



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

EFEITO DO BIOFERTILIZANTE NO DESENVOLVIMENTO DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À GOMOSE DE
Phytophthora

LUCIANA FALDONI

Araras

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

EFEITO DO BIOFERTILIZANTE NO DESENVOLVIMENTO DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À GOMOSE DE
Phytophthora

LUCIANA FALDONI

ORIENTADORA: Profa. Dra. Kátia Cristina Kupper
CO-ORIENTADORA: Dra. Mariângela Cristofani Yaly

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial para a obtenção do título de
MESTRE EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL

Araras

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F186eb

Faldoni, Luciana.

Efeito do biofertilizante no desenvolvimento de porta-
enxertos de citros e na indução de resistência à gomose de
Phytophthora / Luciana Faldoni. -- São Carlos : UFSCar,
2011.
64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Agricultura orgânica. 2. Expressão gênica. 3. Gomose.
I. Título.

CDD: 630 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

LUCIANA FALDONI

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, *EM 09 DE NOVEMBRO DE 2011.*

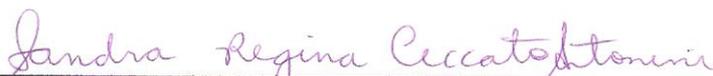
BANCA EXAMINADORA:



PROFA. DRA. KATIA CRISTINA KUPPER

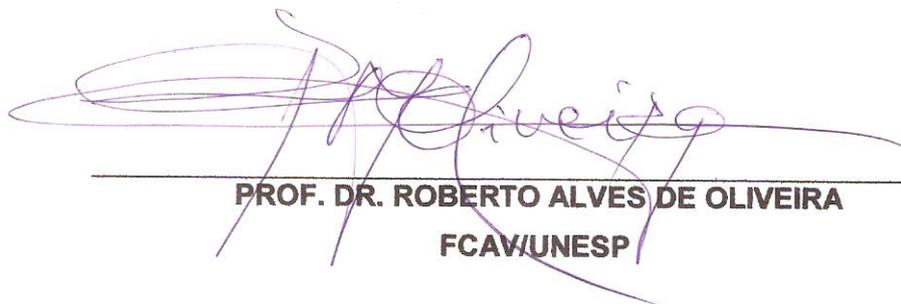
ORIENTADORA

PPGADR



PROFA. DRA. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

PPGADR/UFSCar



PROF. DR. ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA

FCAV/UNESP

*Aos meus pais, José (in memoriam) e Maria,
exemplos de vida, integridade, dignidade e
simplicidade.*

*Meus eternos educadores que com muito amor e
esforço sempre me ajudaram e me apoiaram.*

DEDICO

À

Valéria e Silvana,

Por serem minhas amadas irmãs

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me proporcionado anos maravilhosos de minha vida junto ao meu PAI, e que com certeza nos proporcionará um reencontro futuramente;

A Dra. Mariângela Cristofani Yaly, por ser uma pessoa ímpar em tudo que faz e especialmente, por ser humana e amiga em suas atitudes;

À Dra. Kátia Kupper, pela oportunidade de trabalharmos juntas e pelos ensinamentos;

Aos Doutores Leonardo Boava e Evandro Schinor, pela ajuda, ensinamentos e amizade;

Ao meu companheiro/namorado Julio César, por entender e me apoiar em tempos difíceis.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, pela oportunidade de estagiar no Centro de Citricultura;

Ao CNPq/INCT pela bolsa concedida;

Aos amigos que conheci durante esta jornada, os quais levarei pra sempre em meu coração... Álvaro, Elaine, Joy, Preto, Mirela, Paulinha, Beto, Vi Tet's, Fé, Tati, Carol Bigato, Lilian, Renata, Mariela e a todos que participaram desta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1 Importância da doença.....	04
2.1.1 Sintomas.....	04
2.1.2 Agente causal.....	05
2.1.3 Controle.....	06
2.2 Uso do biofertilizante no controle de doenças de plantas.....	08
2.2.1 Aspectos a serem considerados na produção do biofertilizante.....	13
2.2.2 Potencial de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência.....	14
2.3 Indução de Resistência.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Produção do biofertilizante.....	22
3.2 Determinação da comunidade microbiana do biofertilizante.....	23
3.3 Isolamento e manutenção dos isolados de <i>Phytophthora parasítica</i>	23
3.4 Efeito do biofertilizante no crescimento micelial de <i>Phytophthora</i> <i>parasítica</i>	24
3.5 Efeito do biofertilizante no desenvolvimento das plantas.....	24

3.5.1 Biofertilizante incorporado ao solo.....	25
3.5.2 Efeito do biofertilizante no controle de <i>P. parasítica</i> em diferentes porta- enxertos de citros.....	25
3.6 Análise fenotípica das plântulas.....	25
3.7 Inoculação da <i>P. parasítica</i>	26
3.8 Tratamentos utilizados no estudo.....	27
3.9 Avaliação da expressão diferencial de genes.....	27
3.9.1 Extração de RNA com trizol.....	27
3.9.2 Quantificação do RNA.....	28
3.9.3 Tratamento com DNase I.....	28
3.9.4 Síntese do cDNA.....	29
3.9.5 Desenho dos oligonucleotídeos.....	29
3.9.6 PCR Quantitativo em Tempo Real (RTqPCR).....	29
3.9.7 Análise da lesão de <i>P. parasítica</i>	30
3.9.8 Análise da promoção de crescimento da raiz com biofertilizante.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Determinação da comunidade microbiana do biofertilizante.....	32
4.2 Efeito do biofertilizante sobre o crescimento de <i>P. parasítica</i>	33
4.3 Efeito do biofertilizante no desenvolvimento das plantas cítricas.....	36
4.3.1 Efeito do biofertilizante no controle de <i>P. parasítica</i> em diferentes porta- enxertos de citros.....	42
4.4 Análise da Expressão Gênica.....	45
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sequência dos primers dos genes alvos e normalizadores, utilizados nos ensaios de níveis de expressão por PCR quantitativo em tempo real.....	29
Tabela 2. Efeito da concentração do biofertilizante no tamanho da lesão de <i>Phytophthora parasítica</i> em plantas cítricas.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sintomas da gomose.....	05
Figura 2. Análise fenotípica das plantas após seis meses do plantio.....	26
Figura 3. Método de inoculação do patógeno <i>Phytophthora parasitica</i> em plântulas de citros.....	27
Figura 4. Raspagem do local da lesão e medição da lesão em plantas inoculadas com o patógeno da variedade Laranja Caipira.....	31
Figura 5. População microbiana expressa em unidades formadoras de colônias por mL (u.f.c mL ⁻¹), analisadas a partir do biofertilizante em intervalos de cinco dias.....	33
Figura 6. Efeito da concentração do biofertilizante no crescimento micelial (cm) de <i>Phytophthora</i>	34
Figura 7. Cultivo de <i>P. parasítica</i> em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do biofertilizante.....	35
Figura 8. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante na altura das plantas.....	38
Figura 9. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante no diâmetro das plantas.....	39
Figura 10. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante no número de folhas das plantas.....	40
Figura 11. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante no peso seco das raízes das plantas.....	41
Figura 12. Desenvolvimento das raízes das plantas em diferentes concentrações de Plantmax® + biofertilizante.....	42
Figura 13. Efeito de concentrações do biofertilizante no tamanho da lesão de <i>P. parasítica</i> em plantas cítricas.....	44
Figura 14. Desenvolvimento das lesões de <i>P. parasítica</i> em variedades de citros acondicionadas em substratos Plantmax®+ biofertilizante, na concentração de 20%	45
Figura 15. Níveis de expressão relativa dos genes <i>CHI</i> , <i>LOX</i> , <i>POX</i> , <i>CHS</i> e <i>1,3-glucanase</i> , em relação ao controle, em indivíduos resistentes e suscetíveis.....	48

**EFEITO DO BIOFERTILIZANTE NO DESENVOLVIMENTO DE PORTA-
ENXERTOS DE CITROS E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À GOMOSE DE
*Phytophthora***

Autora: LUCIANA FALDONI

Orientador: Profa. Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER

Co-orientador: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI YALY

RESUMO

Dentre os problemas fitossanitários enfrentados pelo setor citrícola, destaca-se a gomose de *Phytophthora*, que acomete todos os estágios de desenvolvimento da planta. Para o controle da doença são utilizados produtos químicos, porém visando uma agricultura mais sustentável, técnicas alternativas de controle têm sido adotadas, dentre elas o uso de biofertilizante. Portanto, com este trabalho pretendeu-se: (i) produzir um biofertilizante a partir da fermentação anaeróbia de esterco bovino com bagaço de cana-de-açúcar; (ii) determinar a diversidade microbiana presente no composto; (iii) verificar o efeito do composto no crescimento micelial de *Phytophthora parasitica*; (iv) observar seu efeito no desenvolvimento das plantas e, finalmente, (v) avaliar seu efeito na indução de resistência ao patógeno. Verificou-se que, no período entre 25 a 35 dias de produção do biofertilizante encontrou-se a maior população microbiana, composta especialmente por *Bacillus* spp. e outras bactérias. O biofertilizante nas concentrações de 10 e 20% favoreceu o crescimento vegetativo dos porta-enxertos *Poncirus trifoliata*, limão Cravo, tangerina Sunki e laranja Azeda; e na concentração de 20%, em plantas de laranja Caipira, favoreceu o controle da doença. Os genes que codificam β ,1-3-glucanase (*PR-2*), chalcona sintase (*CHS*) e lipoxigenase (*LOX*) foram ativados nas plantas tratadas com o biofertilizante e inoculadas em porta-enxerto suscetível, o biofertilizante foi capaz de ativar os genes que codificam quitinase (*CHI*) e chalcona sintase (*CHS*), possivelmente envolvidos com a resistência de plantas cítricas a *P. parasitica*.

Termos para indexação: expressão gênica, gomose, agricultura orgânica

EFFECT OF THE DEVELOPMENT OF THE BIOFERTILIZER ROOTSOCKS CITRUS AND INDUCTION OF RESISTANCE BUDS OF *Phytophthora*.

Author: LUCIANA FALDONI

Adviser: Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER

Co-Adviser: Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI YALY

ABSTRACT

Among the problems faced by the plant citrus sector, stands out of *Phytophthora* gummosis, which affects all stages of plant development. For disease control chemicals are used, but seeking a more sustainable agriculture, alternative control techniques have been adopted, including the use of biofertilizers. Therefore, this work aimed to: (i) to produce a biofertilizer from the anaerobic digestion of cattle manure with crushed sugar cane, (ii) determine the microbial diversity present in compost, (iii) verify the effect of compound on mycelial growth of *Phytophthora parasitica*, (iv) to observe its effect on plant growth, and finally (v) evaluate its effect on induction of resistance to the pathogen. It was found that in the period between 25 to 35 days of production of biofertilizer met the highest microbial population, specially composed by *Bacillus* spp. and other bacteria. The biofertilizer at concentrations of 10 and 20% favored the vegetative growth of rootstock *Poncirus trifoliata*, Rangpur, sunki and sour oranges, and the concentration of 20% in orange plants Caipira favored disease control. The genes encoding β 0.1-3-glucanase (PR-2), chalcone synthase (CHS) and lipoxygenase (LOX) were activated in plants treated with biofertilizer and inoculated into susceptible rootstock, the biofertilizer was able to activate genes encoding chitinase (CHI) and chalcone synthase (CHS), possibly involved with the resistance of citrus plants to *P. Parasitica*.

Index terms: gene expression, gummosis, organic agriculture

1. INTRODUÇÃO

O Brasil produz aproximadamente 30% de toda laranja cultivada no mundo e 59% do suco de laranja concentrado congelado (FAO, 2010). Entretanto, o Estado de São Paulo, que é responsável por mais de 80% da produção brasileira, vem perdendo mais de 20% da área dos laranjais em decorrência do aumento do custo de produção, ocasionado, principalmente, pela elevação do custo dos fertilizantes e pelos gastos com controle de doenças; aliado a isso, encontra-se a maior exigência do consumidor por frutas de qualidade, diminuindo, dessa maneira, o lucro dos citricultores (FNP, 2009).

Dentre os problemas fitossanitários enfrentados pelo setor citrícola, destaca-se a gomose de *Phytophthora*, causada principalmente por *P. nicotianae* (Breda de Haan) (Tucker) var. *parasitica* (Dastur) Waterh. (sinonímia de *P. parasitica*) (WHITESIDE et al., 1996). A estratégia mais eficiente e indicada para o controle da doença em citros é a utilização da resistência genética, através do uso de porta-enxertos, resistentes ou tolerantes a *P. parasitica*, como *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux e laranja Azeda (*Citrus aurantium*). No entanto, atualmente, a maioria das variedades de porta-enxertos utilizada é suscetível, tais como: tangerina Sunki, limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) e laranja Caipira [*C. sinensis* (L.) Osbeck]. Outras medidas de controle da doença baseiam-se na prevenção, como o plantio de mudas saudáveis, em áreas desfavoráveis à ocorrência da doença, associadas ao emprego de fungicidas, onde os mais comumente empregados são os fungicidas oxiclóreto de cobre e fosetyl-AI (FEICHTENBERGER et al., 1992).

Segundo Gliessman (2001), nas unidades agrícolas, a utilização de insumos sintético-industriais, derivados de combustíveis fósseis, promove perdas da matéria orgânica, lixiviação de nutrientes, degradação e aumento da

erosão do solo. As pragas e patógenos podem desenvolver resistência aos principais agrotóxicos utilizados, havendo necessidade de utilização de novos produtos, que muitas vezes por serem mais agressivos provocam conseqüências desastrosas para o meio ambiente, além de ocasionarem maiores problemas de saúde para produtores, aplicadores e consumidores.

Diante desse cenário, diversos são os fatores que estão encorajando os produtores a substituir o cultivo convencional por práticas sustentáveis. Em contraste com a agricultura convencional, encontram-se os sistemas alternativos de controle de doenças com os quais se busca obter vantagens das interações de ocorrência natural, como é o caso da utilização de extratos aquosos de matéria orgânica e biofertilizantes. As vantagens da utilização do biofertilizante são o baixo custo e a facilidade na disponibilidade do produto, uma vez que o agricultor não depende da compra de insumos, podendo o mesmo ser produzido na própria fazenda a partir de diversas fontes de matéria orgânica, aproveitando o material disponível e levando inclusive, à diminuição do aporte de energia externa (MEDEIROS ; LOPES, 2006).

Os biofertilizantes possuem uma complexa e elevada comunidade microbiana, com presença de bactérias, fungos leveduriformes e actinobactérias (CASTRO et al., 1992). De acordo com Kupper et al. (2006), quando o biofertilizante é aplicado existe a possibilidade dos microrganismos presentes no mesmo ativarem os mecanismos de resistência da planta. Resultados de indução de resistência com a aplicação de extratos aquosos de matéria orgânica foram obtidos em diversos estudos. McQuilken et al. (1994), estudando a ação do biofertilizante de esterco de gado com palha na atividade de *Botrytis cinerea* em alface, observaram redução da severidade desta doença, sugerindo estarem envolvidos nos mecanismos de ação à antibiose e indução de resistência. O uso de indutores de resistência no controle de doenças de plantas tem apresentado sucesso em espécies arbóreas como *Eucalyptus marginata*, e é indicado no controle de oomicetos como *Phytium* spp. e *Phytophthora* spp. e de fungos causadores de podridão de colo, raiz, tronco e frutos (McDONALD et al., 2001).

A indução de defesa do hospedeiro pode ocorrer também pela presença de macro e micronutrientes presentes no biofertilizante. De acordo com Bettli et al. (1998), os nutrientes minerais exercem valiosas funções no metabolismo

vegetal, influenciando não somente o crescimento vegetal e a produção da planta como, também, o aumento ou a redução da resistência da mesma a determinados patógenos.

Diante do exposto, este trabalho pretendeu (i) produzir um biofertilizante a partir da fermentação anaeróbia de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar; (ii) determinar a comunidade microbiana presente neste composto; (iii) verificar o efeito do produto no crescimento micelial de *Phytophthora parasitica*; (iv) observar seu efeito no desenvolvimento das plantas de citros (altura, diâmetro das plantas e número de folhas) e, finalmente (v) avaliar seu efeito na indução de resistência a *Phytophthora parasitica*, por meio da análise da expressão gênica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Importância da gomose

Os danos provocados por *Phytophthora* spp. em citros são estimados em 10 a 30% da produção mundial, causando prejuízos de milhões de dólares, uma vez que afeta todas as fases de desenvolvimento dos citros, e conseqüentemente a sua produção (TIMMER et al., 2000).

A gomose de *Phytophthora* ocorre em todas as regiões produtoras de citros do globo. De todas as espécies de *Phytophthora* relatadas em citros, apenas três, *P. parasitica*, *P. palmivora* e *P. citrophthora* estão identificadas como causadoras da maioria de doenças do complexo *Citrus-Phytophthora* (ERWIN & RIBEIRO, 1996). Das várias manifestações da doença já descritas, a gomose de *Phytophthora* (podridão do pé, podridão de radículas/raízes, mal do pé e gomose) é uma das mais comuns. No Estado de São Paulo, *P. parasitica* é também a espécie preponderantemente associada às perdas mais significativas provocadas por esses patógenos, tanto em viveiros como em pomares comerciais (FEICHTENBERGER, 2001).

2.1.1. Sintomas

O sintoma característico da doença, mas não exclusivo, é a exsudação de goma em lesões de tronco e colo em porta-enxertos suscetíveis. A exsudação também pode ocorrer na região do tronco acima do ponto de enxertia, quando a copa é de variedade suscetível. As lesões de tronco que produzem goma são mais freqüentes em plantas muito enterradas, ou quando o tronco é ferido durante a realização de tratamentos culturais (Figura 1).

Figura 1. (A) Sintoma de Gomose – exsudação de goma na base do tronco (B). Morte da planta em que a lesão atingiu toda a circunferência do tronco (Fundecitros, 2009)



Em troncos e ramos, os tecidos infectados da casca permanecem firmes até secarem completamente, quando começam a apresentar rachaduras e fendas longitudinais. Quando as lesões se desenvolvem muito, circundando grande parte do caule ou das raízes, a planta entra em rápido declínio, devido à destruição do floema, restringindo o fluxo de seiva elaborada da copa para o sistema radicular e provocando a morte da planta (ALENCAR, 1941; ROSSETI, 1947; TIMMER & MENGE, 1988; FEICHTENBERGER, 2001).

2.1.2. Agente Causal

Segundo Luz (2006), fungos do gênero *Phytophthora*, que anteriormente pertenciam ao reino Chromista, foram renomeados como pertencentes ao reino Straminipila. A característica distintiva de *Phytophthora* para ser enquadrada neste reino é o fato de apresentar parede celular constituída de celulose.

Fungos do gênero *Phytophthora* apresentam diversas estruturas vegetativas e reprodutivas, entre as quais se incluem: micélio, esporângios, zoósporos, clamidósporos e oósporos. Esporângios são esporos assexuais de forma geralmente globosa, que se formam nas hifas diferenciadas, denominadas esporangiósforos. Os esporângios podem germinar formando tubos germinativos ou zoósporos. Zoósporos são esporos assexuais biflagelados, não apresentam parede celular e seu ciclo de vida é curto, sendo consideradas as principais estruturas infectivas do fungo (HICKMAN, 1970; MATHERON, MATEJKA, 1988). Clamidósporos são esporos assexuais

constituídos por uma parede celular espessa, que lhe confere a capacidade de sobrevivência e resistência.

Oósporos são esporos sexuais formados no interior de oogônios (gametângios femininos). Possuem também parede celular espessa que lhes conferem resistência às condições adversas. Não está totalmente esclarecido seu papel no ciclo de vida do fungo, entretanto, podem contribuir para a variação genética, embora a detecção de variações através de recombinação seja de ocorrência rara na natureza (ZENTMEYER, ERWIN, 1970; BRASIER, 1992; FELD, MENGE, ÉRSEK, ENGLISH, SHOELTZ, 1995).

Normalmente a infecção nas plantas ocorre através dos zoósporos, que são liberados quando há presença de água abundante. Os zoósporos “nadam” para a zona de alongação das raízes ou são atraídos por substâncias exsudadas de ferimentos nas mesmas (TIMMER; MENGE, 1988). Na superfície das raízes ou de outros órgãos, germinam e produzem hifas que infectam os tecidos suscetíveis. Estes esporos também podem encistar, e desta forma, permanecer viáveis no solo por longos períodos.

Os fungos do gênero *Phytophthora* podem infectar vários órgãos da planta em diferentes estágios de desenvolvimento. Nas sementeiras, podem infectar as sementes antes da sua completa germinação, provocando podridão seguida da morte das mesmas. Em plântulas recém-geminadas podem ocorrer lesões na base do caulículo devido ao ataque do fungo, resultando no tombamento, mela ou “damping off”. Em viveiros, os fungos podem infectar folhas, brotos novos, hastes e raízes das mudas. Nos pomares podem ocorrer infecções de tronco e raízes principais, causando a “gomose ou podridão do pé”, em raízes secundárias e radículas. Frutos também podem ser infectados causando a doença conhecida como “podridão parda dos frutos” (FELD et al. 1981; TIMMER e MENGE, 1988; FEICHTENBERGER, 1990; ROSSETTI, 1991; GRAHAM et al., 1998).

Das várias manifestações da doença, a podridão do pé ou gomose em pomares e a podridão de raízes em viveiros são as mais comuns e as que causam maiores danos e são portanto, as que mais preocupam os citricultores e viveiristas.

2.1.3. Controle

A estratégia de controle mais eficiente e indicada para *Phytophthora* spp. em citros é a utilização da resistência genética, através da utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes a *P. parasítica*. No entanto, a maioria das variedades de porta-enxertos utilizadas atualmente é suscetível. Como o melhoramento clássico apresenta limitações, tanto de ordem biológica quanto genética, estratégias mais efetivas e duradouras que levem ao controle da doença por meio de plantas resistentes, poderão surgir a partir do entendimento das relações planta patógeno.

O uso de biofertilizantes tem sido recomendado em agricultura orgânica como forma de manter o equilíbrio nutricional de plantas e torná-las menos predispostas à ocorrência de pragas e patógenos (PINHEIRO ; BARRETO, 1996; PENTEADO, 2000; BETTIOL, 2001; SANTOS, 2001). As principais causas de inibição do desenvolvimento de patógenos pelos biofertilizantes seria o efeito fungistático e bacteriostático, principalmente pela presença da bactéria *Bacillus subtilis* (originária do rúmeme de bovinos), que sintetiza substâncias antibióticas, aliado a diversos nutrientes, vitaminas e aminoácidos (PINHEIRO , BARRETO, 1996; BETTIOL, 2001; SANTOS 2001), e das espécies de *Trichoderma*, que possuem capacidade para hiperparasitarem fungos patogênicos, podendo ser classificadas como antagonistas altamente eficientes (ELAD et al. 1980) dos fungos *Phytophthora*.

MAY (1994) obteve a eliminação de *P. parasítica* do substrato pré-inoculado mediante a infestação com isolados de *Trichoderma* selecionados *in vitro*. MALAJCZUCK (1983) sugeriu que os principais mecanismos envolvidos no controle de *Phytophthora* são competição por nutrientes e antibiose, embora alguns autores tenham apresentado que a ação de algumas espécies de *Trichoderma* como antagonistas esteja envolvida na estimulação da formação de oósporos e lise de hifas (MALAJCZUK, 1979), quando na interação patógeno antagonista.

Medidas preventivas como plantar em solos bem drenados, evitar plantio no fundo, evitar acúmulo de água no solo, evitar excesso de adubação nitrogenada de matéria orgânica no solo e promover boa aeração do solo são de fundamental importância para o controle da gomose de *Phytophthora* (WHITESIDE et al., 1996).

No entanto, o método de controle mais usual é o uso de produtos fungicidas sistêmicos como Oxiclóreto de Cobre (Recop) e Fosetyl-Al.

2.2. Uso do biofertilizante no controle de doenças de plantas

De acordo com o decreto nº 4.954 de 14 de Janeiro de 2004 (MAPA, 2004), biofertilizante “é um produto e contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante”.

Segundo Vessey (2003), do ponto de vista microbiológico, o biofertilizante “é uma mistura que contém microrganismos vivos, os quais, quando dispensados na planta por diferentes métodos, colonizam a rizosfera e, ou, o interior da planta e promovem crescimento, por aumentar a disponibilidade de nutrientes primários”, uma das formas de produção é obtida pela digestão aeróbia ou anaeróbia do material orgânico em meio líquido em um equipamento denominado biodigestor (BETTIOL et al., 1998). O produto final dessa fermentação pode ser usado tanto como fertilizante quanto no controle de fitopatógenos.

A vantagem de sua utilização está principalmente no custo e na disponibilidade do produto. O custo é basicamente relacionado à mão de obra para preparo do material pelo próprio agricultor (SANTOS ; BETTIOL, 2003). Assim o agricultor não depende da compra de insumos, pois pode ser produzido a partir de diversas fontes de matéria orgânica, possibilitando o aproveitamento do material disponível na propriedade, diminuindo o aporte de energia externa. A aplicação do biofertilizante poupa energia, aumenta a eficiência dos micronutrientes aplicados evitando o perigo de intoxicação e barateando o custo e, principalmente, acelera a recuperação do solo (PINHEIRO ; BARRETO, 2005).

Os biofertilizantes contêm células vivas ou latentes de microrganismos (bactérias, leveduras, algas, protozoários e fungos filamentosos), metabólitos e quelatos organominerais (MEDEIROS; D’ANDREA, 2004). Podem ser introduzidos nos agroecossistemas por meio de pulverizações foliares, fertirrigação ou aplicados diretamente no solo.

Quando o biofertilizante é produzido utilizando-se esterco de bovino, acredita-se que a maioria dos microrganismos presentes seja proveniente do trato digestivo dos animais (MEDEIROS, 2002). De acordo com Pinheiro & Barreto (2005), quando o esterco ou biomassa é colocado para fermentar, as bactérias, leveduras e outros fungos transformam esta massa em constituintes de seu protoplasma ou metabolismo. Esses microrganismos são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, produção de gases e liberação de metabolitos, entre eles antibióticos e hormônios de crescimento (BETTIOL, 2003). A maior parte dos biofertilizantes produzidos tem como base o esterco de animais ruminantes, de preferência gado bovino de leite, por possuir um hábito alimentar mais balanceado e por suas fezes conterem grande diversidade de microrganismos, que vão acelerar e facilitar o processo de fermentação (SANTOS & AKIBA, 1996). Entretanto, diversos biofertilizantes são produzidos com esterco compostado, considerando principalmente os problemas de patógenos animais presentes nas fezes. Também outras matérias orgânicas são utilizadas na produção de biofertilizantes, tais como farelo de soja, algodão, milho e outros.

O biofertilizante tem na sua composição quase todos os nutrientes necessários para a nutrição vegetal, variando as concentrações (SANTOS, 1992). Segundo Pinheiro e Barreto (2005), entre os componentes comuns nos biofertilizantes como aminoácidos e ácidos orgânicos, encontra-se tiamina, piridoxina, riboflavina, cobalamina, ácido ascórbico e ácido fólico, entre outros. Quanto mais diversificada a matéria prima do biofertilizante, maior a possibilidade de liberação de diferentes substâncias orgânicas. O efeito de fontes de matéria orgânica na severidade de doenças de plantas depende do tipo de material utilizado, da relação C : N e do tempo decorrido da sua incorporação (BETTIOL ; GHINI, 2003).

No biofertilizante, o esterco ao entrar em processo fermentativo continua o catabolismo iniciado no estômago do animal, mas lentamente inicia-se o anabolismo, sintetizando novos elementos (PINHEIRO ; BARRETO, 2005). Depois da digestão os resíduos oriundos das diferentes etapas da fermentação apresentam alta qualidade para uso como fertilizante agrícola, devido à diminuição do teor de C do material, pois a matéria orgânica ao ser digerida perde exclusivamente carbono na forma de CH₄ e CO₂. Ocorre aumento do

teor de N e demais nutrientes e reduzindo a relação C:N; o que melhora as condições do material para fins agrícolas. A maior facilidade de imobilização do biofertilizante pelos microrganismos do solo aumenta a eficiência do mesmo pela solubilidade parcial de alguns nutrientes (SEIXAS et al., 1980).

Ao pulverizar estes fermentados diluídos na folha, há uma absorção direta havendo menor gasto energético e sem incompatibilidades, pois, com o metabolismo das bactérias, leveduras e fungos ocorre uma transformação dos materiais orgânicos, com maior equilíbrio dos micronutrientes e outros elementos, de forma próxima ao que ocorre no solo quando a matéria orgânica é decomposta pela microbiota (PINHEIRO ; BARRETO, 2005). Além disso, a comunidade microbiana presente no biofertilizante é diversificada e colabora com a introdução de organismos benéficos para as plantas e para o agroecossistema.

Os biofertilizantes atuam também como defensivo natural por meio de bactérias benéficas, principalmente *Bacillus subtilis* (TRACH ; BETTIOL, 1997), de grande importância no início da fermentação. A fermentação com *Bacillus subtilis* é usada milenarmente na Índia, mas foi no final da década de 50 que alguns pesquisadores estudando biofertilizantes oriundos de biodigestores, extraíram através do N-Butanol, um complexo orgânico de forte poder bacteriostático e fungistático contra uma série de patógenos agrícolas (PINHEIRO ; BARRETO, 2005). De acordo com os mesmos autores, *Bacillus subtilis* produz ainda alfa-amilase, importante para a absorção de cálcio e magnésio.

Segundo Medeiros (2002), os biofertilizantes também apresentam ação direta sobre ácaros e insetos pragas. Santos (1992) relatou efeitos inseticida, acaricida, repelente e detergente do biofertilizante, produzido com esterco bovino fresco, especialmente contra pulgões e moscas da fruta. Medeiros (2002), estudando o efeito do biofertilizante sobre o ácaro *Brevipalpus phoenicis*, verificou que a sua ação sobre o número de ovos foi diretamente proporcional à concentração utilizada, evidenciando a possibilidade do biofertilizante possuir substâncias hormonais ou inibidores enzimáticos que afetam a reprodução e o metabolismo do ácaro. Uma substância diferente na dieta do ácaro pode ter afetado seu metabolismo que repercutiu sobre a sua fertilidade e também sobre a viabilidade dos ovos. O mesmo autor verificou

ainda que a aplicação do biofertilizante em associação com o fungo *Beauveria bassiana* reduziu em 42% a sobrevivência do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), importante praga de hábito polífago de ocorrência em hortaliças e olerícolas.

Diversos trabalhos mostram os efeitos dos nutrientes sobre as doenças de plantas e, conseqüentemente, a redução de necessidade de controle com uma equilibrada nutrição de plantas (BETTIOL & GHINI, 2003). Segundo Bettiol et al. (1998), os biofertilizantes apresentam potencial para o controle de doenças de plantas e podem agir por meio de antibiose (pela presença de antibióticos em sua composição); competição (presença da comunidade microbiana); indução de resistência (tanto microbiana como pelos compostos químicos presentes) e ação direta ou indireta no fornecimento de nutrientes às plantas.

Os decompositores primários (principalmente bactérias e fungos) podem atuar como antagonistas de fitopatógenos por competição por nutrientes, antibiose e parasitismo, enquanto que a micro e mesofauna podem contribuir para o controle por predação (VAN BRUGGEN, 1995). Essa autora conclui que o desenvolvimento da proteção de plantas em sistemas alternativos de cultivo com maior grau de sustentabilidade, requer estudos sobre a estrutura e o funcionamento dos agroecossistemas, com atenção especial às condições nutricionais e à biota do solo, à diversidade funcional, à elevação dos teores de matéria orgânica do solo e outros fatores que permitam um adequado manejo dos sistemas produtivos.

Como o uso dos biofertilizantes é uma técnica que vem sendo expandida, há necessidade de realização de estudos para a determinação dos seus impactos no ambiente. Para minimizar os possíveis problemas sugere-se o uso da matéria orgânica livre de metais pesados e de agentes nocivos (BETTIOL, 2003). Segundo Kupper et al. (2006), estudos são necessários para determinar a concentração ideal e intervalo de aplicação dos biofertilizantes, assim como o seu modo de ação. Trach e Bettiol (1997) verificaram que em concentrações acima de 15% o biofertilizante inibiu completamente o crescimento *in vitro* da maioria dos fungos testados (*Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Septoria lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium*).

Também observaram efeito de biofertilizante sobre o crescimento micelial e germinação de esporos em concentrações acima de 10%, os conídios de *A. solani* foram inibidos quase que completamente. Os mesmos autores verificaram que os responsáveis tanto pela inibição do crescimento micelial como pela germinação de conídios foram os metabólitos dos biofertilizantes. Bettiol (1996) verificou que em concentrações acima de 10%, com pulverizações a cada dois dias, houve controle de oídio em abóboras e quanto menor o período entre as aplicações, mais efetivo o controle. McQuilken et al. (1994) verificaram inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Botrytis cinerea* usando extrato de esterco de cavalo e aves, controlando a doença em feijão, alface, tomate e pimentão.

De acordo com Kupper et al. (2009), dois biofertilizantes, denominados Bio1 e Bio2, produzidos aeróbica e anaerobiamente, respectivamente, quando aplicados em concentrações acima de 10% ou em associação com isolados de *Trichoderma* spp., promoveram maiores inibições nas germinações de conídios de *Colletotrichum acutatum*. Os autores verificaram ainda, que quando os mesmos foram pulverizados em plantas de citros, apresentaram potencialidade de controle da queda prematura dos frutos cítricos.

Um dos possíveis mecanismos envolvidos no controle de fitopatógenos é a resistência induzida pelos microrganismos presentes no biofertilizante. Segundo Kupper et al. (2006), existe a possibilidade destes microrganismos ativarem os mecanismos de resistência de plantas cítricas a diversos fitopatógenos. A indução de defesa do hospedeiro pode ocorrer também pela presença de macro e micronutrientes e compostos orgânicos. Para Bettiol (1998), os nutrientes minerais exercem valiosas funções no metabolismo vegetal, influenciando não somente o crescimento vegetal e a produção da planta como o aumento ou a redução na resistência a determinados patógenos.

Outra possibilidade é o enriquecimento do biofertilizante com microrganismos de conhecido efeito antagônico sobre fitopatógenos, como relatado por Hayashida et al. (1989) que, usando um biofertilizante produzido a partir de esterco de suínos inoculado com *Streptomyces albidoflavus*, obtiveram uma redução de 93% na área lesionada por *Streptomyces scabies* em batata. Também Medeiros (2002) sugere a associação de biofertilizantes

com fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, principalmente em cultivos de casas de vegetação.

A comunidade de microrganismos presentes no biofertilizante é rica, possibilitando a ação simultânea de diversos organismos sobre os fitopatógenos. Kupper et al (2006 e 2009) verificaram que o uso de biofertilizante foi efetivo no controle de *Phyllosticta citricarpa* e *Colletotrichum acutatum*, agentes causais da mancha preta dos citros e da queda prematura dos frutos cítricos, respectivamente. Tais produtos estão sendo utilizados na produção de diversas culturas no sistema orgânico ou em sistemas que buscam explorar as interações biológicas (BETTIOL ; GHINI, 2003).

2.2.1. Aspectos a serem considerados na produção do biofertilizante

Segundo Meirelles et al. (1997), um dos fatores importantes para a fermentação é a temperatura e para o biofertilizante feito com esterco bovino, a melhor temperatura é 38°C, que é a temperatura da pança (rúmen) dos animais que pastam, seja coelho, camelo, vaca ou veado.

A decomposição bacteriana da matéria orgânica sob condições anaeróbias é feita em três fases: 1) fase de hidrólise; 2) fase ácida e 3) fase metanogênica. Na fase de hidrólise, as bactérias liberam no biofertilizante as chamadas enzimas extracelulares, as quais irão promover a hidrólise das partículas e transformar as moléculas maiores em moléculas menores e solúveis. Na fase ácida as bactérias produtoras de ácidos transformam moléculas de carboidratos em ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido butílico), etanol, amônia, hidrogênio, dióxido de carbono e outros. E finalmente, na 3ª fase, as arqueobactérias metanogênicas atuam sobre o acetato, o hidrogênio e o dióxido de carbono transformando-os em gás metano (CH₄). Esta fase limita a velocidade da cadeia de reações, devido principalmente à formação de microbolhas de metano e dióxido de carbono em torno da bactéria metanogênica, isolando-a do contato direto com a mistura em digestão, razão pela qual a agitação no digestor é prática sempre recomendável, através de movimentos giratórios do recipiente ou do gasômetro (SEIXAS, et al. 1980).

Os preparados são resultantes da fermentação aeróbia e anaeróbia de resíduos orgânicos que contém células vivas ou latentes de cepas microbianas (bactérias, leveduras e fungos filamentosos). Estes agentes, em geral, atuam eficientemente na conversão de diversos nutrientes e substâncias ativas, incrementando e acelerando os processos microbianos no solo e de suas interações bioquímicas com a planta (BETTIOL et al., 1998).

A conversão de matéria orgânica bruta ao estado de composto orgânico é um processo microbiológico, no qual uma variada população de microrganismos desencadeia uma série de reações bioquímicas oxidativas. Os principais grupos de microrganismos que realizam a decomposição da matéria orgânica são bactérias e fungos (GOMES & PACHECO, 1988). A biodegradação é um processo complexo e multifacetado, envolvendo uma grande variedade de microrganismos do solo. A degradação de diferentes resíduos depende das condições locais e regionais, como clima, tipo de solo, vegetação, fauna e microrganismos decompositores. A diversidade bioquímica de substratos macromoleculares indica que os organismos devem possuir amplo espectro de enzimas extracelulares para convertê-los em metabólitos assimiláveis (TAUK, 1990).

Quando restos de animais e vegetais são incorporados ao solo ou sofrem o processo de compostagem, numerosos microrganismos passam a atacar esses materiais. Se as condições de umidade e aeração forem favoráveis e houver a presença de microrganismos, haverá inicialmente uma rápida decomposição que decrescerá com o tempo. Participa desse ataque alguns microrganismos como bactérias e fungos e, como resultado dessa intensa digestão da matéria orgânica por tais organismos, haverá a liberação de elementos químicos, os quais deixam a forma orgânica, dita imobilizada, para passarem à forma de nutrientes minerais, chamada fase mineralizada, onde os nutrientes estarão prontamente disponíveis às plantas (KIEHL, 1985).

2.2.2. Potencial de ação eliciadora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência

Os biofertilizantes líquidos, além de fertiprotetores, podem atuar como potentes elicitores de resistência sistêmica induzida (RSI). Essa hipótese deve-se à diversidade biótica e abiótica obtida na composição final desses

fermentados, sejam eles de origem aeróbia ou anaeróbia, quando produzidos sob condições de campo. O entendimento das propriedades antimicrobianas e/ou elicitoras dos compostos secundários presentes nos biofertilizantes podem contribuir para a adoção de novas práticas de controle de pragas e doenças de plantas (MEDEIROS et al., 2004).

No processo da produção do biofertilizante não há uma fórmula padrão, segundo Medeiros et al. 2004, no processo de decomposição da matéria orgânica, quatro fases são distintas: a fase de *latência*, na qual ocorre a adaptação dos microorganismos; a fase de *crescimento exponencial*, caracterizada pela intensificação da divisão celular, com a produção de biomassa e liberação dos metabólitos primários; a fase *estacionária*, caracterizada quando as células param de se dividir e ao formarem colônias iniciam a produção metabólitos secundários (substâncias de defesa) tais como antibióticos, fenóis, ácidos orgânicos, auxinas e micotoxinas e, por último, a fase de *morte celular* ou de *degradação biológica*, caracterizada pelo esgotamento das reservas de energia das células, quando estas morrem.

O agricultor ao iniciar a produção do biofertilizante, deve ter em mente a dimensão da produção. Podem-se utilizar tanques de até 1.000 litros, caixas de fibrocimento ou plásticas. Para volumes superiores utilizam-se tanques de até um metro de profundidade revestidos com lona plástica construídos diretamente sobre o solo. Sua localização deve ser preferencialmente em local ensolarado, para facilitar a fermentação (MEDEIROS, 2004).

Diversos são os materiais utilizados na produção do biofertilizante, como por exemplo: esterco fresco de gado, de caprinos e ovinos (inoculante microbiano), composto orgânico enriquecido com minerais, carboidratos, proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos. No mercado existem produtos comerciais desenvolvidos especificamente como insumos enriquecidos para a produção de biofertilizantes (exemplos: Microrganismos Eficientes - EM e o Microgeo).

2.3. Indução de Resistência

A resistência induzida em plantas, também conhecida como indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida, envolve a

ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (BONALDO, 2005). O termo indução de resistência pode ser utilizado para designar uma proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos onde se efetuou o tratamento com o agente indutor, como também, pode indicar uma resistência sistêmica, que se manifesta à distância do local de aplicação do indutor (MORAES, 1992).

A resistência induzida consiste no aumento da resistência por meio da utilização de agentes externos, sem qualquer alteração no genoma da planta, isso ocorrendo de maneira não específica por meio da ativação de genes envolvidos em diversas respostas de defesa, tais como, explosões oxidativas, respostas de hipersensibilidade, acúmulo de proteínas-RP, síntese de inibidores de proteinases, enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase, enzimas envolvidas na peroxidação de lipídios, síntese de fitoalexinas, acúmulo de compostos fenólicos, aumentos na atividade de β -1,3-glucana sintase e conseqüente aumento na formação de calose, formação de papila, bem como o acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do microrganismo (KUHN, 2007).

A indução da resistência pode ser desencadeada pela aplicação de substâncias naturais e/ou sintéticas, por microrganismos inativados e/ou por suas partes (CAVALCANTI, 2000). Os indutores naturais normalmente são constituídos por moléculas de oligossacarídeos constituintes da parede celular de patógenos como glucanas, derivados de quitina, glicoproteínas e, ainda, polissacarídeos da parede celular vegetal (HANN, 1996). Foi verificado que as elicinas, uma família de pequenas proteínas altamente conservadas, secretadas por espécies de fungos fitopatogênicos do gênero *Phytophthora* ou *Pytium*, são capazes de ativar respostas de defesa em plantas e a resistência sistêmica adquirida (RSA).

Plantas de fumo previamente tratadas com elicinas, especialmente a criptogéina, purificada de cultura de *Phytophthora cryptogea*, adquiriram resistência a uma infecção subsequente com o patógeno *Phytophthora parasitica var nicotianae* e a outros agentes patogênicos (ETIENNE et al., 2000 e RICCI et al., 1989, citados por GUZZO, 2004). Dentre as substâncias sintéticas, destaca-se o ácido salicílico e seus análogos funcionais, como o

Acibenzolar-S-methyl (ASM) e o ácido 2,6- dicloroisonicotínico (INA), entre os mais estudados. Outras moléculas têm se destacado, também, por sua capacidade de induzir resistência, a exemplo do etefon, uma substância que libera etileno, como o ácido jasmônico e ácido β -aminobutírico, silício, fosfatos e diversos sais inorgânicos (SOBRINHO, 2004).

O efeito protetor pode durar poucos dias ou por todo o ciclo da cultura, como é o caso de plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium*, onde a proteção mostrou-se efetiva por 10 semanas (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Outro aspecto interessante da indução de resistência diz respeito a ausência de especificidade, o que é refletido não somente pelos diferentes indutores passíveis de uso, mas também pelo amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta é protegida (STICHER et al., 1997). Por exemplo, plantas de pepino submetidas a tratamentos foliares com *C. lagenarium* ou vírus da necrose do fumo (TNV) como indutores, mostraram-se sistemicamente protegidas contra dez patógenos diferentes, sendo cinco fungos, três bactérias e dois vírus (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997).

Os agentes indutores de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar ou induzir resposta de resistência nas plantas são chamados de elicitores (SMITH, 1996), podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1999). Após o reconhecimento, uma cascata de sinais é acionada, o que leva a ativação dos mecanismos de defesa das plantas.

Um dos primeiros eventos na interação planta-patógeno é a explosão oxidativa, que se constitui na produção de espécies reativas de oxigênio, que pode resultar em reação de hipersensibilidade. Outra molécula sinalizadora é o óxido nítrico que atua na sinalização da via do ácido salicílico e na ativação de genes, como o da fenilalanina amônia-liase que estimula a via dos fenilpropanóides, o que resulta na produção de vários compostos de defesa de plantas, como as fitoalexinas (BELTRAME, 2005).

Após a emissão do sinal primário, duas rotas metabólicas estão envolvidas na síntese de compostos de defesa: uma dependente de Ácido salicílico (AS) e outra independente de AS. No primeiro caso, o composto

sinalizador é o próprio AS e na outra rota os sinalizadores são o etileno e/ou o ácido jasmônico (KUNKEL & BROOKS, 2002). No geral, as plantas respondem mais aos patógenos biotróficos, com a ativação da rota do AS, porém ativam a rota do etileno-jasmonato quando atacadas por patógenos necrotróficos ou herbívoros (TON et al., 2002).

O AS é provavelmente sintetizado na via dos fenilpropanóides, tendo o ácido benzóico como precursor. Na síntese através desta via, é importante a participação da Fenilalanina Amônia Liase (FAL). Logo após a síntese, o AS é convertido na forma conjugada com carboidratos, sendo que a conjugação pode ser um importante mecanismo pelo qual a concentração de AS é regulada na planta. O AS, quando aplicado de forma exógena, é capaz de induzir aumento da síntese do próprio AS, e de proteínas-RP e de assim proteger as plantas contra ataque de patógenos (MORAES, 1998).

O AS pode gerar em várias plantas a produção de um composto volátil, o metil-salicilato (MeSA). O MeSA, por sua vez, pode induzir plantas a sintetizar o AS. Plantas de fumo infectadas por TMV são capazes de produzir o MeSA, que age como um indutor de resistência volátil. A produção de AS a partir do MeSA pela planta afetada induz a produção de proteínas-RP e a ativação de genes de resistência, podendo tornar plantas resistentes ao ataque de patógenos (SHULAEV et al., 1997).

O Ácido Jasmônico (JA) e seus derivados encontram-se largamente distribuídos nos tecidos vegetais. Segundo Sticher et al. (1997), os jasmonatos (JA) são produzidos em plantas após injúrias ou tratamentos com elicitores, apresentando funções hormonais e de defesa contra fitopatógenos e insetos. A ação de defesa está ligada à capacidade de induzir a síntese ou acúmulo de proteínas inativadoras de ribossomos, FAL, tionina, sintase da chalcona, proteínas ricas em hidroxiprolina, inibidores de proteinases e outras enzimas como polifenoloxidasas e lipoxigenases (BOSTOCK, 1999). A via de sinalização na qual os JA estão envolvidos tem diferenças marcantes em relação à via de sinalização que envolve o AS.

Atualmente, costuma-se diferenciar o tipo de resistência envolvido com cada via. O tipo de resistência que envolve os JA é referido como resistência sistêmica induzida (RSI) e a do AS como resistência sistêmica adquirida (RSA). O papel dos JA na sinalização e mesmo na resposta de defesa da planta é

menos esclarecido do que a do AS. No entanto, o JA é proposto como um sinalizador secundário da Indução de Resistência Sistêmica (RSI) (STICHER et al., 1997). Inúmeros estudos evidenciam a importância dos JA na resposta de defesa das plantas contra fitopatógenos (BOSTOCK, 1999).

O etileno é um hormônio vegetal volátil de múltiplas funções fisiológicas em plantas e é produzido como consequência de injúria, de tratamento com elicitores e através de vários processos metabólicos. Embora a participação do etileno na RSI ou na RSA não seja clara, alguns estudos mostram sua necessidade para a expressão de resistência (KNOESTER et al., 1999). Entretanto, alguns autores indicam que a síntese de etileno após uma infecção deve ser um sintoma e não uma causa da indução de respostas de defesa (STICHER et al., 1997). O tratamento com etefon (liberador de etileno) leva algumas plantas a expressarem Proteínas-RP, indicando a possibilidade do etileno ter participação na expressão da resistência (JACOBS et al., 1999).

O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas, onde vários estudos têm revelado a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes de doença vegetal, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos têm sido estimulados por várias substâncias (SOBRINHO, 2004). O fenômeno já é conhecido desde o começo do século passado, tendo, como marco inicial, o trabalho desenvolvido por Chester, em 1933. Em 1961, Ross demonstrou que plantas de fumo submetidas a uma infecção prévia com o vírus do mosaico do fumo (“tobacco mosaic virus” - TMV) se tornavam resistentes a uma nova infecção do vírus. Um ano antes, Cruickshank e Mandryk obtiveram plantas de fumo resistentes ao mofo azul pela inoculação das hastes das plantas com *Peronospora tabacina* (LABANCA, 2002).

Segundo Labanca (2002), existem vários indutores de resistência no mercado mundial: o Oryzmate®, o Bion®, o Messenger®, o Oxycom TM e o Elexa®. O Oryzmate ® (probenazole) é um produto para proteção do arroz contra a brusone que já conta com mais de 20 anos de mercado no Japão e sem que haja um único relato de surgimento de resistência em populações de *Pyricularia grisea*. Além desses indutores comerciais, diversos agentes vêm sendo estudados como possíveis elicitores de respostas de defesa ou indutores de resistência. Esses agentes podem incluir um produto químico,

como, entre outros, o ácido salicílico, o ácido β -amino butírico (BABA), etefon, e o metil salicilato, o estresse de natureza biótica ou abiótica, um patógeno avirulento, parte de um patógeno, como uma glicoproteína ou um carboidrato estrutural, um organismo não patogênico, como as bactérias promotoras de crescimento ou a levedura *S. cerevisiae* (STEVENS, et al. 1998).

Segundo Cardoso Filho (2003), inúmeros trabalhos evidenciam o potencial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na ativação de mecanismos de resistência e na proteção de plantas contra fitopatógenos. Foi demonstrado o efeito de suspensões de células desse microrganismo e do filtrado dessas suspensões na proteção de plantas de sorgo contra *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* (PICCININ, 1995) e de planta de milho contra *C.graminicola* e *E. turcicum* (SILVA & PASCHOLATI, 1992; STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994), de maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. passiflora (PICCININ, 1995) e de eucalipto contra *Botrytis cinerea* (PICCININ, 1995). Outros resultados evidenciaram a obtenção de elicitores glicoprotéicos de *S. cerevisiae*, os quais estimulam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (WULFF & PASCHOLATI, 1998, 1999; LABANCA, 2002).

É muito provável que a resistência induzida por *S. cerevisiae* esteja ligada à presença de determinados carboidratos e glicoproteínas presentes em sua parede celular (PASCHOLATI, 1999). De acordo com Labanca (2002), a parede da levedura é formada basicamente por polissacarídeos e proteínas, com a seguinte distribuição aproximada, em peso: 50 % β -1,3-glucanas, 10 % β -1,6- glucanas, 40 % manoproteínas e 1-3 % quitina. A autoclavagem de células de *S. cerevisiae* leva a liberação de diversos polímeros e oligômeros com massa molecular, carga e conteúdo de açúcares e de proteínas bastante variável. Wulff & Pascholati (1999) extraíram uma glicoproteína carregada negativamente (em pH 8), cuja porção protéica é importante para a indução da síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil (ASM), BTH, CGA 245704, Bion®, Actigard®), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (MAZARO, 2007). Guzzo et al. (2001) verificaram o efeito de acibenzolar-Smetil em cafeeiro suscetível a *Hemileia vastatrix* e observaram indução de proteção à planta.

Os mesmos autores observaram ainda, por microscopia de fluorescência, que o ASM aplicado *in vitro* não interfere na germinação dos esporos e na formação de apressórios de *H. vastatrix*, concluindo que o ASM não possui ação antimicrobiana direta a esse patógeno, porém induz a expressão de genes de resistência para a formação de compostos que impedem ou dificultam o estabelecimento ou desenvolvimento deste patógeno.

O acúmulo de proteínas-RP também foi observado em tomate pelo uso de ASM, com acúmulo de quitinases, β -1,3-glucanases, além de peroxidases e lisozimas (INBAR et al., 1998). Em plântulas de melão tratadas com ASM, foi observado o aumento da atividade das proteínas-RP quitinases e peroxidases (BUZI et al., 2004). A aplicação em pré-colheita com ASM, em associação com azistrobina, foi eficaz na proteção dos frutos de mamoeiro em pós-colheita contra antracnose, reduzindo a incidência e severidade de doenças e induzindo os maiores níveis de atividade de proteínas-RP, - 1,3-glucanases, quitinases e peroxidases (CIA,2005).

Segundo Guzzo (2004), a identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A seleção diferencial de bibliotecas de cDNA, produzidas a partir de RNA mensageiros (mRNAs) isolados de plantas inoculadas, tratadas com elicitores ou indutores de resistência e de cultura de células, tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações hospedeiro-patógeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção do biofertilizante

O biofertilizante foi produzido sob condições anaeróbias, utilizando esterco bovino suplementado com macro e micronutrientes para estimular a fermentação e foi agitado a cada cinco dias por cinco minutos. A proporção de macro e micronutrientes foi feita para 20 litros do biofertilizante, de acordo com Bettioli et al (1998).

Fontes de nutrientes	Volume
Nitrogênio	130g
Fósforo	13,6g
Potássio	50g
Cálcio	19,5g
Manganês	13,2g
Enxofre	95g
Ferro	36g
Magnésio	9.8g
Cobre	5,8g
Zinco	58g
Boro	7g
Sódio	24g

Para ajudar no processo de fermentação foi acrescentado de bagaço de cana-de-açúcar e água na proporção de 50% (volume/volume), em balde plástico de 20 litros fechado, por um período de 60 dias, determinado através de análises microbiológicas para identificação de fungos, *Bacillus* e outras bactérias.

3.2. Determinação da comunidade microbiana do biofertilizante

A composição da comunidade microbiana foi determinada a cada cinco dias por até 60 dias, as análises foram feitas em amostras dos biofertilizantes filtradas e diluídas de 10^{-1} até 10^{-3} . Após a homogeneização, com auxílio de pipetador automático, distribuiu-se 100 μ L de cada uma das diluições em meio Agar, em placas de Petri, seguido de sua uniformização por meio de alça de Drigalski. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D., com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro.

Para a contagem das populações totais de fungos utilizou-se o meio de Martin, modificado por Liu e Baker (1980). O meio Nutriente Agar (NA), utilizado para a determinação do número de colônias de bactérias formadas; e BDA para a determinação das colônias de *Bacillus* spp, de acordo com a metodologia de Bettiol (1995). Foram utilizadas três placas para cada diluição. A avaliação foi realizada com 24 e 48 horas de incubação, contando-se o número de colônias por placa. Os valores obtidos foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{FC mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ colônias}}{\text{diluição}} \times 10$$

Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Isolamento e manutenção dos isolados de *Phytophthora parasitica*

Consistiram na inoculação e re-isolamento do patógeno e na manutenção do isolado de *P. parasitica* o qual foi utilizado na pesquisa. Utilizou-se o isolado IAC-01/95, pertencente à coleção de isolados da Clínica Fitopatológica do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira'. Discos de micélio do patógeno cultivados em meio de cultura cenoura-agar (CA), contendo 1 mL de Rifampicina, 1 mL de Ampicilina e 2 mL de Benomil a cada 1000 ml de meio, segundo metodologia adaptada de KAOSIRI et al. (1978) foram transferidos para placas de Petri contendo o mesmo meio. As culturas foram mantidas a 25

°C, no escuro, durante seis dias, até o crescimento do micélio em toda a superfície do meio.

Com a finalidade de manter e recuperar a patogenicidade do isolado, foram realizados re-isolamentos periódicos a partir de inoculações em frutos de limão 'Siciliano' (*Citrus limon*). As inoculações em frutos de limão 'Siciliano' foram realizadas utilizando palitos-de-dente (autoclavados) para produzir ferimentos no fruto e introduzir porções do micélio. Os frutos foram mantidos em bandejas à temperatura de 25°C com 16 horas de luz por nove dias. Na seqüência, os frutos foram abertos cuidadosamente, após breve assepsia em câmara de fluxo laminar. As sementes, contaminadas com o patógeno foram retiradas e colocadas individualmente em placas de Petri contendo meio cenoura - ágar e, posteriormente, mantidas em estufas B.O.D., a 25 °C, no escuro, durante seis dias.

3.4. Efeito do biofertilizante no crescimento micelial de *Phytophthora parasítica*.

Para determinação do efeito do biofertilizante no crescimento micelial de *P. parasítica*, o mesmo foi filtrado com o auxílio de uma gaze e adicionado ao meio de cultura cenoura-ágar (CA) (KAOSIRI et al., 1978), nas seguintes concentrações: 0 (controle); 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0%. Como testemunhas foram utilizados os meios CA, seguindo as mesmas concentrações, colocando-se água no lugar do biofertilizante. Após o preparo dos meios adicionaram-se 16 g de ágar por litro e os meios de cultura mais o biofertilizante foram autoclavados a 120 ° C por 20 minutos a 1 atm. Posteriormente, os meios foram vertidos em placas de Petri. Discos de 5 mm de diâmetro das colônias de *P. parasítica* foram transferidos para o centro das placas, justapondo-se a face contendo a colônia diretamente sobre o meio de cultura. A incubação das culturas foi em estufa B.O.D. a 25°C ± 2°C, no escuro. A determinação do crescimento micelial foi realizada quando a colônia do fitopatógeno, no tratamento testemunha, atingiu a extremidade da placa. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.5. Efeito do biofertilizante no desenvolvimento das plantas

3.5.1. Biofertilizante incorporado ao solo

Para este estudo foram utilizadas cinco variedades de porta-enxertos de citros: *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (tolerante), tangerina Sunki (*C. sunki* Hort. Ex Tan) (suscetível), limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) (suscetível), laranja Azeda (*C. aurantium*) (tolerante) e laranja Caipira [*C. sinensis* (L.) Osbeck] (suscetível). Três sementes das respectivas variedades foram semeadas e acondicionadas em sacos de polietileno de três litros contendo substrato comercial Plantmax® (Eucatex) autoclavado, utilizado para formação de mudas cítricas e substratos a base do extrato aquoso. O substrato a base do extrato aquoso foi obtido pela mistura do biofertilizante distribuídos em diferentes concentrações [10, 20 e 50% (v/v)]. Os ensaios foram realizados em ambiente com iluminação artificial e fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25°C e umidade relativa (UR) de 85% e a irrigação foi feita diariamente. Após 60 dias da germinação fez-se o desbaste, deixando-se apenas a planta mais vigorosa. O delineamento experimental foi feito em blocos ao acaso com quatro repetições, sendo considerado uma planta por parcela.

3.5.2 Efeito do biofertilizante no controle de *P. parasitica* em diferentes porta-enxertos de citros

Para avaliação do efeito do biofertilizante no controle da doença, as plantas foram pulverizadas por aspersão até o ponto de escorrimento, com concentrações equivalentes aos tratamentos aplicados ao solo, ou seja, plantas que tiveram o biofertilizante incorporado ao solo em concentração de 10% tiveram as folhas pulverizadas com o biofertilizante em concentração de 10%, e assim sucessivamente.

A avaliação se deu pela medição do comprimento das lesões nas hastes das plantas inoculadas aos 60 dias após a inoculação do patógeno. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições e uma planta por parcela. Para comparação das médias utilizou-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.6 Análise fenotípica das plântulas

No sexto mês após o plantio foi feita a avaliação fenotípica das plantas (Figura 2), incluindo altura das plantas, a qual foi medida com trena graduada em cm, desde o colo ao ápice da planta; diâmetro do caule (cm), medido com paquímetro digital no colo da planta e, número de folhas. Os dados fenotípicos foram tabulados e submetidos à análise estatística. Foi realizada a análise de variância, utilizando-se o software SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2000).

Figura 2. Análise fenotípica das plantas após seis meses do plantio: (A) altura, (B) diâmetro caulino e (C) número de folhas

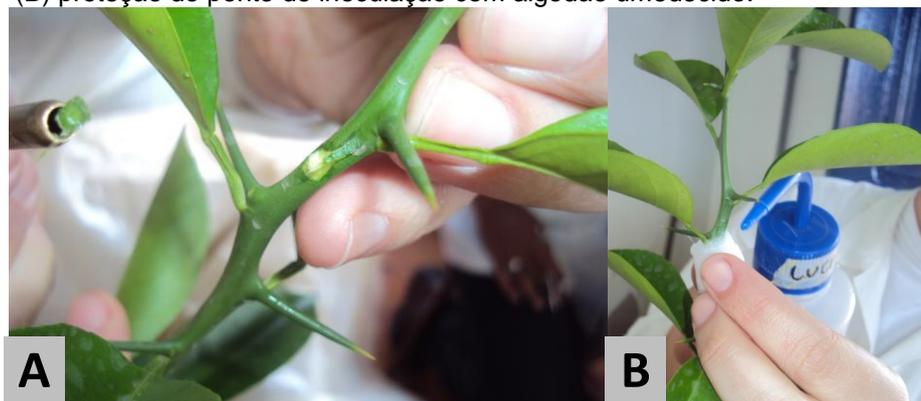


3.7 Inoculação da *Phytophthora parasítica*

Após sete dias da pulverização com o biofertilizante foi realizada a inoculação com *P. parasítica* (Figura 3). Esse período foi estabelecido com base em estudos realizados com eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no controle da ferrugem (*Puccinia psidii*), apresentado por Teixeira et al. (2004).

Hastes das plantas cítricas foram inoculadas pelo método do disco de meio contendo micélio de *P. parasítica* (SIVIERO et al. 2002) de acordo com o seguinte procedimento: com auxílio de um furador de rolhas (3 mm), discos das cascas das hastes das plantas foram removidos, deixando o câmbio das plantas expostos. Posteriormente, discos de meio de cultura contendo micélio, de mesmo diâmetro, foram colocados no local e cobertos com os discos da cascas, que foram anteriormente removidos, pressionando o disco de micélio sobre o lenho. O local da inoculação foi protegido com algodão umedecido e esparadrapo. As plantas foram acondicionadas em ambiente com iluminação artificial e fotoperíodo de 16 horas, a 25°C e umidade relativa (UR) de 85%.

Figura 3. Método de inoculação do patógeno *Phytophthora parasítica* em plântulas de citros. (A) remoção do disco da casca com auxílio do furador; (B) proteção do ponto de inoculação com algodão umedecido.



3.8 Tratamentos utilizados no estudo

O experimento foi composto de quatro tratamentos: 1) plantas tratadas com biofertilizante nas concentrações de 10, 20 e 50%); 2) plantas inoculadas com *P. parasítica*; 3) plantas tratadas com biofertilizante e inoculadas com *P. parasítica*; 4) e plantas testemunhas, sem tratamento com biofertilizante e sem inoculação do patógeno.

A coleta das folhas para extração de RNA foi realizada 48 horas após inoculação com *P. parasítica*. A seleção desse tempo foi baseada em estudos anteriores sobre a ativação de genes envolvidos na interação Citros-*Phytophthora*, detalhados por Teixeira (2005) e Boava (2010).

3.9. Avaliação da expressão diferencial de genes

3.9.1. Extração RNA com Trizol

A extração do RNA foi realizada usando Trizol (Invitrogen Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante, o qual consistiu em macerar 200 mg do material vegetal das variedades *Poncirus trifoliata* e laranja Caipira, adicionar 1,5 mL de Trizol e agitar até completar a homogeneização através do vórtex. Esperou-se 5 minutos em temperatura ambiente; centrifugou-se a 1200 g (r.c.t) por 10 minutos à 4°C; transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Para separação de fases, adicionou-se 300µL de clorofórmio por tubo. Agitou-se manualmente por 15 segundos e

incubou-se à temperatura ambiente por 3 a 5 minutos. Centrifugou-se 12000 g por 15 minutos a 4°C. Nesta fase o RNA estava na fase superior incolor e com volume em torno de 600 µL. Coletou-se o sobrenadante e transferiu-se para outro tubo.

Para precipitação do RNA, adicionaram-se 750 µL de isopropanol, inverteu-se delicadamente e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 11000 g por 10 minutos a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, lavou-se com etanol 75% e 1,5 mL de DEPC. Centrifugou-se a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Secou-se a temperatura ambiente e ressuspendeu-se em 40 µL de água DEPC. Armazenou-se a -20°C.

3.9.2. Quantificação do RNA

A quantidade e a pureza do RNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop ND - 1000 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA).

3.9.3. Tratamento com DNase I

Para eliminar qualquer contaminação por DNA foi realizado o tratamento do RNA com a enzima RNase-free DNase I (Qiagen, Maryland, EUA), na concentração de 1 U para cada 1.000 ng de RNA. A reação foi incubada por 30 min a 37°C e interrompida com choque térmico a 65°C por 5 min.

O mix de reagentes foi feito com RNA total contendo: 2,5 µL 10X DNase I Reaction Buffer; 1µL DNase I, Amp. Grade, 1U/µL, com volume final de 25µL. Incubou-se por 15 minutos a 25°C, adicionaram-se 2,5 µL de 25 mM EDTA (stop solution) por tubo, misturou-se a 65°C por 10 minutos. Completou-se para 400 µL com água DEPC. Adicionou-se 400 µL de fenol saturado e misturou-se por inversão. Centrifugou-se por 3 minutos a 8000 rpm a 22°C. Transferiu-se fase superior para o novo tubo e colocou-se 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), em seguida misturou-se por inversão. Deixou-se 2 horas a 20°C negativos e centrifugou-se por 30 minutos a 12000 rpm a 4°C, descartou-se o sobrenadante e deixou-o secar por 1 hora. Ressuspendeu-se em 30 µL com água DEPC.

3.9.4. Síntese do cDNA

As reações de transcrição reversa (síntese da primeira fita de cDNA), foram realizadas segundo as instruções do fabricante de SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen) com oligo (dT) primer (dT₁₂₋₁₈, Invitrogen). Foram adicionados 8 µL de RNA tratado com DNase e diluído a uma concentração de 1 µg. Em seqüência, adicionou-se na reação 1µL de 5x First Strand Buffer, 2µL 0,1 M DTT, 2µL 10 mM de desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 1µL RNase OUT e 1µL SuperScript, totalizando como volume final 20 µL.

3.9.5. Desenho dos oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos específicos foram desenhados com base nas seqüências disponíveis no CitEST dos genes alvos (*peroxidase*, *lipoxigenase*, *β-1,3-glucanase*, *chitinase* e *chalcona sintase*) (Tabela 1), usando o *Primer Express 2.0 software* (Applied Biosystems) e sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Prodimol Biotecnologia S/A).

Tabela 1. Sequências dos “primers” dos genes alvos e normalizadores utilizados nos ensaios de níveis de expressão por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR).

	Descrição	CitEST	Forward/Reverse	Amplicon
<i>PR2</i>	<i>β-1,3-glucanases</i>	CA-4000443	GCCGGCCTTGAAACC/ GCCGGCCTTGAAACC	116
<i>PR3</i>	<i>Chitinase class I</i>	CAS-CR-204551	ACAGAATTGTGGAAGCGG/ AGCAAGTCTTCAAACATCTCC	107
<i>CHS</i>	<i>Chalcone synthase</i>	CAS-CS-207154	AGTCTGAGGAAGCGAAA/ CAAGCTTTGATGGGGACACT	98
<i>LOX</i>	<i>Lipoxygenase</i>	CAS-CS-111108	AATTCGACTTGGGTCTGTTC/ CCGTAAGCGGATTGATAGG	102
<i>POX</i>	<i>Peroxidase</i>	CAS-CR-201851	GATCTTCGTGCTCGTGTTTCAT GCCAATGTTTTGCTGTCTC	104
<i>UBQ</i>	<i>Ubiquitin</i>	CAS-PT-300961	TTCGTCAGTTGACTAATCCT/ GTTGCTGTGTTGACTGTG	95
<i>TUB</i>	<i>Tubulin</i>	CAS-LT-602290	TTTGTAAGATCCCTCCGA/ TCACCCTCCTGAACATTT	87

3.9.6. PCR Quantitativo em Tempo Real (RTqPCR)

Os ensaios foram conduzidos no aparelho ABI Prism 7000 sequence Detection system e 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), através do sistema SYBR-green de detecção (WITTWER et al., 1997). A

escolha desta estratégia se deve ao menor custo e maior flexibilidade, principalmente, quanto ao desenho dos primers perante os outros sistemas. O sistema de detecção SYBR-green se baseia na capacidade do fluoróforo se ligar às fitas duplas de cDNA. Os níveis de transcrição dos genes foram obtidos em relação aos respectivos controles (plantas não tratadas com biofertilizante e não inoculadas), incluindo *β-tubulina* e *Ubiquitina* como os genes de controle endógeno para referência, visando normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA.

As amostras em duplicata foram submetidas ao qPCR utilizando a seguinte reação: 1 μL de cDNA, 1 μM de cada primer (direto e reverso) e 12,5 μL do SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems), o volume final foi ajustado para 25 μL com água Milli-Q. As amplificações foram efetuadas utilizando os ciclos: 2 min a 50°C; 10 a 94°C no início de cada ciclo, seguido por duas etapas de 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C.

Também foi realizada uma reação prévia apenas com o controle endógeno nos diferentes experimentos para normalizar o primeiro ciclo de amplificação (Ct) no qual a fluorescência emitida do produto de PCR é detectada acima da linha de base. Para normalização foi usada a seguinte equação: $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - (\text{controle endógeno})$. O aumento dos níveis de expressão do gene alvo para cada condição foi calculado através da equação: $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{calibrador})$. A quantificação relativa foi feita utilizando o ABI PRISM 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems) através da fórmula $2^{-\Delta \Delta Ct}$. Os valores de Ct foram analisados usando a versão 4.3.6 do software Genex (<http://www.multid.se/>). Para a quantificação relativa, o método $2^{-\Delta \Delta Ct}$ entre as condições de RT-qPCR foi aplicado.

Os desvios-padrão foram usados para mostrar diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.9.7 Análise da lesão de *P. parasítica*

No presente estudo, após 60 dias da inoculação de *Phytophthora parasitica* fez-se a avaliação das lesões (figura 4), raspando-se superficialmente o local da lesão com o auxílio de um bisturi e a medida do comprimento da lesão fez-se desde o início do escurecimento do caule até o final, com o auxílio de régua graduada em cm (BOAVA, 2002).

Figura 4. Raspagem do local da lesão e medição do comprimento da lesão em plantas inoculadas com o patógeno, da variedade Laranja Caipira.



3.9.8 Análise da promoção de crescimento da raiz com biofertilizante

As amostragens foram feitas 8 meses após o tratamento com o biofertilizante em casa-de-vegetação em diferentes concentrações [10, 20 e 50% (v/v)]. As raízes foram lavadas em água corrente e separadas da parte aérea, a seguir cada variedade foi pesada a fim de obter, através do peso, o nível de desenvolvimento das plantas com a aplicação do biofertilizante.

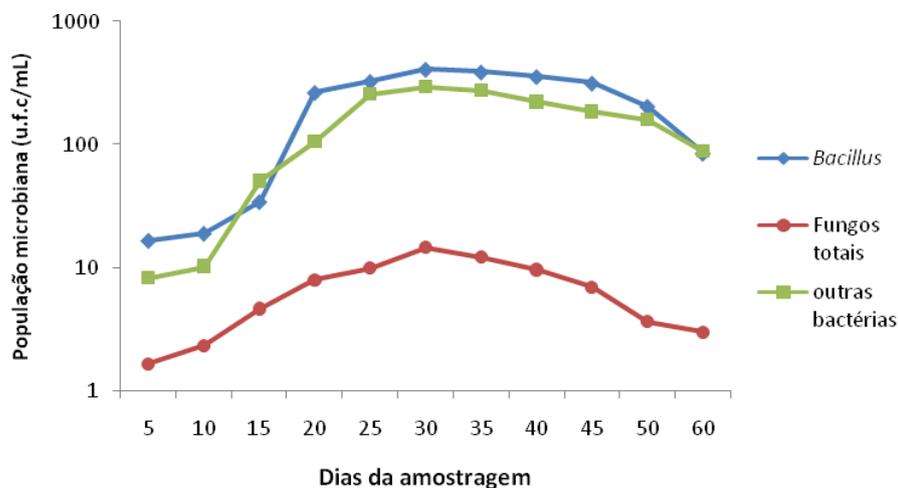
O material foi seco em estufa de circulação forçada a 65°C por 24 horas e em seguida deixado esfriar por cerca de uma hora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da comunidade microbiana do biofertilizante

As populações microbianas no biofertilizante foram variáveis (Figura 5). Os picos populacionais foram encontrados entre 25 e 35 dias decorridos do início da produção do mesmo. Verificou-se que houve uma quantidade variável, porém elevada de bactérias totais e *Bacillus*, e uma baixa quantidade total de fungos. Estes dados estão de acordo com Trach e Bettiol (1997) que verificaram durante a fermentação que a população de fungo foi significativamente mais baixa, enquanto que, as populações de bactérias totais e de *Bacillus* foram significativamente mais elevadas. Acredita-se ainda que, o total de microrganismos presentes no biofertilizante seja maior ao que foi indicado nas amostras plaqueadas, pois vale ressaltar que, em meios seletivos apenas parte das populações existentes se desenvolvem (HERBERT, 1990). Além disso, o biofertilizante foi agitado durante cinco minutos a cada cinco dias, a diminuição da umidade e o provável acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos durante a fermentação podem ter contribuído para a baixa comunidade microbiana encontrada. À medida que o processo de maturação progride, as condições físicas e a composição química do meio tendem a uma estabilização. Dessa maneira, é de se esperar que a estrutura da comunidade microbiana se estabilize com estas mudanças e que a atividade enzimática acompanhe essa tendência, como foi relatado por Soares e Switzenbaum, 1996.

Figura 5. População microbiana, expressa em unidades formadoras de colônias por mL (ufc mL^{-1}) e escala logarítmica, analisadas a partir do biofertilizante em intervalos de 5 dias.



4.2. Efeito do biofertilizante sobre o crescimento micelial de *Phytophthora parasítica*

Todas as concentrações do biofertilizante afetaram significativamente a taxa de crescimento micelial de *P. parasítica* (Figura 6 e 7). No entanto, em concentrações até 20%, o biofertilizante inibiu cerca de 80% o crescimento micelial do fitopatógeno. Os resultados estão de acordo com os obtidos por Castro et al. (1991), os quais observaram redução no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp, após incorporação do biofertilizante nas avaliações; com os obtidos por MCquilken et al. (1994), que verificaram que extratos aquosos de biofertilizantes inibiram o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Tratch e Bettioli (1997), relataram que concentrações acima de 15% do biofertilizante inibiram completamente o crescimento *in vitro* da maioria dos fungos testados, como *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Septoria lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium* sp. Para os autores, os metabólitos existentes no biofertilizante foram os responsáveis pela inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos.

Assim, acredita-se que a inibição do crescimento da colônia de *P. parasitica* pelo biofertilizante tenha sido em função de metabólitos tóxicos produzidos pelos microrganismos existentes no biofertilizante. Os efeitos de diferentes substâncias orgânicas sobre os fitopatógenos são discutidos por Van Andel (1996).

Figura 6. Efeito da concentração do biofertilizante no crescimento micelial (cm) de *Phytophthora parasitica*.

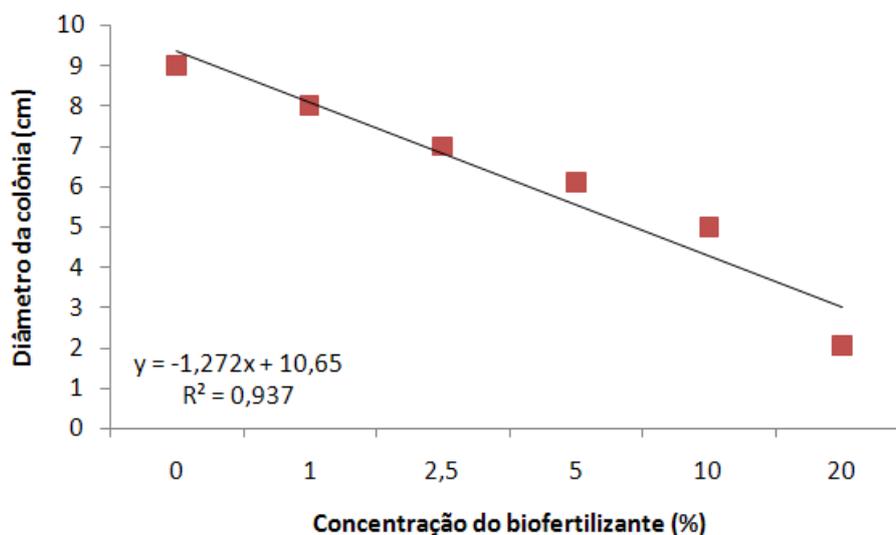
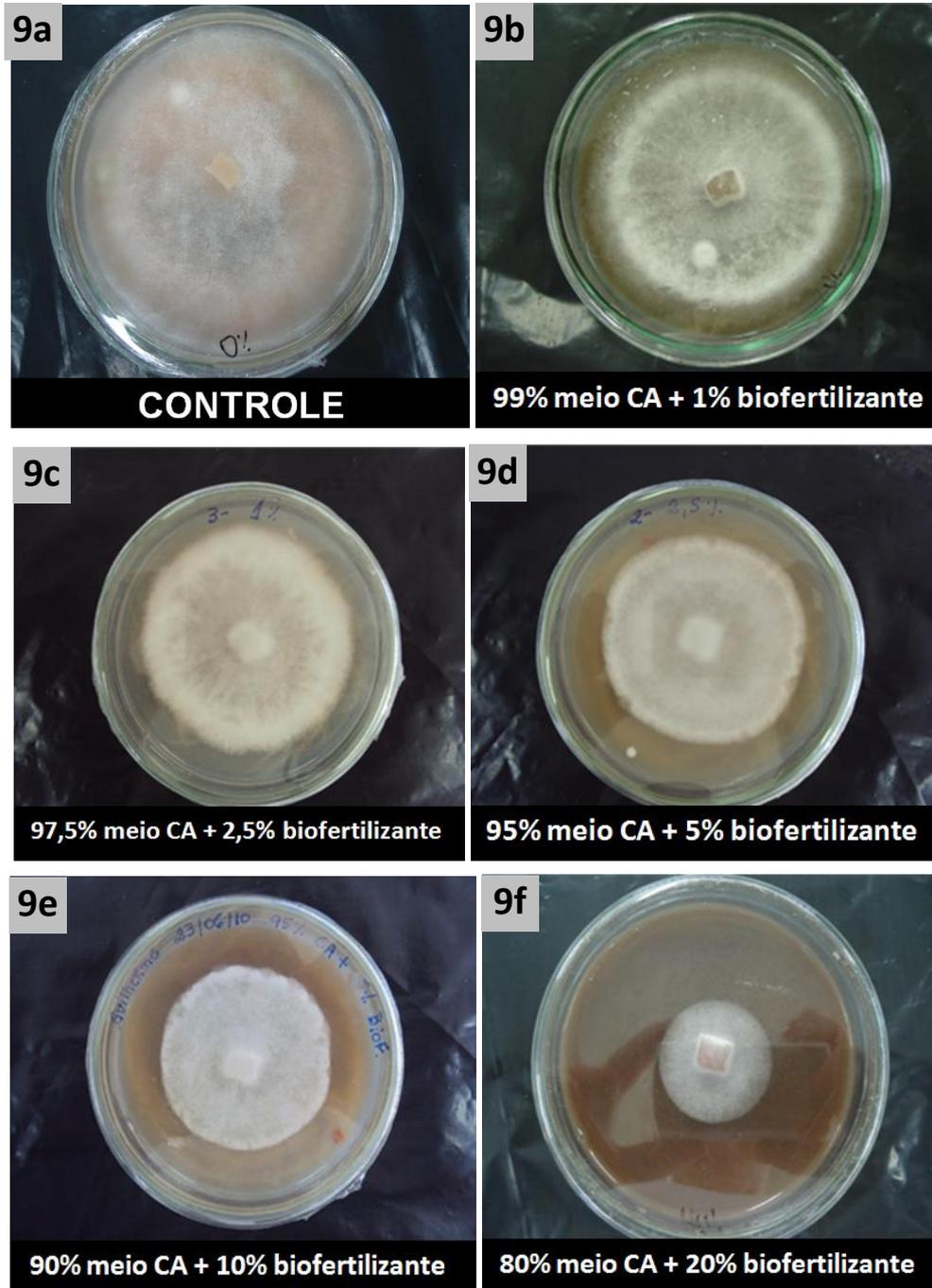


Figura 7. Cultivo de *Phytophthora parasítica* em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de biofertilizante. Figura 9a – 100% do meio CA (cenoura-ágar); Figura 9b – 99% do meio CA + 1% do biofertilizante; Figura 9c – 97,5% do meio CA + 2,5% do biofertilizante; Figura 9d – 95% do meio CA + 5% do biofertilizante; Figura 9e – 90% do meio CA + 10% do biofertilizante e Figura 9f – 80% do meio CA + 20% do biofertilizante.



4.3. Efeito do biofertilizante no desenvolvimento das plantas cítricas

As regressões dos valores relativos à influência de concentrações do biofertilizante nas variáveis: altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas e massa seca das raízes, encontram-se na Tabela 2.

Quando se analisaram as variáveis altura e diâmetro do caule das plantas (Figuras 8 e 9), verificou-se que as concentrações de 10 e 50% do biofertilizante induziram maior desenvolvimento nas plantas de *P. trifoliata* e limão Cravo, quando comparados às outras variedades, as quais não diferiram entre si. A tangerina Sunki e laranja Azeda apresentaram maior altura quando se utilizou a concentração de 20% do biofertilizante (Figura 8).

Vale ressaltar que o maior desenvolvimento das plantas pode ter sido influenciado pelo fornecimento de micronutrientes ao composto. Por exemplo, o zinco, dada a sua ação na síntese de triptofano, que é o precursor do ácido indol-3-acético (EPSTEIN, 1975) e o boro, que promove o alongamento dos pontos de crescimento da parte aérea e raiz, favorecendo assim o crescimento da planta. Diversos autores demonstraram efeitos do biofertilizante no desenvolvimento de plantas. Barros Júnior (2001) constatou que os compostos orgânicos e biofertilizantes, quando aplicados nas plantas de cafeeiro, resultaram em maior comprimento da parte aérea quando comparadas com plantas não tratadas. Mesquita (2005) registrou o crescimento em altura e diâmetro do tronco do mamoeiro, atribuídos às doses de biofertilizante aplicadas no solo. Quanto ao diâmetro caulinar o biofertilizante afetou negativamente as plantas de laranja Azeda na concentração de 50%, ocorrendo diminuição significativa em seu diâmetro em relação às plantas testemunhas (Figura 9).

No solo, segundo Oliveira et al. (1986), a aplicação do referido efluente promove melhorias nas propriedades físicas tornando os solos mais soltos, com menor densidade aparente e propício às atividades biológicas. Geralmente o biofertilizante reduz a acidez do solo com a utilização continuada ao longo do tempo e o enriquece quimicamente. Essa ação se deve a capacidade do biofertilizante de reter bases, pela formação de complexos orgânicos e pelo desenvolvimento de cargas negativas.

Santos (1992) constatou que o biofertilizante quando aplicado em pulverizações foliares, diluído em água em proporções que variam de 10 a 30% apresentam efeitos nutricionais consideráveis, favorecendo a fixação de flores e de frutos, aumentando a área foliar em diversas culturas, além do efeito hormonal. Para a análise fenotípica do número de folhas, onde somente o tratamento com 20% de biofertilizante teve diferença significativa para *Citrus Sunki* (Figura 10), os demais tratamentos não apresentaram diferença, estatisticamente, significativa.

No que tange à massa seca das raízes (Figura 12), as variedades *P. trifoliata*, laranja Caipira e tangerina Sunki não apresentaram diferenças na massa seca das raízes em nenhuma das concentrações do biofertilizante, quando comparadas com as respectivas plantas testemunhas. Entretanto, as plantas de limão Cravo apresentaram um aumento significativo na massa seca quando tratadas com o biofertilizante na concentração de 10% e 20% (Figuras 11 e 12). Para a laranja Azeda, a adição do biofertilizante na concentração de 50%, reduziu em 90% a massa seca das raízes, em relação às plantas testemunhas. Segundo Santos e Akiba (1996), o biofertilizante em altas concentrações, ou seja, acima de 50%, pode causar estresse hídrico e fisiológico na planta, retardando seu crescimento, floração ou frutificação, isso se deve, provavelmente, ao excessivo desvio metabólico para a produção de substâncias de defesa. Devide et al. (2006), após aplicação do biofertilizante em diferentes dosagens nas culturas do pepino, soja e milho, concluíram que o biofertilizante provocou sintomas de fitotoxicidade, dependendo da concentração.

Figura 8. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante na altura das plantas. A – *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (tolerante), B – laranja Azeda (tolerante), C - limão Cravo (suscetível), D - laranja Caipira (suscetível). E - tangerina Sunki (suscetível).

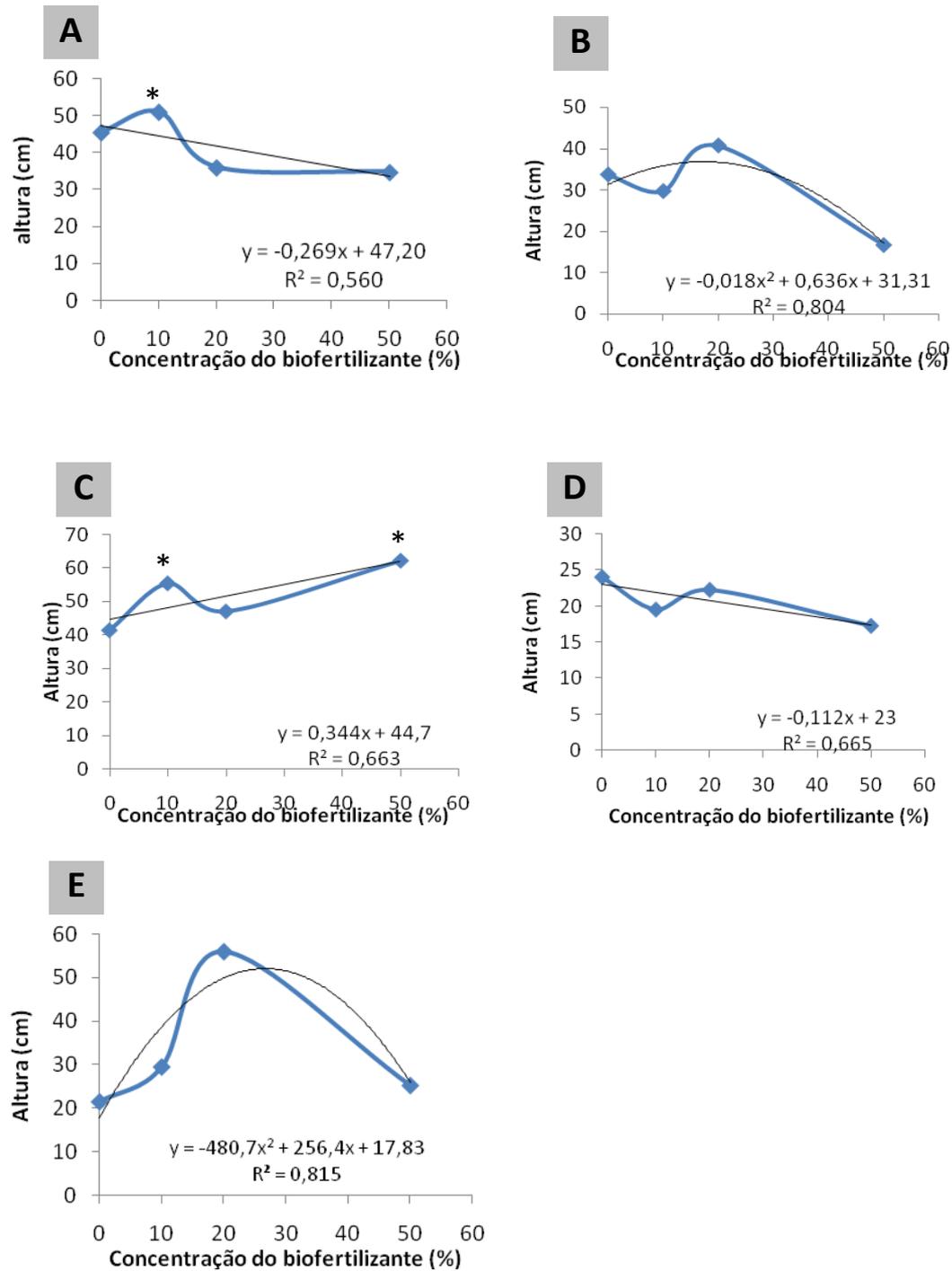


Figura 9. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante no diâmetro das plantas. A – *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (tolerante), B – laranja Azeda (tolerante), C - limão Cravo (suscetível), D - laranja Caipira (suscetível). E - tangerina Sunki (suscetível).

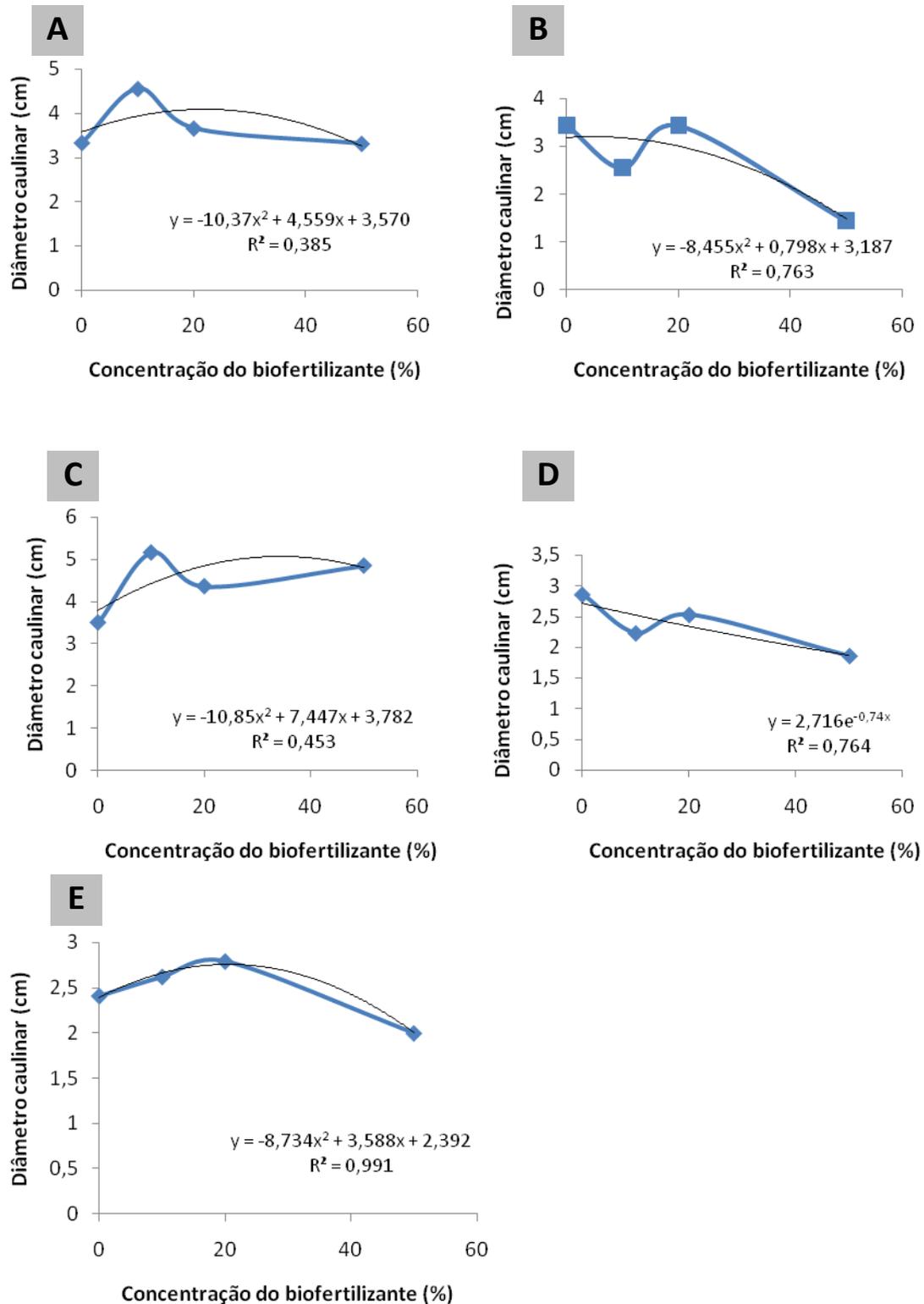


Figura 10. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante no número de folhas. A – *Poncirus trifoliata* cv Rubidou (tolerante), B – laranja Azeda (tolerante), C - limão Cravo (suscetível), D - laranja Caipira (sucetível). E - tangerina Sunki (suscetível).

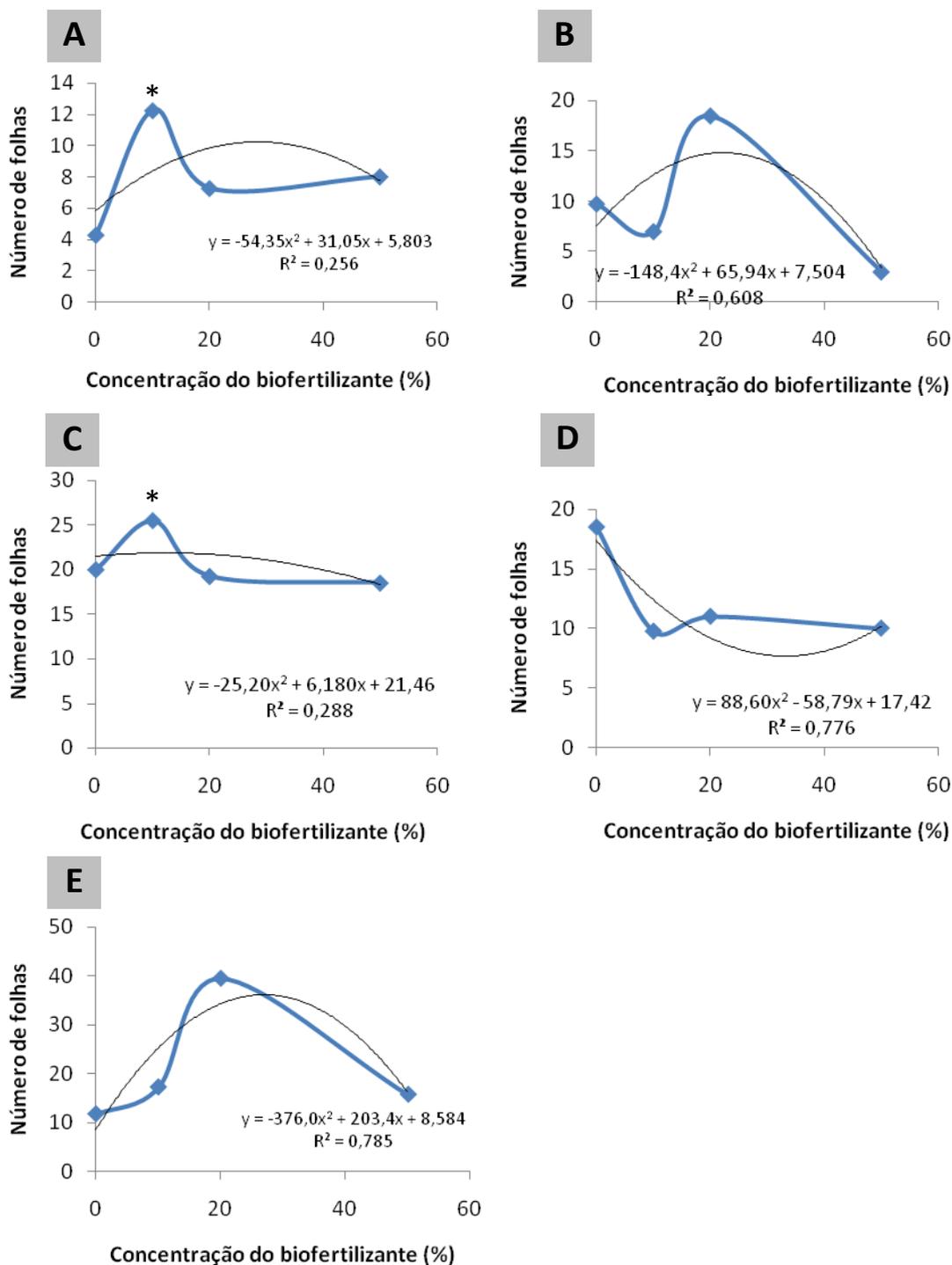


Figura 11. Efeito de diferentes concentrações do biofertilizante no peso seco das raízes. A – *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (tolerante), B – laranja Azeda (tolerante), C - limão Cravo (suscetível), D - laranja Caipira (sucetível). E - tangerina Sunki (suscetível).

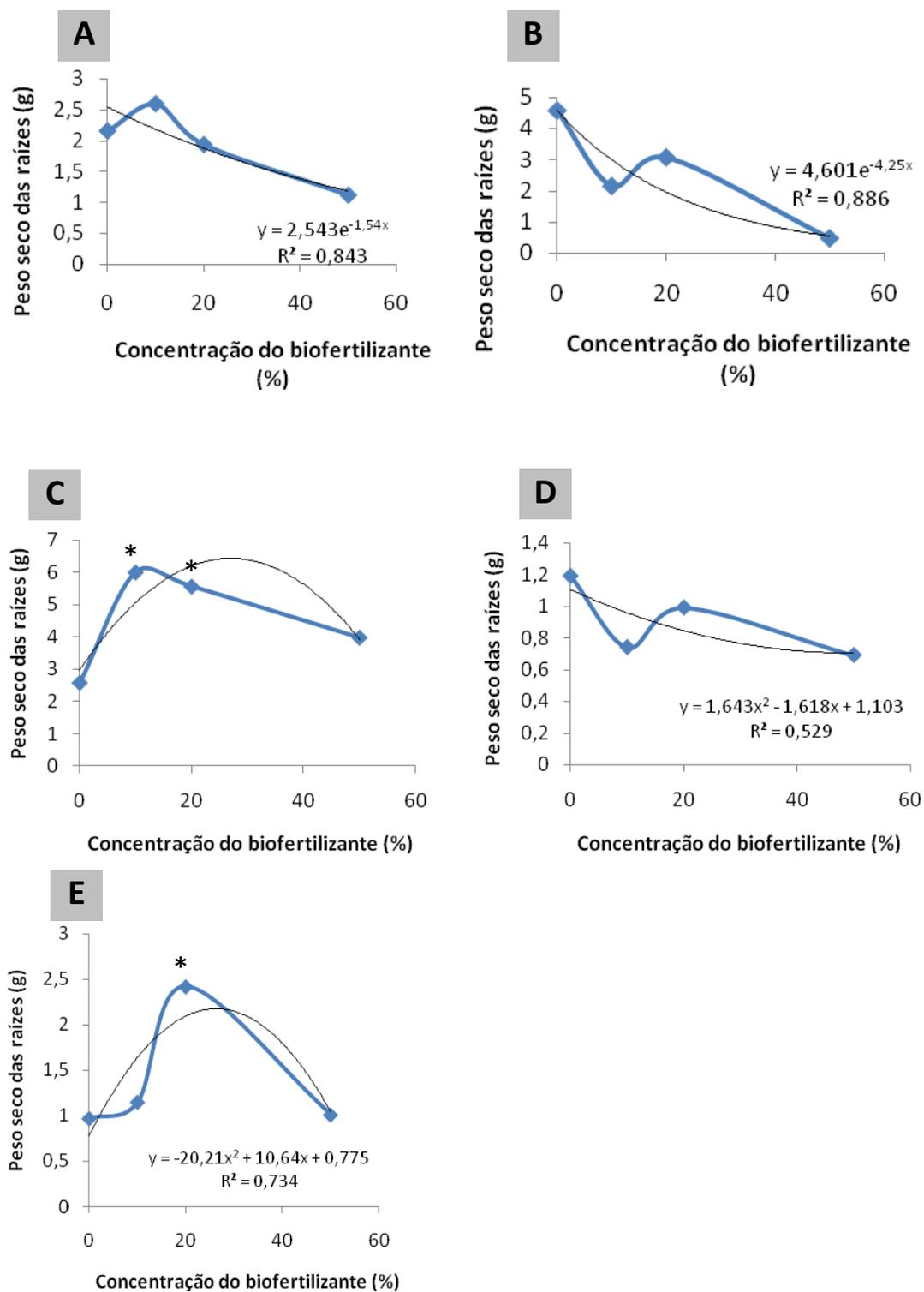


Figura 12. Desenvolvimento das raízes das plantas em diferentes concentrações de Plantmax® + biofertilizante. Sendo que 10% é a concentração do biofertilizante e 90% é a concentração do Plantmax® e assim sucessivamente, e o Controle é feito com 100% de Plantmax®. A – *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (tolerante), B – Limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) (suscetível), C - Laranja Caipira (sucetível), D - tangerina *sunki* (suscetível), E -. Laranja Azeda (tolerante).



4.3.1. Efeito do biofertilizante no controle de *P. parasitica* em diferentes porta-enxertos de citros

O efeito do biofertilizante no controle de *P. parasitica* em diferentes porta-enxertos de citros, avaliado por meio do comprimento da lesão nas hastes das plantas inoculadas, encontra-se na Tabela 2 e ilustrados nas Figuras 13 e 14. Os genótipos *Poncirus trifoliata* e laranja Azeda apresentaram os menores comprimentos de lesão (0,91 e 1,36 cm, respectivamente), os quais foram estatisticamente diferentes das variedades limão Cravo, laranja Caipira e tangerina Sunki, os quais apresentaram os maiores comprimentos médios das lesões (1,96, 2,43 e 2,25 cm, respectivamente), quando as plantas não foram tratadas com o biofertilizante. Esses resultados confirmam os dados relatados em diversos trabalhos da literatura, em que o *Poncirus trifoliata* é classificado como altamente resistente, a laranja Azeda como resistente, o

limão Cravo como moderadamente resistente e a laranja Caipira e tangerina Sunki como suscetíveis (SIVIERO et al., 2002; CARVALHO, 2000).

Tabela 2. Efeito de concentrações de biofertilizante no tamanho da lesão (cm) de *Phytophthora parasitica* em plantas cítricas. *Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Variedades	Concentrações de biofertilizante (%)			
	0	10	20	50
Trifoliata	0,91 a A	0,83 a A	1,03 a A	1,03 a A
Laranja Azeda	1,36 a A	1,87 b A	1,42 a A	1,67 b A
Limão Cravo	1,96 b A	1,56 b A	1,67 a A	1,95 b A
Laranja Caipira	2,43 b B	1,70 b A	1,56 a A	1,65 b A
Tangerina Sunki	2,25 b A	2,11 b A	2,98 b B	1,81 b A

Segundo Siviero (2001), a utilização da medida de comprimento das lesões é mais apropriada na caracterização de resistência de porta-enxertos e novos genótipos em relação à *Phytophthora* spp., quando comparadas com medidas de largura de lesão.

Em relação aos tratamentos com biofertilizante, somente a laranja Caipira apresentou redução no comprimento da lesão em todas as concentrações de biofertilizante testadas. Isso sugere que o biofertilizante pode ter contribuído para o aumento da resistência desse porta-enxerto, classificado como suscetível. A tangerina Sunki, por sua vez, embora tenha apresentado valores variáveis de lesões, quando as plantas foram tratadas com as diferentes concentrações do biofertilizante, os mesmos não foram estatisticamente significativos. Porém, na concentração de 20%, as lesões foram significativamente maiores. Quando se comparam os dados obtidos nesse trabalho com os apresentados em literatura, verifica-se que, diversos estudos demonstraram o efeito de biofertilizante no aumento da resistência de plantas a fitopatógenos (McDONALD et al., 2001). Buck (2002), por exemplo, verificou redução no desenvolvimento da lesão causada por *Botrytis cinerea* em gerânio (*Pelargonium hortorum*) quando a planta foi pulverizada com biofertilizante e inoculada com o patógeno.

Figura 13. Efeito de concentrações do biofertilizante no tamanho da lesão de *P. parasitica* em plantas cítricas. A – *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (tolerante), B – laranja Azeda (tolerante), C - limão Cravo (suscetível), D - laranja Caipira (suscetível). E - tangerina Sunki (suscetível).

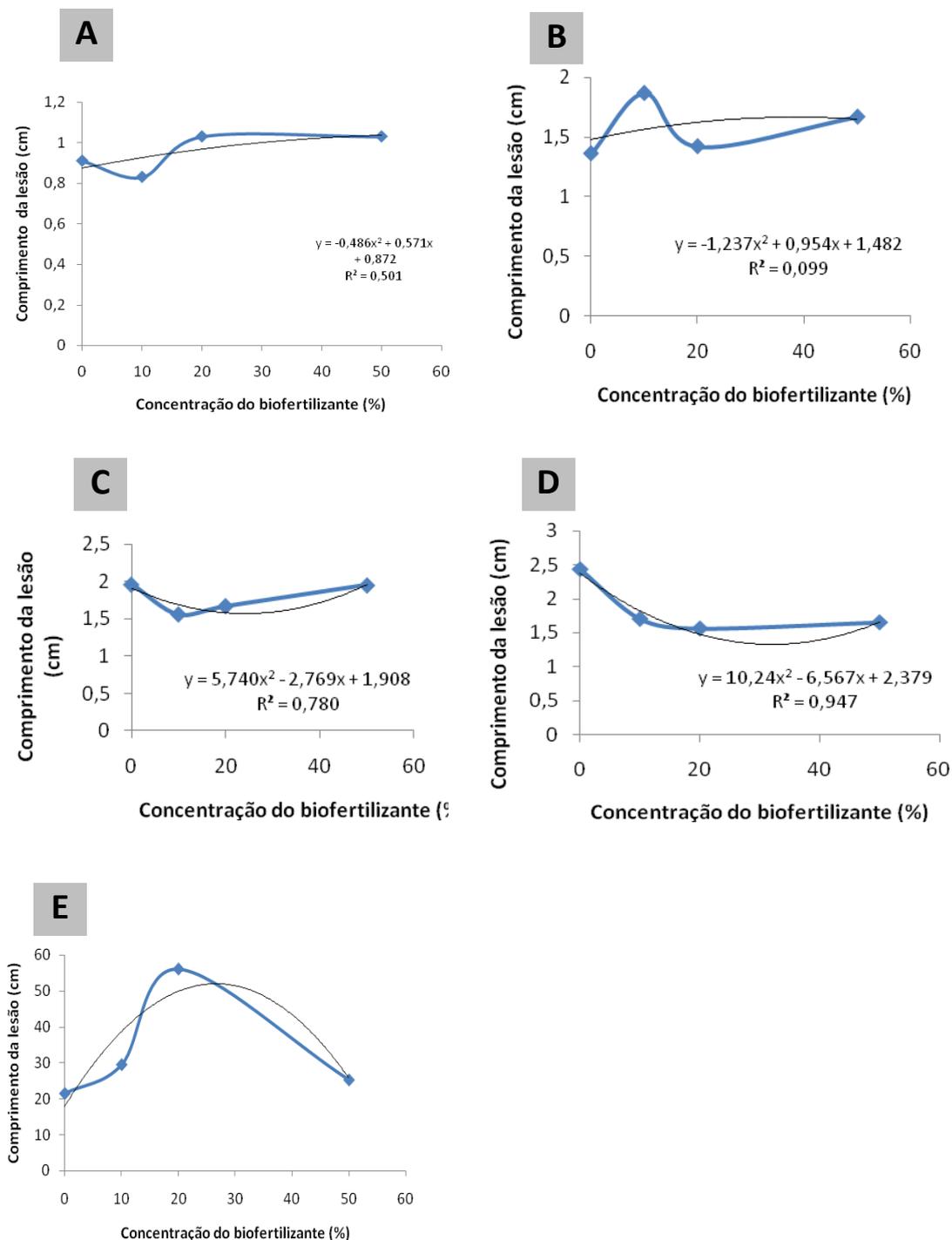


Figura 14. Desenvolvimento das lesões de *P. parasitica* em variedades de citros, acondicionadas em substrato Plantmax® + biofertilizante, na concentração de 20%. A – *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (tolerante), B – limão Cravo (suscetível), C - tangerina Sunki (suscetível), D - laranja Azeda (tolerante), E - laranja Caipira (suscetível).



4.4. Análise de expressão gênica

Os resultados revelaram que os genes *POX*, *CHI* e *LOX* foram diferencialmente expressos após inoculação com *P. Parasitica* nos genótipos resistentes e suscetíveis (Figura 15). No entanto, a diferença de expressão do gene *POX* foi significativamente maior em plantas de *P. trifoliata* inoculadas, em relação à laranja Caipira inoculada. Assim, podemos sugerir que é possível que a expressão desse gene possa ter sido desencadeada em resposta à infecção, e essa indução pode ter potencializado a resistência do genótipo já resistente à infecção por *P. parasitica*, uma vez que é bem documentado que a suscetibilidade ou resistência não é determinada apenas pela presença ou ausência de genes de resistência, mas pela magnitude com que a informação genética é expressa. Dessa forma, a aplicação do biofertilizante e, a posterior inoculação de *P. parasitica*, que levou a uma potencialização relativamente fraca do genótipo suscetível e forte do genótipo resistente, pode ser particularmente relevante. Assim, acredita-se que a menor diferença de expressão do gene *POX* em laranja Caipira pode não ter sido suficiente para contribuir com a inibição da colonização por *P. parasitica*, como observado

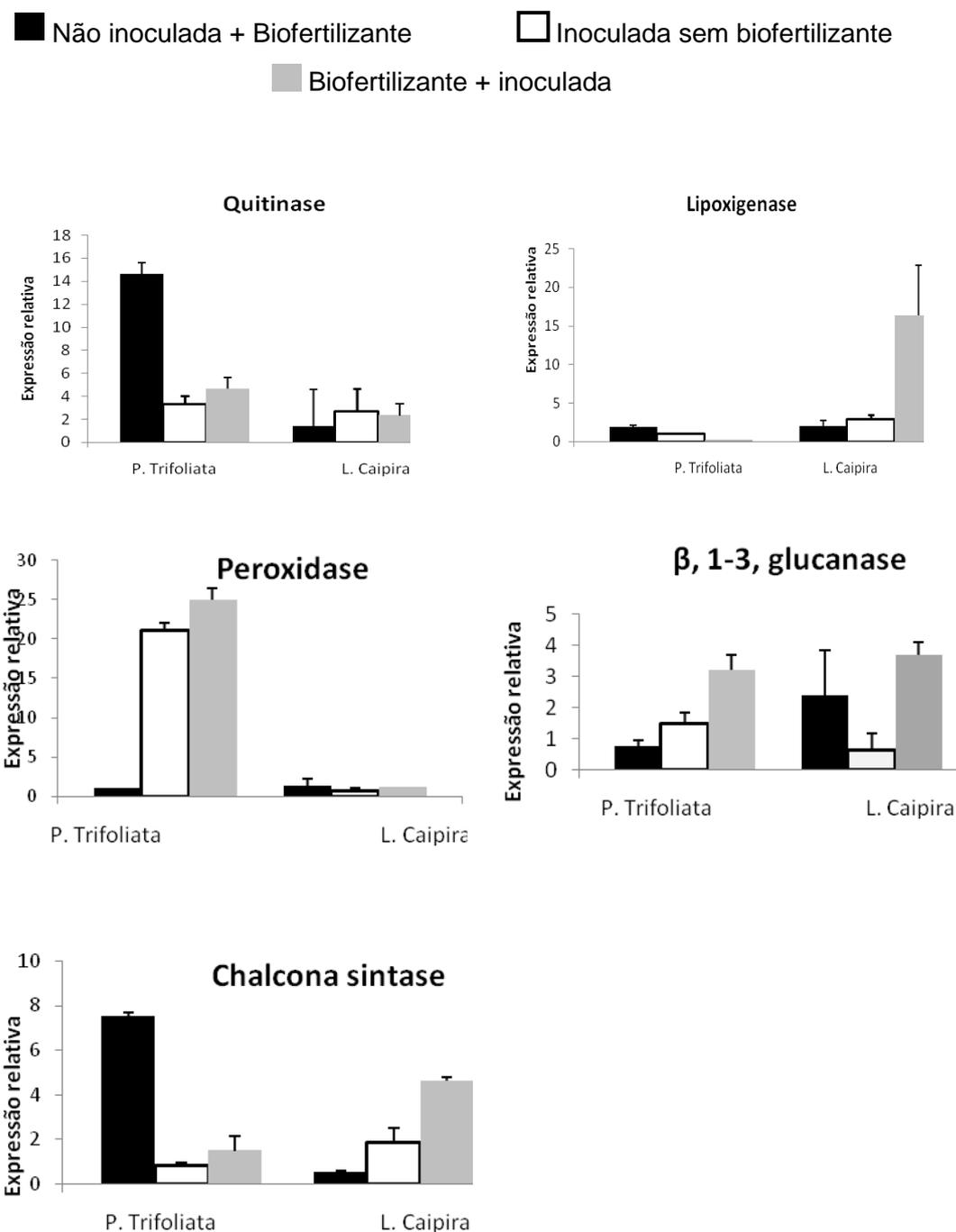
pelas diferenças nos tamanhos de lesão entre os genótipos. Tripathi et al. (2009) sugeriram que o gene POX tem importante papel na defesa antioxidante de célula de plantas e tem diversas funções de resposta de defesa de plantas, tais como resposta de hipersensibilidade, proteção contra radicais de superoxide e início da polimerização de lignina.

Quando as plantas foram somente tratadas com o biofertilizante, os genes CHI e CHS foram mais expressos em relação ao seu respectivo controle em *P. trifoliata*. O gene da β -1,3-glucanase foi mais expresso na laranja Caipira, em relação ao seu respectivo controle. Diversos trabalhos demonstram a ativação desses genes em função de estresse biótico, tais como uso de biofertilizantes (GARCIA et al., 2009). Nandakumar et al. (2001), induziram resistência em arroz com *Pseudomonas fluorescens*, uma rizobactéria promotora de crescimento, e verificaram a redução da severidade da podridão da bainha causada por *Rhizoctonia solani*, correlacionada com o aumento na atividade de quitinase (CHI), que apresenta ação antibacteriana, em razão de sua ação lisozímica sobre a parede celular (STINTZI et al., 1993), e aumento de chalcona sintase (CHS), a qual é chave na rota da biossíntese de fenilpropanóides, como as fitoalexinas e β -1,3-glucanase (GLU), amplamente distribuída em plantas superiores e induzidas durante a resposta de hipersensibilidade da planta a patógenos, degradando a parede celular com sua atividade antifungal (BUCHER et al., 2001).

Quando as plantas foram tratadas com o biofertilizante e seguidas de inoculação com *P. parasitica*, os genes CHI, POX e β -1,3-glucanase foram mais expressos em relação ao seu respectivo controle nos genótipos resistentes. Os genes LOX, CHS e β -1,3-glucanase foram mais expressos em relação ao seu respectivo controle nos genótipos suscetíveis. De acordo com Bostock (2005) quando a planta é induzida pela presença de um elicitador, são perceptíveis as alterações em seu metabolismo. Porém, como observado na laranja Caipira, quando comparada a uma planta tratada com biofertilizante e, posteriormente, desafiada com um patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas tratada com o biofertilizante, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno. Em relação à ativação do gene β -1,3-glucanase, Tuzun et al. (1989) observaram uma correlação positiva

entre indução de resistência à *P. parasitica* Dastur em fumo e sua ativação, sugerindo que as plantas induzidas ficam sensibilizadas e respondem mais rapidamente que as plantas controle e, que β -1,3-glucanase é um componente da resposta de defesa da planta por restringir o desenvolvimento do patógeno. Vantini (2007) verificou a expressão dos genes *CHS* e β -1,3-glucanase em citros quando inoculou a bactéria *Xanthomonas axonopodis*. Aziz et al. (2003), observaram aumento de quitinase e β -1,3-glucanase após o tratamento de plantas de videira com um composto natural, reduzindo assim a infecção de *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* em 55 e 75%, respectivamente.

Figura 15. Níveis de expressão relativa dos genes CHI, LOX, POX, CHS e β -1,3-glucanase em relação ao controle em indivíduos resistentes e suscetíveis. A barra indica o erro padrão. Na legenda: Biofertilizante na concentração de 20% sem inoculação; Inoculado (planta desafiada com a *Phytophthora parasitica* sem tratamento com biofertilizante) e planta tratada com biofertilizante (20%) + inoculação com o fitopatógeno.



5. CONCLUSÕES

1. Durante o preparo nos períodos entre 25 e 35 dias encontra-se a maior população microbiana, especialmente, composta por bactérias e *Bacillus* spp no biofertilizante.
2. O biofertilizante nas concentrações de 10 e 20% aumenta o desenvolvimento vegetativo das variedades *Poncirus trifoliata*, limão Cravo, tangerina Sunki e laranja Azeda.
3. O biofertilizante possui potencial no controle de *P. parasítica*. Na concentração de 20%, quando aplicado em plantas de laranja Caipira, favoreceu o controle da doença.
4. O tratamento com biofertilizante em porta-enxerto suscetível sem inoculação do patógeno é capaz de ativar o gene que codifica a β -1,3-*glucanase* e o tratamento com o biofertilizante mais a inoculação do patógeno é capaz de ativas os genes que codificam LOX, β -1,3-*glucanase* e *CHS*, podendo os mesmos estarem envolvidos com a resistência de plantas cítricas a *P. parasítica*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J. **Podridão do pé dos citros**. Boletim n°. 6, Escola Superior de Agricultura de Minas Gerais, Viçosa. 1941.

AZIZ, A.; POINSSOT, B.; DAIRE, X.; ADRIAN, M.; LAMBERT, B.; JOUBERT, J, M. & PUGIN, A. **Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopora viticola***. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2003.

BARROS JÚNIOR AP. 2001. **Diferentes compostos orgânicos como substrato na produção de mudas de pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Mossoró: ESAM. 31p. (Monografia graduação).

BELTRAME, A.B. Efeito de cianobactérias e algas eucarióticas na resistência de plantas de fumo contra o Tobacco mosaic virus (TMV). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 87p., 2005.

BETTIOL, W. **Isolamento seletivo de *Bacillus***. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.35-36. 1995.

BETTIOL, W. **Resultados de pesquisa com métodos alternativos para o controle de doenças de plantas**. In: HEIN, M. (org.) *Resumos do 1º Encontro de Processos de Proteção de Plantas: controle ecológico de pragas e doenças*. Botucatu, Agroecológica, 2001. p.125-135.

BETTIOL, W. GHINI, R. **Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos**. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. Métodos alternativos de

controle fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. PP. 80-96.

BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVÃO, J.A.H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 22p, 1998.

BOAVA, L. P. **Estabilidade de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose, causada por *Phytophthora parasítica***. Botucatu, 2002. 66p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F., ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência**: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DIPIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BOSTOCK, R.M. **Signal crosstalk and induced resistance**: straddling the line between cost and benefit. Annual Review of Phytopathology, Palo alto, v.42, p.545-580, 2005.

BUCHER, M.; RAUSCH, C.; DARAM, P. **Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants**. J Plant Nutr Soil Sci (escrever por extensor), v.164, p. 209-217, 2001.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. **Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-Smethyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid**. Journal of Phytopathology, Berlim, v.152, n.1, p.34-42, 2004

CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, Acilbenzolar-s-metil e *S. cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*)**. Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 125p., Piracicaba, 2003

CARVALHO, M.L.T. **Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasítica***. 2000. 87p. Tese

(Doutorado - Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Unicamp.

CASTRO, C.M. de; SANTOS, A.C.V. dos; AKIBA, F. **Comprovação *in vitro* da ação inibidora do biofertilizante “Vairo”**: produzido a partir da fermentação anaeróbica do esterco bovino, sobre a germinação de conídios de diversos gêneros de fungos fitopatogênicos. In: *Reunião Brasileira Sobre Controle Biológico De Doenças De Plantas*, 4., 1991, Campinas. Anais... Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1991. p.18.

CASTRO, C.M.; SANTOS, A.C.V. e AKIBA, F. ***Bacillus subtilis* isolado do biofertilizante “Vairo” com ação fungistática e bacteriostática a alguns fitopatógenos.** In: Simpósio de Controle Biológico. EMBRAPA-CNPDA, Jaguariúna, São Paulo. 1992. Anais 3, p.291.

CAVALCANTI, L. S. **Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb em plântulas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) cv. Teobahia, por benzotiadiazole (ASM).** Lavras, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle póscolheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*).** Piracicaba, 2005. 187p. Tese de doutorado.

D’ANDRÉA, P.A.; MEDEIROS, M. B. **Biofertilizante biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças,** In: Hortibio: 1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, ecológica e Biodinâmica. Resumos. Botucatu-SP. Agroecológica, 2001. P.225-232.

DEVIDE A.C.P; AGUIAR, L.A; MIRANDA, S.C; RICCI, M.S.F; ALMEID, D. L/ RIBEIRO, R.L.D. **Efeito fitotóxico de biofertilizante líquido utilizado em lavoura de café.** In: FERTBIO 2000 XXIV *Reunião Brasileira De Fertilizante De Solo E Nutrição De Plantas; Vii Reunião Brasileira Sobre Micorrizas; Vi Simpósio Brasileiro De Microbiologia Do Solo; III Reunião Brasileira Sobre Biologia Do Solo*, 2006. Santa Maria, Anais. UFSM.

ELAD, Y., CHET, T., KATAN, J. (1980). **Trichoderma harzianum**: a biological agent affective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70, 119-21.

EPSTEIN, E. **Nutrição mineral de plantas**: princípios e perspectivas. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1975. 341p.

ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. **Phytophthora disease worldwide**. St Paul, APS Press, 1996. 562p.

FAO. **Citrus commodity notes**: developments in international citrus trade 2005-2006, Disponível em: <http://www.fao.org/es/esc/en/2095/20990/highlight28187en.htm>. Acesso em: 21 out. 2010.

FAWCETT, H.S. **Citrus disease and their control**. 2nd ed. New York. Mcgraw Hill Co. 1936.

FAWCETT, H.S. **Gummosis on citrus**. *J. of Agric. Res.*, v.24, p.235-55, 1923.

FEICHTENBERGER, E. **Avaliação de dose, época e número de aplicações de fungicidas no controle de verrugose em limoeiro siciliano**. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.18, p.28, 1992.

FEICHTENBERGER, E. **Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros**. In: Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F.; Matsuoka, K.; Bezerra, J.L. (Eds). *Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil*. Campinas. Livraria e Editora Rural Ltda. 2001. pp.283-342.

FERREIRA, D. F. **Sistema SISVAR para análises estatísticas**: manual de orientação. Lavras: Universidade Federal de Lavras / Departamento de Ciências Exatas, 2000. 66 p.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Citros**. In. *Agriannual 2009: anuário da agricultura brasileira*. São Paulo, 2009. P.267-300.

GARCIA, D. B. **Danos causados por *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) na qualidade da cana e processo fermentativo**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias

e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

GLIESSMAN, S.R. Agroecologia – **Processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 653p.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. Piracicaba, 2004. 236p. Tese de doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.

GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. **Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem**. Arquivos do Instituto Biológico, v.68, n.1, p.89-94, 2001.

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. **Induced resistance to disease**. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. cap.8, p.177-199.

HANN, M.G. **Microbial elicitors and their receptors in plants**. Annual Review of Phytopathology, v.34, p.387-412, 1996.

HAYASHIDA, S.H.; CHOI, M.Y.; NANRI, N.; YOKOYAMA, M.; UEMATSU, T. **Control of potato common scab with an antibiotic biofertilizer produced from swine feces containing *Streptomyces albidoflavus* CH-33**. Agricultural, Biological and Chemistry, Tokyo, v.53, n.2, p.349-354, Feb. 1989.

HERBERT, R.A. **Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments**. In: GRIGOROVA, R.; NORRIS, J.R. (Eds.). Methods in microbiology. Techniques in microbial ecology. London: Academic Press, 1990. p.1-39.

HICKMAN, C.J. **Biology of *Phytophthora* zoospores**. Phytopathology, St. Paul, v.60, n.7, p. 1128-1134, 1970. HOAGLIN, D.C. Letras-resumo: um conjunto de estatísticas ordinais selecionadas. In: HOAGLIN, D.C.; MOSTELLER, F.; TUKEY, J.W. (Ed.). Análise exploratória de dados. Técnicas robustas: um guia. Lisboa: Edições Salamandra, 1992, p.32- 58

INBAR, M.; DOOSTDAR, H.; SONODA, R.M.; LEIBEE, G.L.; MAYER, R.T. **Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence.** Journal of Chemical Ecology, New York, v.24, n.1, p.135-149, 1998

JACOBS, A. K.; DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. **Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethefon.** Plant Pathology, v. 48, p. 325-336, 1999.

KAOSIRI, T., ZENTMYER, G.A. & ERWIN, D.C. **Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao.** Canadian Journal of Botany, v.56, p.1730-1738, 1978.

KIEHL, E.J. **Manual de compostagem:** maturação e qualidade do composto. Piracicaba, 1998.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes Orgânicos.** Ed. Agronômica Ceres: São Paulo. 492p. 1985.

KLOTZ L.J., FAWCETT, H.S. **The relative resistance of varieties and species of citrus to *Pythiacystis* gummosis and other bark diseases.** J. of Agricult. Res., v.2, p.415-25, 1930.

KNOESTER, M.; PIETERSE, C. M. J.; BOL, J. F.; VAN LOON, L. **Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 12, p. 720-727, 1999.

KUHN , O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*:** aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p. Piracicaba, 2007

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. **Cross talk between signaling pathway in pathogen defense.** Current Opinion in Plant Biology, London, n. 5, p. 325-331, 2002.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANES, N.; GOES, A. **Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos**. Fitopatologia Brasileira, v. 28, n. 3 p. 113 – 142. 2006.

KUPPER, K.C.; BELLOTTE, J.A.M.; GOES, A. de. **Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum* agente causal da queda prematura dos frutos cítricos**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 31, n. 4, Dec. 2009.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 118p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LIU, S.D., BAKER, R.. **Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani***. Phytopathology, v.70, p.404–412, 1980.

LUZ, W.C. (Ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.363-382, 2006.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto N° 4954, de 14/01/2004. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarlegislacao.do?operacao=viasualizar&id=5473>.

MAY, L.L. **Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora parasitica* Dastur em mudas de citros**. Piracicaba. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo. 1994. 89p.

MAZARO S.M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR, 87p. 2007.

McDONALD, A.E.; GRANT, B.R.; PLAXTON, W.C. **Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant**

phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*, v.24, p.1505-1519, 2001.

McQUILKEN, M.P.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. **Effects of water extracts of a composted manure-straw mixture on the plant pathogen *Botrytis cinerea***. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.10, n.1, p.20-26, 1994.

MEDEIROS, M. B *et al.* **Trofobiose e Proteção de Plantas com Biofertilizantes**. Curso de Capacitação em Agricultura Orgânica. Gov. do Estado de São Paulo-SP, 2004.p.79-87.

MEDEIROS, M. B; D'ANDREA, P.A.. **Biofertilizantes biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças**. In: Hortibio: 1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica. Resumos. Botucatu-SP:Agroecológica, 2002.p.225-232.

MEDEIROS, M.B., LOPES, J.S. **Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola**. *Bahia Agrícola*. V.7, Nov.2006.

MEIRELLES, L., BRACAGIOLI NETO, A., MEIRELLES, A. L.; CONÇALVES, A.; GUAZZELLI, M.J.; **Biofertilizantes enriquecidos: caminho da nutrição e proteção das plantas**. Ipê. Centro de Agricultura Ecológica. CAE Ipê. 1997. 12p.

MESQUITA, E. F. **Biofertilizantes na produção de mamão – qualidade de frutos, composição mineral e fertilidade do solo**. Dissertação (Mestrado em Manejo de solo e água).Centro de Ciências Agrárias, UFPB, Areia, PB. 2005. 73f.

MILLER, F. C. **Composting as a process base don the control of ecologically selective factors**. In: MEETING, F. B. *Soil Microbial Ecology*, v.18, p.515-543, 1992.

MORAES, J.P. **Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas**. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.6, p.261-284, 1998.

MORAES, W.B.C. **Controle alternativo de fitopatógenos**. *Pesquisa*

Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. **Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens***. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 33, p. 603-612, 2001.

OLIVEIRA, L. D. de; MARTINS, A. M. C. M. **Considerações sobre a umidade de 15 atmosferas e a umidade de murcha (método fisiológico), em solos do Nordeste**. Pesq. Agrop. Bras. Rio de Janeiro, v.1, p.91-95, 1986.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.; BARBASSO, D.V.; MACHADO, M.A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros**. Fitopatol. bras. 27(6), p.574-580, 2002.

CARVALHO, M.L.T. **Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasitica***. 2000. 87p. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Unicamp.

BUCK, J.W. **In vitro antagonism of *Botrytis cinerea* by phylloplane yeasts**. Canadian Journal of Botany, v.80, p.885-891, 2002.

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. Anais. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2000. p.255-258.

PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.239-255.

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: Ed. Agronômica Ceres, 1995. V.1. cap. 22, p.417-454.

PELCZAR, R.C. (1981). **Microbiologia**. Vol.II, Editora Mcgram-Hill do Brasil, São Paulo.

PENTEADO, S.R. **Defensivos alternativos e naturais:** para uma agricultura saudável. Campinas, Sílvia Roberto Penteado, 1999. 79 p. *Phytopatology*, St. Paul, v.60, n.7, p. 1120-1127, 1970. TIMMER, L.W.; MENGE, J.A. *Phytophthora* induced diseases. In: WHITESIDE, J.O.; GARSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). *Compendium of citrus diseases*. St. Paul: APS Press, 2000, p. 22-24.

PICCININ, E. **Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghumbicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus spp.*)** contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. Piracicaba, 1995. 107 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PINHEIRO S.; BARRETO, S.B. **MB-4: Agricultura sustentável, trofobiose e biofertilizantes.** Florianópolis: Fundação Juquira candiru, Mibasa, 1996. 273 p.

ROSS, F.A. **Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants.** *Virology*, v.14, p. 340-358, 1961.

ROSSETTI, V. **Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros I -** Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora*. *Arquivos do Instituto Biológico* 18:97-124. 1947.

SANTOS, A. C. V. **Biofertilizantes líquido:** o defensivo agrícola da natureza. 2 ed. Niterói: EMATER – RIO, 1992. 162p.

SANTOS, A.C & AKIBA, F. **Biofertilizantes líquidos:** uso correto na agricultura alternativa. Seropedica: UFRRJ, Impr. Univer.1996. 35p.

SANTOS, A.C.V. **A ação múltipla do biofertilizante líquido como ferti e fitoprotetor em lavouras comerciais.** In: HEIN, M. (org.) *Resumos do 1º Encontro de Processos de Proteção de Plantas: controle ecológico de pragas e doenças*. Botucatu, Agroecológica, 2001. p.91-96.

SANTOS, I. & BETTIOL, W. **Effect of sewage sludge on the rot and seedling damping-off of bean plants caused by *Sclerotium rolfsii*.** *Crop Protection* 22:1093–1097. 2003.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. **A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance**. Biometrics, Washington, v. 30, n. 2, p. 507-512, 1974.

SEIXAS, J; FOLLE, S. & MACHETTI, D. **Construção e funcionamento de biodigestores**. Brasília: Embrapa-DID. (Embrapa – CPAC. Circular Técnica, 4). 1980. 60P.

SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. **Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance**. Nature, v. 385, n.6618, p. 718- 721, 1997.

SILVA, S. R.; PASCHOLATI, S. F. **Saccharomyces cerevisiae protects maize plants, under greenhouse conditions, against Colletotrichum graminicola**. Journal of Plant Disease and Protection, v. 99, p. 159-67, 1992.

SIVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de Phytophthora parasitica e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de Citrus sunki x Poncirus trifoliata à gomose**. 2001. 114 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

SIVIERO, A., BOAVA, L., FURTADO, E.L., MASUDA, Y. MACHADO, M.A. **Avaliação precoce de gomose de Phytophthora em plantas jovens de citros**. Fitopatol. Bras., v.25, p. 425, 2000.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.P.; BARBASSO, D.V.; MACHADO, M.A. **Avaliação de métodos de inoculação de Phytophthora parasitica em plântulas e plantas jovens de citros**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.27, n.6, p. 574-580, 2002.

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

SMITH, G.S., HUTCHISON, D.J. & HENDERSON, T. **Screening sweet orange citrus cultivars for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot.** Proceedings Florida State Horticultural Science 110:64-66. 1987.

SOARES, H.M.; SWITZENBAUM, M.S. **Avaliação de métodos para medir o grau de estabilidade de produtos da compostagem.** Joinville: Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, 1996.

SOBRINHO.A.C. **Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno** Tese (Doutorado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2004

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. S.; NOZAKI, M.H. **Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 2, p. 16-21, 1999.

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

STEVENS, C.; KHAN, V. A.; LU, J. Y.; WILSON, C. L.; PUSEY, P. L.; KABWE, M. K.; IGWEGBE, E. C. K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. **The germicidal and hormetic effects of UV-C light on reducing Brown rot disease and yeast microflora of peaches.** Crop Protection, v. 17, n. 1, p. 75 - 84, 1998.

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

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. **Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens.** Biochimie, v.75, p.687-706, 1993.

TAUK, S. M. (1990). **Biodegradação de resíduos orgânicos no solo.** Revista Brasileira de Geociências. 20:299-301.

TEIXEIRA, D.A., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., FERREIRA, E.M. **Evidências de Indução de Resistência Sistêmica a Ferrugem do Eucalipto mediada por Rizobacterias Promotoras de Crescimento de Plantas.** (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2004.

TEIXEIRA, J.E de C. **Genes de defesa de *Citrus Sunki* e *Poncirus trifoliata*. Expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora nicotidae*.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005. 105p.

TIMMER, L.W. & MENGE, J.A. ***Phytophthora* – induced diseases.** In: Whiteside, J.O. Garnsey, S.M. & Timmer, L.W. (Eds). Compendium of Citrus diseases. Saint Paul. American Phytopathological Society Press. 1988. pp.22-24.

TON, J.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. **Differential effectiveness of salicylate-** dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. *Molecular and Plant Microbe Interaction*, Sant Paul, v.15, p. 27-34, 2002.

TRATCH, R.; BETTIOL, W. **Efeito de biofertilizante sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, p.1131-1139, 1997.

TUZUN, S. **The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants.** *European Journal of Plant Pathology*, v.107, n.1, p.39-50, 2001.

TUZUN, S., RAO, N.M., VOGELI, U., SCHARDL, C.L. & KÚC, J. **Induced systemic resistance to blue mold:** early induction and accumulation of β -1,3-glucanase, chitinase, and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. *Physiology and Biochemistry* v.79; p.979-983, 1989.

VAN ANDEL, O.M. **Amino acids and plant disease.** *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.4, p.349-368. 1996

VAN BRUGGEN, A.H.C. 1995. **Plant-disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming systems.** *Plant Disease* 79: 976–984.

VANTINI, J.S. **Ativação das vias relacionadas a resistência de *Citrus sinensis* em resposta a interação com a bactéria *Xanthomonas axonopodis*.** 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VESSEY, J. K. **Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.** *Plant and Soil*, v. 255, p. 571-586, 2003.

VICENTE, V. A. (2000). **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose.** Tese de doutoramento. ESALQ, São Paulo, SP, Brasil, 181 p.

WHITESIDE, J.O. **Zoospore-inoculation techniques for determining the relative susceptibility of citrus rootstocks to foot rot.** *Plant Disease Reporter* 58:713-717. 1974.

WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M., TIMMER, L.W. **Compendium of citrus diseases.** APS Press. St. Paul, 1996. 80p.

WITTEWER C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. **Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.** *Biotechniques*. 1997;22:130–1

WITTEWER, C. T. **The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control.** *BioTechniques Natick*, v. 22, n. 1, p. 176-181, 1997.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. **Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.** *Scientia Agrícola*, v. 55, p.138-143, 1998.

ZENTMEYER, G.A.; ERWIN, D.C. **Development and reproduction of *Phytophthora***

ZUCCHI, T.D. Potencial de linhagens de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* e *Streptomyces* sp. No controle de fungos aflatoxigênicos em amendoim (*Arachis hypogaea*) e aspectos de biossegurança. Tese de Doutorado. São Paulo. Universidade de São Paulo. 2007.