das culturas por meios da produção de hormônios), ou agentes biocontroladores (certas bactérias capazes de proteger as plantas de infecções por organismos fitopatogênicos). Tanto bactérias existentes na rizosfera, quanto bactérias endofíticas que sobrevivem e se multiplicam no interior da planta sem causar doença, podem levar à melhoria do desempenho da planta em condições de estresses bióticos ou abióticos (Luz, 1996; Barka, 2000; Cattelan & Hartel, 2000). No caso específico da ação de rizobactérias no controle de fitopatógenos, há evidências do seu envolvimento em processos de antagonismo microbiano, como a produção de antibióticos (antibiose) com efeito direto sobre patógenos e a indução nas plantas de resistência sistêmica à doenças (Luz, 1996; Cattelan & Hartel, 2000).

O conhecimento de como e porque o biocontrole de patógenos é exercido pelas rizobactérias permanece ainda muito ligado a especulações, necessitando de evidências e comprovações científicas consistentes que deverão surgir com a continuidade das pesquisas nessa linha. Em alguns casos, parece ocorrer o controle biológico clássico (Tuzun & Kloepper, 1995), por antagonismo direto exercido pela RPCP contra o fitopatógeno, utilizando, por exemplo, o mecanismo de antibiose (Agrios, 1997). Contudo, nem sempre isso explica plenamente o controle do patógeno, como verificado quando adiciona-se a rizobactéria na rizosfera e a parte aérea fica mais resistente a patógenos que atacam este compartimento da planta (Kloepper, 1996; Raupach et al., 1996). Pode ser que o agente de controle esteja realmente induzindo resistência, como também agindo diretamente sobre o patógeno ou, mesmo, fazendo as duas coisas ao mesmo tempo (Sticher et al., 1997; Van Loon et al., 1998).

### **2.3 Controle alternativo de doenças de plantas**

A cultura do café é uma das principais fontes de divisas para o Brasil. A maior competição nos mercados interno e externo e o elevado custo de produção exigem que sejam eliminadas quaisquer fontes de perdas nas lavouras (Matiello e Almeida, 1997). As doenças estão entre os fatores responsáveis por essas perdas, desde o viveiro até as etapas de produção. Tradicionalmente, os tratamentos fitossanitários na lavoura de café são baseados na utilização de defensivos convencionais, os chamados agrotóxicos, os quais apresentam vários inconvenientes relacionados, principalmente, aos aspectos econômico e de segurança ambiental.

As preocupações com o meio ambiente, a segurança dos aplicadores, a saúde pública, o custo de produção e a resistência de patógenos a pesticidas têm estimulado as tentativas para reduzir a quantidade de fungicidas utilizados na agricultura e a busca de métodos alternativos de controle das principais doenças das plantas cultivadas (Shtienberg et al., 1994).

Pesquisadores têm buscado a associação de fungicidas convencionais e bioprotetores, possibilitando o controle de várias doenças causadas por patógenos de solo e da parte aérea (Baker & Scher, 1987; Conway et al., 1997; Luz, 2003a,b). Essa combinação permite uma redução de dosagens de fungicidas (Mathre et al., 1995, Luz, 2003a,b) e previne o aparecimento de patógenos resistentes (Duffy, 2000).

O conceito de produto natural é estendido a todos os componentes de origem biológica, que podem ser específicos de um único organismo ou comum a um grupo deles. A utilização destes produtos pelo ser humano já era comum na Idade Média e ocorre até os dias atuais, com diferentes direcionamentos (Mann, 1987). Apesar disso, o uso de substâncias naturais na agricultura é ainda pouco difundido no Brasil.

Os compostos químicos sintetizados pelos organismos vivos sofrem uma série de reações, resultando nos compostos metabólicos que se dividem em primários e secundários. Os produtos dos metabolismos primários, essenciais aos organismos, seriam os açúcares, os aminoácidos, os ácidos graxos, os nucleotídeos e seus polímeros (Costa, 2000). Os metabólitos secundários não fazem parte das rotas essenciais. Acredita-se que estes compostos são ativados em períodos particulares do desenvolvimento ou durante algum período de estresse. A produção e a diversidade dos metabólitos estão relacionadas com o potencial biossintético do organismo e as condições para a sua expressão, sendo que alguns parâmetros podem ser manipulados para ajudar a produção de diversos metabólitos secundários (Yarborough et al., 1993).

O primeiro metabólito microbiano intensamente trabalhado por pesquisadores foi o antibiótico penicilina, resultante de reações químicas da rota do metabolismo secundário do fungo *Penicillium chysogenum*. A partir desta descoberta, o antibiótico passou a ter produção industrial e cresceu o interesse pelos produtos metabólicos das bactérias e demais microrganismos.

Solos supressivos contendo rizobactérias possuem a capacidade de controlar, por mecanismos naturais, doenças de plantas causadas por fungos e bactérias. Os mecanismos responsáveis por essa atividade de biocontrole incluem competição por nutrientes e espaço, resistência induzida, produção de metabólitos e controle biológico. Motomura et al. (1997) isolaram bactérias do solo com atividade *in vitro* contra o patógeno *Fusarium moliniiforme* e demonstraram ser essas bactérias mais eficazes no controle de doenças fúngicas do arroz que fungicidas sintéticos, como benomyl, triflumizole, perfurazoate e prochloraz.

Bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* são as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) mais estudadas no mundo todo quanto ao antagonismo a patógenos de plantas, apesar de outras rizobactérias (algumas ainda não identificadas de forma precisa) também demonstrarem tal

capacidade. As bactérias fluorescentes *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida* são capazes de colonizar diversas culturas e são antagonistas a vários patógenos de solo (Kloepper & Schroth, 1981; Suslow & Schroth, 1982; Luz, 1996). Hebbbar et al. (1992a) avaliaram a capacidade antifúngica da bactéria antagonista *Pseudomonas cepacia*, em relação a diversos patógenos como *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum lindemuthianum*, evidenciando o potencial de controle alternativo desses fungos.

As rizobactérias do gênero *Bacillus* são igualmente promissoras no controle de diversos fitopatógenos e são conhecidas pela sua capacidade de produção de compostos antibióticos com ação antifúngica (Melo & Valarini, 1995; Bettioli et al., 1997; Batista Junior et al., 2002; Kupper et al., 2003).

É importante ressaltar que as plantas também produzem substâncias de defesa eficientes, porém, o conhecimento mais detalhado dos mecanismos envolvidos é recente e ainda muito limitado. O desenvolvimento de tecnologias específicas para ativá-los representa um desafio para a pesquisa agronômica.

No Brasil, a grande diversidade de espécies de plantas e de microrganismos possibilita a ocorrência de interações múltiplas, mas são escassos os estudos sobre a interação entre eles e sobre o efeito das substâncias produzidas. Essa é uma vertente promissora no controle alternativo de doenças de plantas. Nesse aspecto, o controle biológico e a resistência induzida constituem instrumentos de manejo inteligente a serem estudados cientificamente e aprimorados em termos tecnológicos, para que possam ser utilizados pelos agricultores.

### 2.3.1 Controle biológico

Conceitualmente, o controle biológico está relacionado à supressão de um microrganismo fitopatogênico pela ação direta de um microrganismo antagonico, por meio de processos de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (Cook & Baker, 1983).

O antagonismo de rizobactérias a fitopatógenos bacterianos ou fúngicos pode dar-se por antibiose, mecanismo associado à produção de substâncias com propriedades antibióticas. Os antibióticos sintetizados por bactérias podem apresentar estruturas heterocíclicas nitrogenados, como as fenazinas, pirrolnitrina, piocianina e derivados do indol. Nielsen (1999), citado por Costa (2000), cita os metabólitos antifúngicos pertencentes ao grupo dos lipopeptídeos cíclicos, tais como a tensina e o viscisinamida. Dentre os antibióticos, incluem-se ainda substâncias como o 2,4-diacetilfloroglucinol (McLoughlin et al., 1992; Pierson & Thomashow, 1992; Cattelan & Hartel, 2000).

Fungos como *Fusarium*, *Phomopsis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* e *Macrophomina* tiveram seu crescimento *in vitro* inibido na presença de isolados de *Pseudomonas* obtidos da rizosfera de soja. A emergência de sementes de soja altamente infectadas pelos fungos foi incrementada em 17% quando se adicionaram às sementes as substâncias produzidas por um dos isolados (Cattelan, 1994). Um isolado de *Pseudomonas cepacia* promoveu aumento da emergência do girassol na presença do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (McLoughlin et al., 1992). Essa bactéria produz um antibiótico com características antagonicas ao crescimento de patógenos fúngicos (Papavizas & Lumsden, 1980; Lambert et al., 1987; Hebbar et al., 1991).

Além da produção de antibióticos, a liberação das enzimas quitinase e  $\beta$ -1,3-glicanase está relacionada ao antagonismo de algumas rizobactérias a

fitopatógenos fúngicos, uma vez que tais enzimas degradam a quitina e o  $\beta$ -1,3-glicana que compõem a parede celular dos fungos (Schroth & Hancock, 1981).

A capacidade de controlar *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Pythium ultimum* de um isolado de *Pseudomonas cepacia* foi relacionada à produção de  $\beta$ -1,3-glicanase, ficando comprovado que a síntese dessa enzima era estimulada na presença de paredes celulares de fungos (Fridlender et al., 1993). Uma estirpe da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, isolada das rizosferas de beterraba, trigo e feijão, excreta altos níveis de quitinase, glicanase, lipase e protease. A estirpe é antagonista dos fungos *Bipolaris sorokiniana*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* (Zhang & Yuen, 2000; Yuen, 2001).

### 2.3.2 Indução de resistência

A indução de resistência em plantas contra vários patógenos é conhecida desde 1930, quando Chester (1933) propôs o termo “imunidade fisiológica adquirida”. Naquela época, foi verificado que plantas inoculadas com microrganismos ficavam protegidas contra infecções posteriores pelo mesmo organismo ou contra outros semelhantes. Entretanto, apenas em tempos recentes este fenômeno começou a ser estudado com maior interesse, buscando uma melhor compreensão relacionada ao tema.

A resistência induzida é proporcionada por um agente indutor que aciona mecanismos de defesa na planta, os quais encontram-se na forma latente (Hammerschmidt & Kuc, 1982). Essa ativação pode ser obtida pelo tratamento da planta com agentes bióticos, como microrganismos viáveis ou inativados (Stangarlin & Pascholati, 1997; Hoffand et al., 1996), ou ativadores químicos, como o ácido aminobutírico (Cohen, 1996) e o Bion<sup>®</sup> (Ciba, 1995). O agente indutor pode ser ainda um extrato de células de microrganismos (Romeiro & Kimura, 1997; Leeman et al., 1995).

Moléculas que ativam alguma resposta de defesa da planta são conhecidas como elicitores. Os elicitores podem ser exógenos, quando purificados a partir de microrganismos, endógenos, se extraídos da própria planta, e podem ser ainda de origem abiótica (Davis et al., 1986; Gustine et al., 1995). Existe diversidade quanto à natureza química dos elicitores, demonstrando que não há uma característica estrutural única responsável por esta atividade (Smith, 1996).

Mais recentemente, a atuação de RPCPs como indutoras de resistência em culturas contra diversos patógenos tem sido demonstrada (Wei et al., 1991; Vidhyasekaran & Muthamilan, 1999). Pesquisas têm fornecido indicativos de que as rizobactérias promovem uma resistência sistêmica generalizada, pela qual a planta fica protegida contra mais de um patógeno, ao contrário do controle biológico clássico, que se apresenta sob uma forma mais específica (Alström, 1991; Tuzun & Kloepper, 1995; Wei et al., 1996;).

A lista de *Pseudomonas* tidas como indutoras de resistência sistêmica está aumentando rapidamente e a indução é genotipicamente dependente, em relação à bactéria e à planta (Bloemberg 2001). Os derivados bacterianos ligados à ativação de mecanismos de resistência sistêmica incluem sideróforos, antígeno de lipopolissacarídeo e o ácido salicílico. Esse último composto parece ser efetivo mesmo quando presente em baixíssimas quantidades (nanogramas).

#### **2.4 Emprego de filtrados de rizobactérias no controle de fitopatógenos**

Segundo Bloemberg (2001), a aplicação em larga escala de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, por inoculação ou pulverização das culturas, pode ser vantajosa, uma vez que possibilita reduzir substancialmente o uso de agroquímicos. Bactérias isoladas da rizosfera de uma determinada espécie de planta podem favorecer o crescimento de outras espécies vegetais (Freitas, 1989; Melo e Valarini, 1995). Ao que tudo indica, a presença da



rizobactéria viva junto à planta não é indispensável para que ocorra o controle de fitopatógenos, uma vez que esse benefício pode ser alcançado com a aplicação apenas das substâncias extraídas de culturas rizobacterianas (Chet et al., 1990; Cattelan, 1994; Bettiol et al., 1997; Kupper et al., 2003).

Considerando esse contexto, a utilização de substâncias obtidas a partir de rizobactérias selecionadas e cultivadas em laboratório apresenta um potencial promissor no controle de doenças de plantas. Além da maior praticidade, uma tecnologia dessa natureza teria a vantagem de não importar o aspecto de “compatibilidade” da RPCP em relação à cultura de interesse, o que pode ser um fator condicionante quando se trabalha com a inoculação de rizobactérias. Nesse caso, o que importa é basicamente a atividade antimicrobiana das substâncias produzidas pelas RPCPs.

A detecção do efeito antifúngico de extratos de culturas de rizobactérias representa o ponto de partida no desenvolvimento dessa tecnologia para a cultura do café, o que certamente também favorecerá a disseminação do seu uso para diversas outras culturas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Inicialmente, foi realizado um experimento *in vitro* visando selecionar filtrados de rizobactérias que apresentassem ação antimicrobiana contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causador da “mancha manteigosa” do cafeeiro. Os filtrados considerados mais promissores foram testados posteriormente num experimento *in vivo*, no qual plântulas de café foram submetidas a tratamentos combinando a aplicação dos filtrados e inoculação com *C. gloeosporioides*.

#### 3.1 Obtenção dos filtrados de rizobactérias

As rizobactérias utilizadas nos experimentos foram obtidas de raízes de plantas de capuxinha, café, tomate, pimentão e de cacau. As raízes foram lavadas em água de torneira, com o intuito de retirar o excesso de solo aderido à superfície das mesmas e, em seguida, trituradas em liquidificador com sulfato de magnésio 0,1M. A mistura foi coada e a suspensão transferida para placa de petri contendo meio de cultura TSA (40g/L de água) sólido. As culturas ficaram 25°C incubadas por 24 horas. Após esse tempo, as colônias foram repicadas para o meio de cultura TSB (40g/L de água) líquido e transferidas para agitadores tipo “shakers” a 100 rpm, assim permanecendo por 10 dias à temperatura de 28°C. Nesse período, as bactérias realizaram a exocitose, processo pelo qual diversos compostos metabólicos são liberados para o meio. Posteriormente, as soluções resultantes de cada cultura foram centrifugadas e os respectivos sobrenadantes foram filtrados em membrana milipore. Os filtrados foram mantidos em freezer a -10°C, sendo assim preservados até o momento de sua utilização nos testes *in vitro* e *in vivo*.

### 3.2 Obtenção do inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*

O inóculo de *C. gloeosporioides* utilizado nos experimentos foi obtido da micoteca do Laboratório Controle de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFLA por ser um isolado patogênico. Este isolado foi isolado a partir de folhas colhidas de plantas de café com sintomas da mancha manteigosa. Os esporos (conídios) foram cultivados em meio de cultura MEA 2% (extrato de malte e ágar) durante 7 dias, em câmara de crescimento a 25°C. Após a esporulação, foi feita lavagem superficial das colônias com 5 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de petri, promovendo a retirada dos conídios com auxílio de um pincel, sendo a suspensão resultante filtrada em gase. As concentrações das suspensões foram ajustadas para  $10^4$  e  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

### 3.3 Experimento *in vitro*

No experimento *in vitro* avaliaram-se 42 filtrados de culturas de rizobactérias. Neste estudo não se procedeu à identificação das espécies de bactérias presentes nos isolados a partir dos quais foram obtidos os filtrados, haja vista que, num primeiro momento, o interesse principal foi o de avaliar a atividade antifúngica dos materiais.

Cada filtrado foi testado na sua concentração original (100%) e em outras quatro concentrações, sendo feitas diluições com água destilada a fim de se obter 50%; 25%; 12,5% ou 6,25% do filtrado na solução resultante.

O experimento foi montado em placas de petri, colocando-se no fundo uma folha de papel de filtro umedecido com água destilada e um suporte de vidro e, sobre este, uma lâmina escavada com três cavidades. Cada cavidade representou uma repetição. Os tratamentos foram aplicados colocando-se, nas

cavidades das lâminas escavadas, 40 µl da solução contendo o filtrado e 40 µl da suspensão de esporos do fungo. Para fins de comparação, utilizou-se uma testemunha contendo apenas a suspensão de esporos, sem a adição de filtrados, constituindo um tratamento adicional.

Por necessidade operacional no laboratório, o experimento foi dividido em três baterias com tratamentos-testemunha individuais e conduzidas independentemente, comparando, respectivamente, 27, 8 e 7 filtrados. Dessa forma, trabalhou-se com três ensaios no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial testando-se filtrados e concentrações, com um tratamento adicional contendo apenas a suspensão de esporos sem a adição de filtrados, (7x5+1; 8x5+1 e 27x5+1).

A atividade antifúngica dos filtrados foi avaliada mediante análise microscópica (microscópio de luz), verificando a ocorrência de inibição da germinação dos esporos de *Colletotrichum* em cada tratamento. Após o tempo necessário para que os esporos germinassem (8 horas de incubação), foram adicionados 20 µl de lactoglicerol (obtido pela mistura de 30mL de água destilada + 30mL de ácido láctico + 30mL de glicerina + 0,05mL de azul tripan) para paralisar o processo, permitindo avaliar a germinação, evidenciada pela emissão do tubo germinativo. A superfície abaxial da cavidade da lâmina escavada (repetição) foi marcada com caneta hidrocor, tendo sido determinados cinco pontos para amostragem, sendo um no centro da cavidade e quatro nas extremidades cardeais da mesma ( formato de cruz), fez-se contagem aleatória de 200 esporos, contabilizando o número de esporos germinados. Os valores obtidos foram convertidos em porcentagem de germinação.

### 3.4 Experimento *in vivo*

Quatro dos filtrados mais promissores, selecionados a partir do experimento *in vitro*, foram estudados para confirmação de sua ação antifúngica contra *C. gloeosporioides* e controle da mancha manteigosa em mudas de café. Tais filtrados são identificados pelos códigos D1-5411, D1-5628, D1-5825 e D1-5729, sendo o primeiro derivado de rizobactérias obtidas de raízes da capuxinha e os demais do tomateiro. Nessa seqüência, os filtrados serão referenciados ao longo do texto como F1, F2, F3 e F4, respectivamente. Até o momento, não se dispõe da classificação exata das espécies de rizobactérias associadas a cada filtrado, mas sabe-se que uma delas pertence ao gênero *Bacillus*.

As plantas de café utilizadas no experimento *in vivo* foram da cultivar Icatu Amarelo IAC-3282, considerada moderadamente suscetível ao *Colletotrichum gloeosporioides* (Orozco Miranda, 2003). Após a retirada do pergaminho, as sementes foram lavadas em água corrente por um período de 48 horas. Em seguida, as sementes foram desinfestadas com álcool 50% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 1% por mais um minuto, sendo lavadas com água destilada esterelizada por três vezes e colocadas sob papel de filtro esterilizado para eliminar o excesso de água na superfície do grão. As sementes foram então colocadas em placas de petri de 15 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e incubadas a 25°C por cinco dias no intuito de eliminar aquelas que apresentassem desenvolvimento de patógenos em sua superfície.

Após esse procedimento de incubação, as sementes aparentemente tidas como isentas de patógenos foram transferidas para bandejas de polietileno contendo papel de filtro umedecido com água destilada e esterelizada, sendo cobertas por papel alumínio com furos provocados por estilete e colocadas em

saco de polietileno formando uma câmara úmida. As bandejas foram mantidas em BOD a 25°C, com o propósito de obter uma germinação mais rápida e uniforme sob condições controladas. No momento do surgimento da radícula, as sementes foram transferidas para substrato comercial Bioplant<sup>®</sup> (substrato à base de matéria orgânica de origem vegetal e vermiculita expandida com pH 5,2-6,0 produzido por Bioplant Misturadora Agrícola Ltda) em copos plásticos de 200 mL, dispostas em número de cinco por recipiente, permanecendo por 30 dias em câmara de crescimento a 25°C.

O experimento foi instalado em delineamento de blocos casualizados, num esquema fatorial 4x4+2, combinando a pulverização com cada um dos quatro filtrados de rizobactérias (F1, F2, F3 e F4) e quatro modos de inoculação do cafeeiro com o *C. gloeosporioides*: 1- ausente (sem inoculação do patógeno *C. gloeosporioides*), 2- antes (inoculação do patógeno dois dias antes da aplicação do filtrado), 3- junto (inoculação do patógeno no momento da pulverização com filtrado) e 4- depois (inoculação do patógeno dois dias depois da aplicação do filtrado). Quando as plântulas apresentavam hipocótilos na fase de “palito de fósforo”, com cerca de três centímetros de altura, foram aplicados os tratamentos. Em dois tratamentos adicionais foram empregadas uma testemunha absoluta que recebeu pulverização com água pura e uma outra que somente recebeu inoculação com *C. gloeosporioides*. Foram empregadas quatro repetições, sendo cada parcela experimental constituída de dez copos plásticos com cinco plantas cada (50 plantas por repetição).

Nos tratamentos pertinentes, a inoculação com *Colletotrichum* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Van der Vossen et al. (1977). As plântulas (hipocótilos) de cafeeiro foram colocadas em câmara úmida 24 horas antes da inoculação, a qual foi efetuada com um pulverizador manual. Ao final de cada operação dos modos de inoculação, retirou-se uma alíquota de 120 µl da suspensão de conídios que foi transferida para lâminas escavadas com

o objetivo de avaliar o percentual de germinação do inóculo utilizado, certificando sua viabilidade.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. As bandejas de polietileno contendo hipocótilos inoculados permaneceram, por todo o período de condução, com umidade relativa próxima ao ponto de saturação (100%), com o intuito de favorecer a germinação dos esporos e penetração no cafeeiro.

Aos 35 dias após a aplicação dos filtrados, avaliou-se a severidade da mancha manteigosa nos diversos tratamentos. Para tanto, foi usada uma escala de notas adaptada e modificada de Van der Vossen et al. (1976) (Tabela 1). A partir desses dados foi determinado o índice de doença (ID), conforme fórmula proposta por Cirulli & Alexander, citados por Lima (1981):

$ID = \Sigma (F \times V) / (N \times X) \times 100$ , em que:

F= número de plantas com determinado grau de sintomas;

V= grau de sintomas;

N= número total de plantas inoculadas;

X= grau máximo de sintoma.

TABELA 1 Critérios de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* sp. apresentado por plantas de café.

Nota (grau de sintomas)	Severidade / Sintomas
1	Ausência de reação visível
2	Lesões iniciais nas folhas (Figura 1A)
3	Lesões acentuadas nas folhas (Figura 1B)
4	Lesões com início de estrangulamento no hipocótilo
5	Lesões acentuadas no hipocótilo (Figura 1C)
6	Planta morta (Figura 1D)

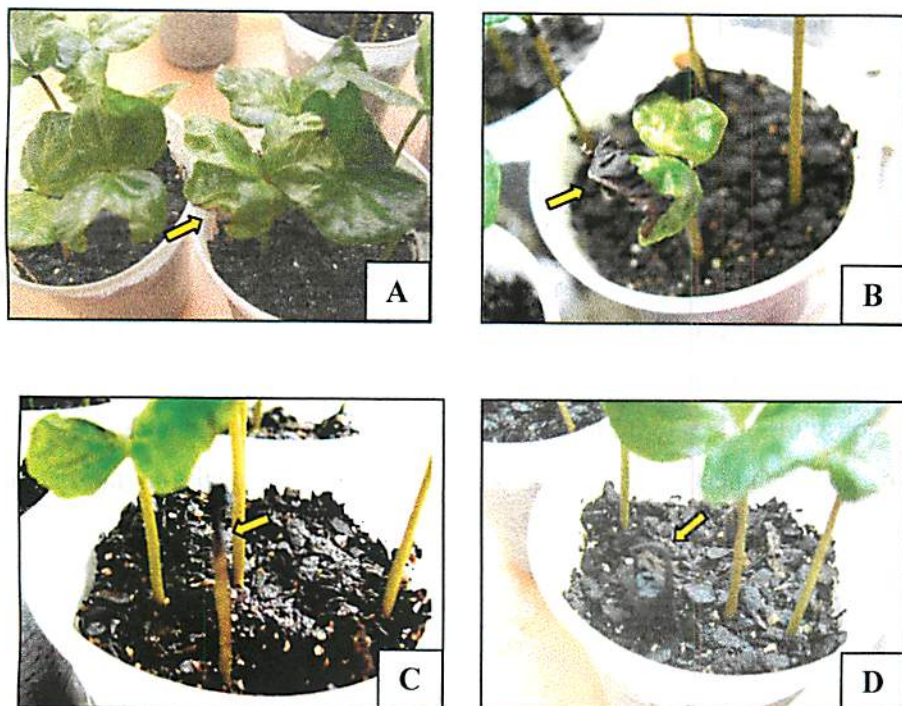


FIGURA 1. Sintomas de caracterização do grau de severidade da mancha manteigosa considerados na definição da escala de notas.

Amostras de tecido das plantas que apresentaram os sintomas da mancha manteigosa foram coletadas com a finalidade de se proceder ao reisolamento do *C. gloeosporioides*, o que permitiu confirmar que a origem dos referidos sintomas realmente estava ligada à infecção da planta pelo fungo.

A altura das plantas foi medida e, em seguida, as mesmas foram colhidas e separadas em parte aérea e raízes. O material foi seco em estufa a 60°C até peso constante, determinando-se a matéria seca das partes.



### 3.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análises de variância, testes de médias e regressão utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000). Para os filtrados testados no experimento *in vitro*, foram ajustados modelos de regressão para germinação de esporos de *C. gloeosporioides* em função das concentrações de filtrado no meio. Para cada variável avaliada no experimento *in vivo*, as médias relacionadas aos tratamentos que constituíram o fatorial foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos adicionais foram comparados à média do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Filtrados de rizobactérias com ação antifúngica *in vitro*

Nas três baterias de teste que compuseram o experimento *in vitro* foi detectada inibição da germinação dos esporos de *C. gloeosporioides*, havendo interação significativa dos fatores filtrados e concentrações (Tabelas 1A, 2A e 3A). O desdobramento da interação permitiu constatar que houve efeito da concentração dos filtrados de rizobactérias sobre a germinação de esporos do fungo, para 18 dos 42 filtrados avaliados (Tabelas 4A, 5A e 6A). Os modelos de resposta obtidos para a aplicação desses 18 filtrados são apresentados nas Figuras 2, 3 e 4.

Com base nos resultados, verificaram-se distintos níveis de atividade antifúngica dos filtrados contra o agente causal da mancha manteigosa do cafeeiro. Apesar de estatisticamente consistentes, os efeitos de vários dos filtrados na germinação dos esporos de *C. gloeosporioides* foram pouco expressivos, em termos agronômicos, independentemente da concentração empregada. Por outro lado, alguns filtrados demonstraram efetiva capacidade inibitória do fungo, reduzindo intensamente a porcentagem de germinação dos esporos com o aumento da concentração do produto no meio (Figuras 2, 3 e 4).

Essa grande variação nos resultados obtidos com os diferentes filtrados era esperada e pode ser explicada pela enorme diversidade de bactérias que têm como hábitat a rizosfera das plantas, onde podem estabelecer interações diversas com outros microrganismos ou com a espécie vegetal (Silveira et al., 1995). Como resultado dessas interações e influenciadas pelas demais características bióticas e abióticas do meio, as rizobactérias produzem uma gama de substâncias que podem ou não ter efeito antimicrobiano contra um patógeno de determinada cultura.

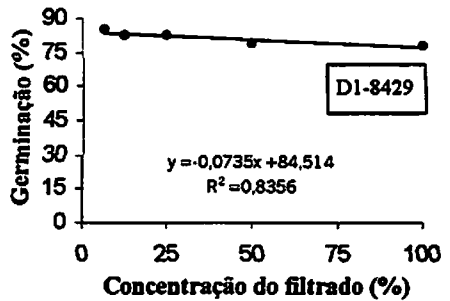
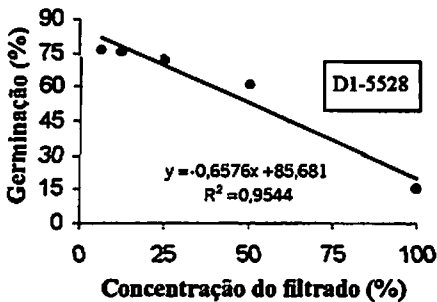
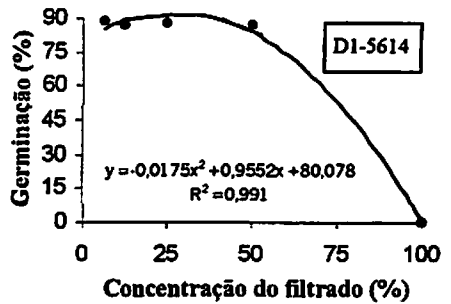
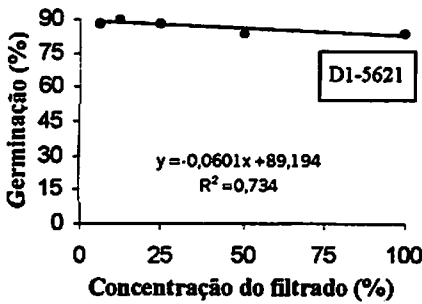
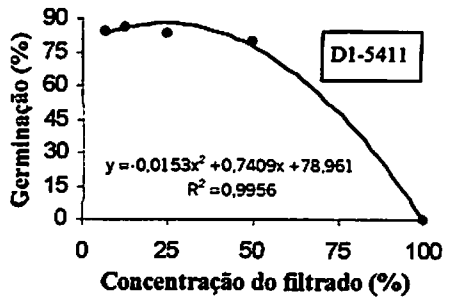
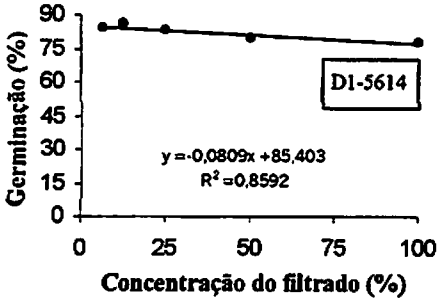
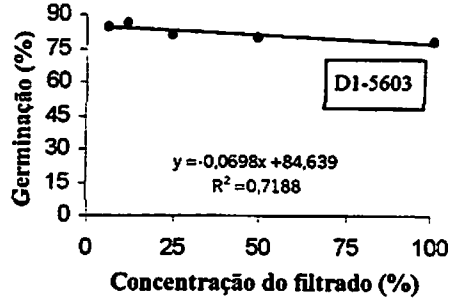
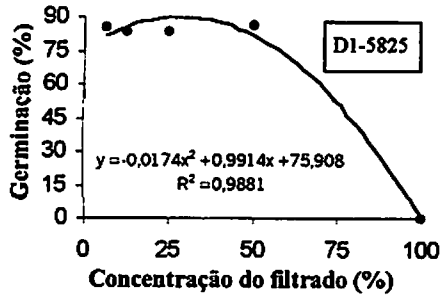


FIGURA 2 Germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de filtrados de rizobactérias em concentrações crescentes (1ª bateria do ensaio *in vitro*).

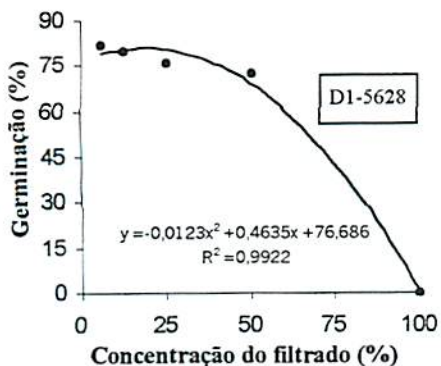
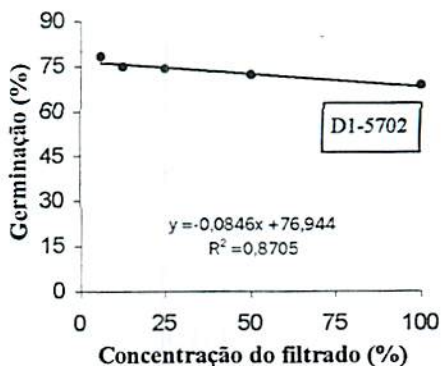
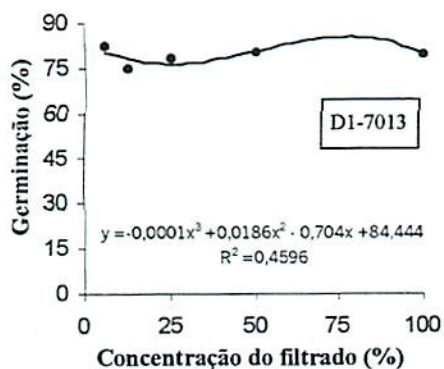
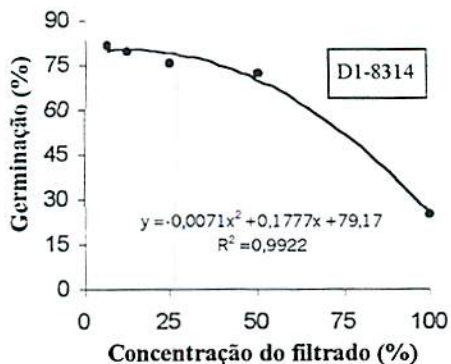
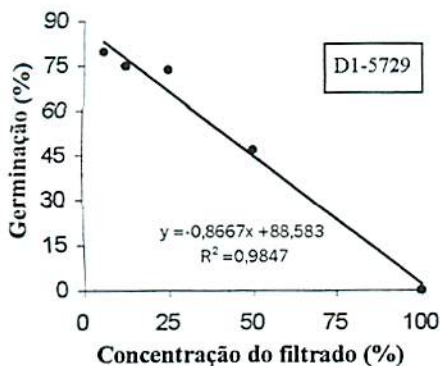


FIGURA 3 Germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de filtrados de rizobactérias em concentrações crescentes (2ª bateria do ensaio *in vitro*).

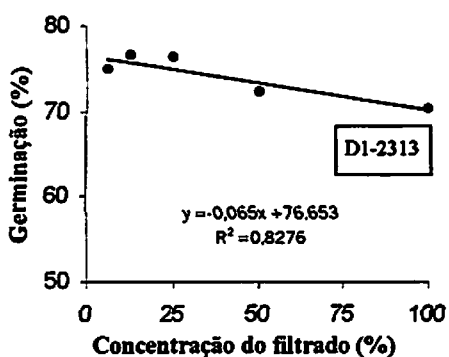
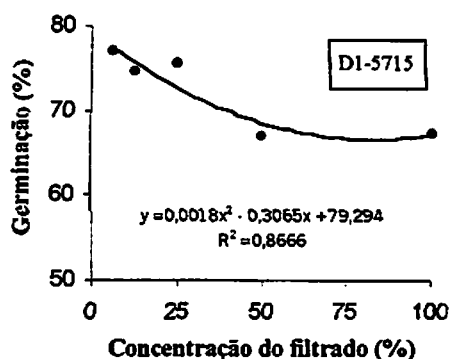
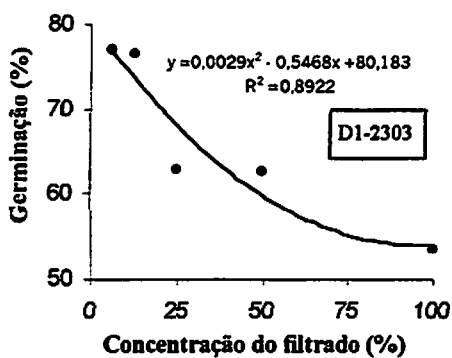
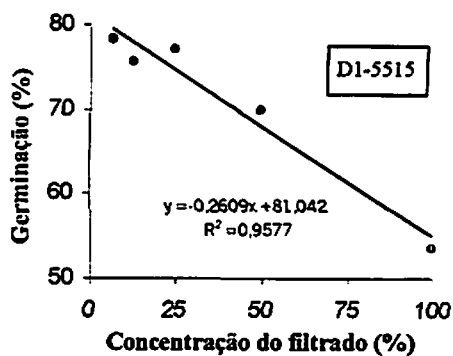
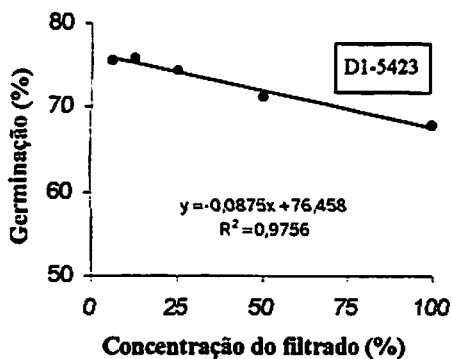


FIGURA 4 Germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de filtrados de rizobactérias em concentrações crescentes (3ª bateria do ensaio *in vitro*).

Outros trabalhos também evidenciam grande variabilidade de resultados em estudos de antagonismo de rizobactérias a fungos fitopatogênicos de diversas culturas. Diferentes isolados, mesmo que pertencentes a um único gênero ou espécie de rizobactéria, apresentam efeitos variáveis no controle de um dado patógeno (Wei et al., 1991; Freitas & Pizzinatto, 1997; Batista Junior et al., 2002; Kupper et al., 2003). Características como a composição do meio de cultivo usado para crescimento da rizobactéria e a idade da cultura bacteriana, podem condicionar o tipo de metabólito produzido, afetando a ocorrência do antagonismo *in vitro* (Wei et al., 1991; Hebbar et al., 1992b; Freitas & Pizzinatto, 1997; Lucon & Melo, 1999).

Estima-se que somente 2% a 5% das bactérias isoladas de raízes podem apresentar algum efeito favorável ao crescimento de plantas (Schroth & Hancock, 1981). Daí a necessidade de se avaliar grande número de isolados, como forma de aumentar a chance de encontrar agentes promissores para o biocontrole de fitopatógenos (Lucon & Melo, 1999).

A complexidade associada a estudos desse tipo é aumentada ainda mais pela reação distinta que as diferentes espécies fúngicas podem apresentar frente ao tratamento com rizobactérias ou com substâncias por elas produzidas (Chet et al., 1990; Wei et al., 1991; Cattelan, 1994; Batista Junior et al., 2002). Portanto, a ocorrência e a intensidade do efeito antimicrobiano de substâncias presentes em filtrados rizobacterianos e, conseqüentemente, os impactos sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, vão depender também de características intrínsecas à espécie fúngica em questão.

Dentre os mecanismos de antagonismo de rizobactérias a fitopatógenos, a antibiose, possivelmente, é o que está mais relacionado aos efeitos observados no presente estudo. Substâncias com propriedades antimicrobianas produzidas durante o cultivo estariam presentes nos filtrados ou extratos dessas culturas

de que esses filtrados podem ter algum efeito estimulador do crescimento em altura, o qual não estaria ligado a mecanismos de bioproteção.

Quando a inoculação com *C. gloeosporioides* foi realizada juntamente com a aplicação dos filtrados de rizobactérias (modo de inoculação “junto”), não observou-se diferença entre estes (Tabela 2). Este resultado confirma a similaridade dos resultados obtidos com os quatro produtos no experimento *in vitro*, no qual o contato dos filtrados com os esporos do fungo também se deu de forma direta e imediata. Já quando a inoculação foi feita antes ou depois da pulverização dos filtrados, os tratamentos com F4 apresentaram menor altura, enquanto que F2 foi o produto que proporcionou maior crescimento (Tabela 2).

Essas respostas variáveis podem ser decorrentes da origem distinta dos filtrados e das condições prevalentes no momento em que ocorreu o contato com o fungo. De qualquer forma, em termos de valores absolutos, o filtrado F4 tendeu a ocasionar menores alturas para todos os modos de inoculação, o que pode ser indicativo de sua menor eficácia.

TABELA 2. Altura (cm) de plantas de cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	4,66 a A	4,32 a AB	4,63 a A	3,92 a B	4,38
Antes	3,88 b AB	4,32 a A	3,89 b AB	3,47 a B	3,89
Junto	3,87 b A	3,61 b A	3,74 b A	3,75 a A	3,74
Depois	3,84 b AB	3,99 ab A	3,87 b AB	3,48 a B	3,79
Média	4,06	4,06	4,03	3,65	
Testemunha absoluta		4,37 ns			
Testemunha <i>Colletotrichum</i>		3,33 ns			

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

As respostas do cafeeiro à aplicação dos tratamentos refletiram também na produção de matéria seca. Os principais efeitos foram observados tanto no peso seco total (Tabela 3), quanto nos compartimentos parte aérea (Tabela 4) e raízes (Tabela 5). A testemunha absoluta foi estatisticamente superior à média do fatorial. Na realidade, nenhum dos tratamentos do fatorial proporcionou produção de matéria seca numericamente equiparável à da testemunha absoluta, evidenciando que, quando a planta recebeu aplicação de filtrado, na presença ou não do inóculo de *C. gloeosporioides*, houve efeito depressivo para a acumulação de matéria seca nas plantas. A ausência de diferença significativa da testemunha *C. gloeosporioides* em relação à média dos tratamentos do fatorial é indicativa de que um eventual controle do patógeno parece não ter resultado em maior crescimento em termos de produção de matéria seca. Diante dessa situação, as diferenças estatísticas detectadas entre alguns tratamentos (Tabelas 3, 4 e 5) não possibilitaram evidenciar tendências marcantes no que diz respeito à atividade dos filtrados no biocontrole da mancha manteigosa.

Por ocasião das avaliações do experimento, observou-se que as plantas de todos os tratamentos que foram pulverizados com filtrados apresentavam manchas cloróticas nas folhas, sintoma não presente nos dois tratamentos testemunha (os únicos que não receberam aplicação de filtrado). Isso sugere que, na concentração em que foram utilizados, os filtrados podem ter provocado algum distúrbio fisiológico ou fitotoxidez ao cafeeiro. Bettioli et al. (1997) obtiveram menor peso fresco de plantas quando uma solução com concentração mais elevada de metabólitos de *Bacillus subtilis* foi aplicada em pepino.



TABELA 3. Matéria seca (g) total de plantas de cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	3,79 a A	3,14 a B	3,78 a A	3,69 a AB	3,60
Antes	3,38 ab AB	3,26 a AB	3,61 a A	2,94 b B	3,30
Junto	3,02 b AB	2,93 a B	3,55 a A	3,45 ab AB	3,24
Depois	3,74 a A	3,07 a B	2,25 b C	3,49 ab AB	3,14
Média	3,48	3,10	3,30	3,39	
Testemunha absoluta	4,50 *				
Testemunha <i>Colletotrichum</i>	3,33 ns				

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* = a testemunha em questão difere (>) da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

TABELA 4. Matéria seca (g) da parte aérea do cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	2,95 a A	2,47 a A	2,95 a A	2,96 a A	2,83
Antes	2,67 ab A	2,59 a A	2,73 a A	2,27 b A	2,56
Junto	2,38 b A	2,18 a A	2,68 a A	2,69 ab A	2,48
Depois	2,96 a A	2,32 a B	1,73 b C	2,70 ab AB	2,43
Média	2,74	2,39	2,52	2,65	
Testemunha absoluta	3,46 *				
Testemunha <i>Colletotrichum</i>	2,57 ns				

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* = a testemunha em questão difere (>) da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

TABELA 5. Matéria seca (g) de raízes do cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	0,84 a A	0,67 a A	0,83 a A	0,74 a A	0,77
Antes	0,71 ab AB	0,67 a B	0,88 a A	0,68 a B	0,73
Junto	0,64 b B	0,75 a AB	0,87 a A	0,76 a AB	0,75
Depois	0,78 ab A	0,74 a A	0,53 b B	0,79 a A	0,71
Média	0,74	0,71	0,78	0,74	
Testemunha absoluta	1,04 *				
Testemunha <i>Colletotrichum</i>	0,76 ns				

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* = a testemunha em questão difere (>) da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Severidade da mancha manteigosa

Na avaliação da severidade da mancha manteigosa, por meio da determinação do índice de doença, a resposta aos tratamentos foi dependente apenas do modo de inoculação, não havendo efeito de filtrados ou interação dos fatores (Tabela 7A). Desse modo, considerando a média dos quatro filtrados, na ausência do *C. gloeosporioides*, o índice de doença foi menor em relação à presença do fungo inoculado antes, junto ou após a aplicação dos filtrados (Tabela 6).

Na média dos tratamentos do fatorial, o índice de doença não foi significativamente diferente em relação à testemunha absoluta, mas foi menor em relação à testemunha *C. gloeosporioides* (Tabela 6). Além disso, pode-se verificar que, numericamente, os índices de doença determinados para cada tratamento do fatorial sempre ficaram abaixo do valor obtido para a testemunha *C. gloeosporioides*. Portanto, depreende-se que a atuação dos metabólitos

presentes nos filtrados rizobacterianos proporcionou redução na incidência e severidade da mancha manteigosa.

O uso de substâncias derivadas do metabolismo de rizobactérias tem se mostrado promissor no controle de doenças fúngicas em diversos patossistemas como *Hemileia vastatrix* em cafeeiro (Bettiol et al., 1994), *Sphaerotheca fuliginea* em pepino e abóbora (Bettiol et al., 1997), *Colletotrichum acutatum* em citros (Kuper et al., 2003) e vários fungos em sementes de soja (Cattelan, 1994).

O controle da mancha manteigosa, resultante da aplicação dos filtrados, poderia estar associado à ação de compostos antibióticos produzidos pelas rizobactérias, havendo ainda a possibilidade da ocorrência de indução de resistência, ou de ambos os mecanismos operarem simultaneamente (Sticher et al., 1997; van Loon et al., 1998). No caso específico da rizobactéria *Bacillus subtilis*, a antibiose realmente parece ser o principal mecanismo de supressão de fungos (Bettiol et al., 1997; Kupper et al., 2003).

TABELA 6 Índice de doença (%) da mancha manteigosa do cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	16,77	16,78	16,95	17,04	16,88 b
Antes	19,57	19,75	20,52	20,50	20,09 a
Junto	19,65	19,14	19,29	21,45	19,88 a
Depois	19,56	20,39	22,70	20,01	20,67 a
Média	18,89 A	19,01 A	19,75 A	19,86 A	
Testemunha absoluta					16,67 ns
Testemunha <i>Colletotrichum</i>					29,85 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* = a testemunha em questão difere (>) da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ( $p < 0,05$ ).

Houve alguma variação nos valores absolutos do índice de doença para as combinações de filtrados e modos de inoculação do *C. gloeosporioides* (Tabela 6). É interessante observar que, mesmo na ausência de inóculos do patógeno, os índices denotam a ocorrência de algum dos sintomas da doença que constam na escala de notas usada na avaliação do experimento (Tabela 1). A dificuldade de identificação visual dos sintomas da mancha manteigosa ou a possibilidade da presença endofítica do fungo nas sementes utilizadas (Orozco Miranda, 2003) são fatores que podem explicar tal resultado.

Não há diferenças nítidas entre os filtrados em relação à capacidade de controle da mancha manteigosa (Tabela 6), o que está coerente com a eficácia similar dos quatro produtos, obtida no experimento *in vitro*. Entretanto, é preciso observar que, no experimento com plantas, o controle da doença pela pulverização dos filtrados foi apenas parcial, cerca de 35%.

A eficácia de alguns isolados de rizobactérias ou de seus metabólitos no biocontrole pode ser restringida se as condições do ambiente forem altamente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Kupper et al., 2003). No caso da mancha manteigosa, as condições experimentais de alta umidade (câmara úmida) e temperatura próxima de 25°C e a idade do tecido ser altamente macio quando inoculado, certamente favoreceram uma maior severidade da doença.

Diversos autores têm relatado as dificuldades associadas aos estudos com rizobactérias (Howie & Echandi, 1983; Chet et al., 1990; Cattelan, 1994; Willians & Asher, 1996; Freitas & Pizzinatto, 1997; Luz, 2001). A não-confirmação *in vivo* dos resultados obtidos *in vitro* e a enorme variação das respostas observadas em experimentos com diferentes plantas, patógenos e condições de condução, bem como, em diferentes locais e época de avaliação, representam grandes obstáculos ao desenvolvimento de tecnologias de biocontrole aplicáveis.

Embora a determinação do índice de doença não tenha evidenciado maiores diferenças entre os tratamentos combinando filtrados e modos de inoculação (Tabela 6), a análise da Figura 4 permite verificar uma tendência de maior mortalidade de plantas (aproximadamente 3%) no tratamento com F4 e *C. gloeosporioides* aplicados no mesmo dia, e nos tratamentos em que o fungo foi inoculado dois dias após a aplicação do filtrado.

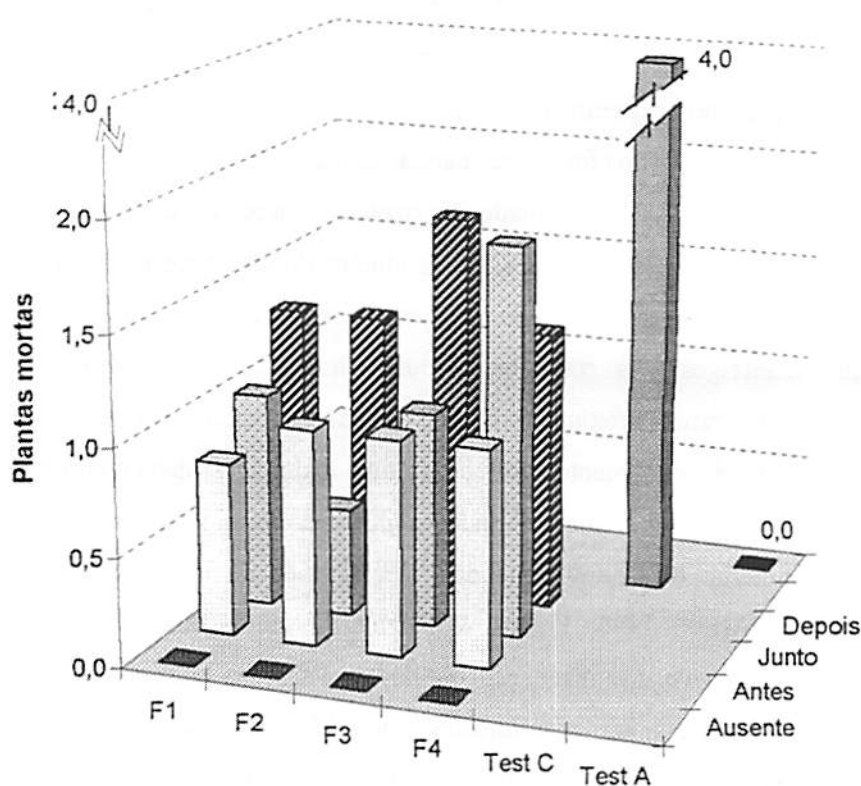


FIGURA 5. Número médio de plantas mortas nos tratamentos do experimento com o cafeeiro.

Uma menor atividade antifúngica de compostos rizobacterianos aplicados com grande antecedência em relação à inoculação com o patógeno também foi observada por Bettioli et al. (1997). Os autores detectaram menor percentual (90%) de redução das lesões nas folhas quando pulverizaram metabólitos de *Bacillus subtilis* 24 horas antes da inoculação de *Sphaerotheca fuliginea* em pepino. Quando a pulverização foi feita uma hora antes, uma hora depois ou 24 horas depois da inoculação, o controle das lesões foi em torno de 99%.

É possível que, quando a inoculação de *C. gloeosporioides* foi feita 48 horas depois da pulverização das plantas de café com filtrados, tenha ocorrido alguma degradação das substâncias antifúngicas presentes nos mesmos, reduzindo sua eficácia em proteger as plantas contra o patógeno. Por este raciocínio, deduz-se que esses filtrados devem ter efeito principalmente curativo, e não preventivo, da mancha manteigosa. Além disso, o mecanismo pelo qual os filtrados atuam no controle da doença deve estar relacionado não à indução de resistência, mas à ação direta exercida por substâncias antimicrobianas, provavelmente antibióticos, sobre o desenvolvimento de *C. gloeosporioides*.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais desse estudo, conclui-se que:

1. os filtrados de rizobactérias avaliados apresentaram ampla variação quanto à atividade antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Os filtrados D1-5614, D1-5411, D1-5628, D1-5825 e D1-5729 foram os mais promissores, chegando a inibir totalmente a germinação de esporos do fungo;
2. os quatro filtrados avaliados no experimento com plântulas de café tiveram eficácia similar no controle da mancha manteigosa. Entretanto, o controle da doença foi parcial;
3. os filtrados de rizobactérias avaliados mostraram efeito curativo no controle de mancha manteigosa do cafeeiro;
4. a aplicação dos filtrados resultou em efeito depressivo para ao crescimento do cafeeiro, proporcionando menor produção de matéria seca em relação à testemunha absoluta;
5. o mecanismo pelo qual os filtrados atuaram no controle, deve estar relacionado à ação direta exercida por substâncias antimicrobianas (antibiose).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados promissores foram alcançados na avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de filtrados de rizobactérias contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Contudo, no experimento *in vivo*, as respostas observadas quanto à capacidade de supressão da mancha manteigosa do cafeeiro não repetiram o nível obtido no laboratório e não permitiram discriminar os quatro filtrados testados em termos de eficácia.

Outro aspecto a considerar no experimento *in vitro*, seria testar um maior número de isolados por meio de uma técnica mais rápida, como a cromatografia em camada fina (TLC), a qual permitiria maior agilidade na seleção de filtrados com ação antifúngica.

Pelos resultados obtidos no presente estudo e corroborando outros trabalhos mencionados ao longo da discussão, ficou evidente a dificuldade de se estabelecer padrões de resposta para a utilização de produtos de origem rizobacteriana no controle de fitopatógenos. Por outro lado, ficou claro também que a continuidade dos estudos nessa linha poderá fornecer subsídios para a adequação do uso de filtrados de rizobactérias no manejo de doenças, potencializando os efeitos benéficos para as plantas.

É possível que aplicações dos filtrados e avaliações dos seus efeitos realizados em estádios mais avançados de desenvolvimento do cafeeiro possam revelar resultados mais consistentes no controle da mancha manteigosa sem que ocorram efeitos adversos dos próprios filtrados sobre o crescimento das plantas de café.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. San Diego: Academic Press, 1997. p. 635.

ALSTRÖM, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere *Pseudomonas*. *Journal General Applied Microbiology*, Tokyo, v. 37, n. 6, p. 495-501, Dec. 1991.

ALVES, E.; CASTRO, H. A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 4-7, jan./mar. 1998.

BAKER, R. R.; SCHER, F. Enhancing the activity of biological control agents. In: CHET, I. ( Ed.). *Innovative approaches to plant disease control*. New York:: J Wiley, 1987. p. 1-17.

BARKA, E. A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J.; AUDRAN, J. C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 186, n. 1, p. 91-95, May 2000.

BATISTA JUNIOR, C. B.; ALBINO, U. B.; MARTINES, A. M.; SARIDAKIS, D. P.; MATSUMOTO, L. S.; AVANZI, M. A.; ANDRADE, G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, ago. 2002.

BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. *Bragantia*, Campinas, v. 56, n. 2, p. 281-287, 1997.

BIANCHINI, C. Informe resumido sobre la mancha mantecosa, chasparria y ojo de gallo del café en Costa Rica. *Café*, Turrialba, v. 2, n. 5, p. 29-34, 1960.

BITTANCOURT, A. A. As manchas da folha do cafeeiro. *O biológico*, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 191-201, out. 1958.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 4, p. 343-350, Aug. 2001.

CASTRO, A. G. **Defensivos agrícolas como um fator ecológico**. Jaguariúna: EMBRAPA- CNPDA, 1989. 20 p. (EMBRAPA- CNPDA. Documento, 6).

CATTELAN, A. J. Antagonismo de *Pseudomonas* do grupo fluorescente a fungos fitopatogênicos de solo e de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 37-42, jan./abr. 1994.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Tópicos em Ciência do Solo**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 213-234, jan./abr. 2000.

CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quartely Review of Biology**, Baltimore, v. 8, p. 275-324, 1933.

CHET, I.; ORDENTLICH, A.; SHAPIRA, R.; OPPENHEIM, A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 129, n. 1, p. 85-92, Dec. 1990.

CIBA. CGA 245704. A plant activator for disease protection. **CIBA Technical Data Sheet**. Basel, 1995, 9p.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E.; SISLER, H. D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. p. 461-466.

CONWAY, K. E.; MANESS, N. E.; MOTES, J. E. Integration of biological and chemical controls for Rhizoctonia aerial blight and root rot of rosemary. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 7, p. 795-798, July 1997.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539 p.

COSTA, M. J. N. da. **Filtrados de culturas fúngicas e extratos de plantas e de esterco Animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Ksfoide & White Chitwood)**. 2000 115 p. Dissertação (Mestrado) -

DAVIS, K. R.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. Several biotic and abiotic elicitors act synergistically in the

induction of phytoalexin accumulation in soybean. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 23-32, 1986.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum coffeanum* Noack e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 26., 1993, Aracajú. Suplementos... Brasília: SBF, 1993b. v. 18, p. 306.

DUFFY, B. Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of rhizoctonia root rot and take-all of spring wheat. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 21-25, Feb. 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. Programa e resumos... São Carlos: UFScar, 2000. p. 255-258.

FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P. R. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **O Biológico**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 25-26, jan. 1978.

FRAVEL, D. R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. **Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 75-91, 1988.

FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 31-34, jan./abr. 1989.

FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 61-70, jan./fev. 2003.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 23, n. 1, p. 36-41, jan./mar. 1997.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1211-1221, Sept. 1993.

GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T. de. Doenças do Cafeeiro- *Coffea arabica* L. In: GALLI F. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2. cap. 11, p. 128-140.

GRIFFITH, G. W.; HERGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso* **Heredity**, Essex, v. 72, n. 3, p. 278-289, Mar. 1994.

GUSTINE, D. L.; SHERWOOD, R. T.; MOYER, B. J. Evidence for a new class of peptide elicitor of the hypersensitive reaction from the tomato pathogen *Pseudomonas corrugata*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 8, p. 848-853, Aug. 1995.

HAMMERSCHMIDT, D.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, 1982.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.

HEBBAR, K. P.; BERGE, O.; HEULIN, T.; SINGH, S. P. Bacterial antagonists of sunflower (*Helianthus annuus* L.) fungal pathogens. **Plant and Soil**, The Hague, v. 133, n. 1, p. 131-140, May 1991.

HEBBAR, K. P.; ATKINSIN, D.; TUCKER, W.; DART, P. J. Suppression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 1009-1020, Oct. 1992a.

HEBBAR, K. P.; DAVEY, A. G.; DART, P. J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: isolation and identification. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 979-987, Oct. 1992b.

HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; VAN PELT, J. A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 7, p. 757-762, July 1996.

HOWIE, W. J.; ECHANDI, E. Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 127-132, n. 2, 1983.

KLOEPPER, J. W. host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, Washington, v. 46, n. 6, p. 406-409, June 1996.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 6, p. 590-592, June 1981.

KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S.; KUC, J. A. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science Technology**, Abingdon, v. 2, n. 4, p. 349-351, 1992.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, set. 2003.

LAMBERT, B.; LEYNS, F.; VAN ROOYEN, L.; GOSSELÉ, F.; PAPON, Y.; SWINGS, J. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 9, p. 1866-1871, Aug. 1987.

LEEMAN, M.; PELT, J. A. V.; den OUDEN, F. M.; HEINSBROEK, M.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 9, p. 1021-1027, Sept. 1995.

LIMA, E. F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *Cephalosporioides* A. S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. 1981. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, viçosa, MG.

LUCON, C. M. M.; MELO, I. S. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 25, n. 2, abr./jun. 1999.

LUZ, W. C. Avaliação dos tratamentos biológico e químico na redução de patógenos em semente de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 93-95, jan./fev. 2003.

LUZ, W. C. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 37-40, jan./fev. 2003.

LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 16-20, mar. 2001.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-49, 1996.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1987. p. 574.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café "conilon" (*Coffea canephora*, Pierre), no estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1977. p. 172-173.

MATHRE, D. E.; JOHNSTON, R. H.; CALLAN, N. W.; MOHAN, S. K.; MARTIN J. M.; MILLER, J. B. Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedling diseases of Sh2 sweet corn. **Plant Diseases**, St. Paul, v. 79, n. 11, p. 1145-1148, Nov. 1995.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. Controle associado de doenças de cafeeiro. **Correio Agrícola**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 25-27, 1997.

McDONALD, J. A preliminary account of disease green coffee berries in Kenya colony. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 2, n. 2, p. 145-154, Oct. 1926.

McLOUGHLIN, T. J.; QUINN, J. P.; BETTERMANN, A.; BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1760-1763, May 1992.

MELO, L. S.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 326-330, maio/ago. 1995

MOREIRA, M. S. F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

MOTOURA, M.; SUWA, S.; HIROOKA, E. Y. Biological control: Microbial versus chemical fungicide on growth of rice infected with *Fusarium*

moniliforme. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 11-16, jan./mar. 1997.

NECHET, K. de L. Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado) -

NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.

NOACK, F. As manchas das folhas dos cafeeiros. São Paulo, 1902. (Boletim da Agricultura, n. 1).

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

OROZCO MIRANDA, E. F.; FREITAS, M.; PIGOZZO, P.; ABREU, M. S. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*coffea arabica*) no estado de MINAS Gerais. In: CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras, MG. Trabalhos apresentados... Lavras: Associação da Pós graduação/APG-UFLA, 2002a.

OROZCO MIRANDA, E. F.; PIGOZZO, P.; PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S. Estudo das relações compatíveis e incompatíveis de *Colletotrichum* spp. x cafeeiro. In: CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras, MG. Anais... Lavras: Associação da Pós graduação/APG-UFLA, 2002b.

PAPAVIZAS, G. C.; LUMSDEN, R. D. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 18, p. 389-413, 1980.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-454.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-53, 1994.

PIERSON, L. S.; THOMASHOW, L. S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 5, n. 4, p. 330-339, July/Aug. 1992.

RAUPACH, G. S.; LIU, L.; MURPHY, J. F.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J. W. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 8, p. 891-894, Aug. 1996.

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

ROMEIRO, R. S.; KIMURA, O. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, n. 11/12, p. 495-498, Dec. 1997.

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 35, p. 453-476, 1981.

SHTIENBERG, D.; RAPOSO, R.; BERGERON, S. N.; LEGARD, D. E.; DYER, A. T.; FRY, W. E. Incorporation of cultivar resistance in a reduced sprays strategy to suppress early and late blights of potato. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 1, p. 23-26, Jan 1994.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.; SILVA, L. R. C.; LOMBARDI, M. L. C. O.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 205-211, maio/ago. 1995.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 132, n. 1, p. 1-45, June 1996.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, p. 346, 1997.



STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Rhizobacteria of sugar beet: effects of seed applications and root colonization on yield. *Phytopathology*, St. Paul, v. 72, n. 2, p. 199-206, Feb. 1982.

TATAGIBA, J. S.; VENTURA, J. A.; COSTA, H.; FERRÃO, R. G. Clones de conillon e doenças no norte do Espírito Santo. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=241>>. Acesso em: 14 ago. 2002.

TUZUN, S.; KLOPPER, J. W. Potential applications of plant growth-promoting rhizobacteria to induced systemic disease resistance. In: REUVENI, R. (Ed). *Novel approaches to integrated pest management*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. p. 115-127.

van der VOSSSEN, H. A. M.; KOOK, R. T. A.; MURAKARU, G. N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noak (Sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. *Kenya Coffea*, Nairobi, v. 42, n. 493, p. 133-144, 1977.

van DER VOSSSEN, H. M.; COOK, R. T. A.; MURAKURU, G. N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noak (sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. *Euphytica*, Wageningen, v. 25, n. 3, p. 733-745, 1976.

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

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

VIDHYASEKARAN, P.; MUTHAMILAN, M. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Disease*, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 782-786, Aug. 1995.

WALLER, J. M.; BRIDGE, P. D.; BLACK, R.; HAKIZAT, G. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research*, Cambridge, v. 97, n. 8, p. 989-994, Aug. 1993.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, Dec. 1991.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, n. 2, p. 221-224, Feb. 1996.

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

WILLIAMS, G. E.; ASHER, M. J. C. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Protection*, Oxford, v. 15, n. 5, p. 479-486, Oct. 1996.

YARBROUGH, G. G.; TAYLOR, D. P.; ROWLANDS, R. T.; CRAWFORD, M. S.; LASURE, L. L. Screening microbial metabolites for new drugs: theoretical and practical issues. *The Journal of Antibiotics*, Kyoto, v. 46, n. 4, Apr. 1993.

YUEN, G. Y.; STEADMAN, J. R.; LINDGREN, D. T.; SCHAFF, D.; JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Protection*, Oxford, v. 20, n. 5, p. 395-402, June 2001.

ZHANG, Z.; YUEN, G. Y. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of Bipolaris leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Biological Control*, San Diego, v. 10, n. 3, p. 277-286, July 2000.

## ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (1ª bateria do ensaio “in vitro”) ...	55
TABELA 2A	Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (2ª bateria do ensaio “in vitro”) ...	56
TABELA 3A	Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (3ª bateria do ensaio “in vitro”) ...	57
TABELA 4A	Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentrações dentro do fator filtrados (1ª bateria do ensaio “in vitro”) .....	55
TABELA 5A	Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentrações dentro do fator filtrados (2ª bateria do ensaio “in vitro”) .....	56
TABELA 6A	Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentrações dentro do fator filtrados (3ª bateria do ensaio “in vitro”) .....	57
TABELA 7A	Resumo das análises de variância para altura, produção de matéria seca (MS) total, da parte aérea e de raízes do cafeeiro, e índice de doença em relação à incidência da mancha manteigosa. (Ensaio “in vivo”) .....	55

TABELA 1A. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* (1ª bateria do ensaio “in vitro”).

Fontes de variação	G.L.	QM
		Porcentagem de germinação
Filtrados	26	816,2520**
Concentrações	4	2588,1827**
Filtrados * concentrações	104	493,1635**
Fatorial vs adicional	1	28,0028*
Tratamentos	(135)	614,016957**
Resíduo	272	7,8073
Total	407	
Coeficiente de variação (%)		3,38

\* e \*\* = significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 2A. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* (2ª bateria do ensaio “in vitro”).

Fontes de variação	G.L.	QM
		Porcentagem de germinação
Filtrados	7	1434,2286**
Concentrações	4	3288,1875**
Filtrados * concentrações	28	775,27321**
Fatorial vs adicional	1	228,37398**
Tratamentos	(40)	1128,2094**
Resíduo	82	6,398374
Total	122	
Coeficiente de variação (%)		3,49

\*\* = significativo a 1%, pelo teste F.

**TABELA 3A. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* (3ª bateria do ensaio “in vitro”).**

Fontes de variação	G.L.	QM
		Porcentagem de germinação
Filtrados	6	128,9651**
Concentrações	4	449,8429**
Filtrados * concentrações	244	51,9373**
Fatorial vs adicional	1	53,3336*
Tratamentos	(35)	110,6569**
Resíduo	72	8,4444
Total	107	
Coefficiente de variação (%)		4,01

\* e \*\* = significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 4A. Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentrações dentro do fator filtrados (1ª bateria do ensaio “in vitro”).

Filtrado	Código de identificação	QM	
1	D1 - 5825	4320,2667	**
2	D1 - 5629	3,0667	ns
3	D1 - 5526	6,1667	ns
4	D1 - 8317	2,6667	ns
5	D1 - 5603	29,5667	**
6	D1 - 8310	14,7333	ns
7	D1 - 5614	33,2333	**
8	D1 - 8423	1,7333	ns
9	D1 - 5709	13,4333	ns
10	D1 - 8402	15,9333	ns
11	D1 - 8318	2,7667	ns
12	D1 - 5411	4221,6667	**
13	D1 - 5726	5,7667	ns
14	D1 - 5621	21,4333	*
15	D1 - 5530	2,7333	ns
16	D1 - 5423	5,5667	ns
17	D1 - 5616	8,7667	ns
18	D1 - 5403	3,1000	ns
19	D1 - 6204	3,0000	ns
20	D1 - 6220	5,5667	ns
21	D1 - 5614	4657,4333	**
22	D1 - 5528	1975,1000	**
23	D1 - 8429	28,1667	**
24	D1 - 5810	6,4333	ns
25	D1 - 5417	6,4333	ns
26	D1 - 5527	10,6000	ns
27	D1 - 5410	5,1000	ns
Resíduo		7,8073	

ns = não significativo

\* e \*\* = significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 5A. Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentrações dentro do fator filtrados (2ª bateria do ensaio “in vitro”).

Filtrado	Código de identificação	QM
1	D1 - 7017	3,5667 ns
2	D1 - 5729	3325,1667 **
3	D1 - 8314	1672,2333 **
4	D1 - 7013	20,2667 *
5	D1 - 7018	8,9333 ns
6	D1 - 5401	5,9333 ns
7	D1 - 5702	35,8333 **
8	D1 - 5628	3643,1667 **
Resíduo		6,3984

ns = não significativo

\* e \*\* = significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 6A. Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentrações dentro do fator filtrados (3ª bateria do ensaio “in vitro”).

Filtrado	Código de identificação	QM
1	D1 - 6905	17,3333 ns
2	D1 - 5423	34,2333 **
3	D1 - 6201	5,1667 ns
4	D1 - 5515	309,7333 **
5	D1 - 2303	303,9000 **
6	D1 - 5715	68,8333 **
7	D1 - 2313	22,2667 *
Resíduo		8,4444

ns = não significativo

\* e \*\* = significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 7A. Resumo das análises de variância para altura, produção de matéria seca (MS) total da parte aérea e de raízes do cafeeiro, e índice de doença em relação à incidência da mancha manteigosa. (Ensaio "in vivo")

Fontes de Variação	G.L.	QM				
		Altura	MS total	MS parte aérea	MS raízes	Índice de doença
Filtrados	3	0,6352 **	0,4383 **	0,3785 **	0,0131 ns	4,0060 ns
Modos de inoculação	3	1,3820 **	0,6313 **	0,5159 **	0,0095 ns	46,0606 **
Filtrados x modos	9	0,1857 **	0,7800 **	0,4741 **	0,0492 **	3,1382 ns
Fatorial vs adicionais	2	0,7673 **	2,6279 **	1,4677 **	0,1716 **	227,1862 **
Tratamentos	(17)	0,5446**	0,9109 **	0,5815 **	0,0502 **	37,2245 **
Blocos	3	0,0992 ns	0,1019 ns	0,0981 ns	0,0146 ns	0,8868 ns
Resíduo	51	0,0658	0,0930	0,0747	0,0093	3,3063
Total	71					
C.V. tratamentos (%)		6,49	9,01	10,42	12,69	9,18

ns = não significativo

\*\* = significativo a 1% pelo teste F.