



Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*)

Harllen S.A. Silva¹, César R.F. Terrasan², João P.L. Tozzi², Itamar S. Melo² & Wagner Bettiol²

¹Instituto Biológico, Cx. Postal 70, 13001-970, Campinas, SP, Brasil; ²Embrapa Meio Ambiente, Cx. Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

Autor para correspondência: Harllen S.A. Silva, e-mail: hasalves@hotmail.com

RESUMO

Mudas de cafeeiro foram tratadas com quatro isolados de bactérias endofíticas de cafeeiro (3F - *Brevibacillus choshinensis*, 109G - *Bacillus megaterium*, 115G - *Microbacterium testaceum* e 119G - *Cedecea davisae*), pré-selecionados como agentes de biocontrole da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), para avaliar os seus efeitos sobre a produção de enzimas da planta relacionadas com a indução de resistência. As endófitas foram aplicadas via suspensão aquosa no filopiano das plantas, sendo o patógeno inoculado três dias depois. Sete dias após quantificou-se a atividade das enzimas por espectrofotometria, e decorridos mais 18 dias avaliou-se o número de pústulas de ferrugem por folha. Houve aumento significativo da atividade de peroxidase em plantas tratadas com as endófitas *B. choshinensis* e *C. davisae*. Não se detectaram aumentos nos níveis de fenilalanina amônio-liase e lipoxigenase, mesmo para os demais isolados. A inoculação com *C. davisae* proporcionou as menores médias de pústulas por folha, e possivelmente possui outros mecanismos de controle, além da indução de enzimas de resistência. A detecção de peroxidase em folhas onde tanto o patógeno quanto as endófitas estavam ausentes, bem como a separação espacial entre eles fornece forte evidência de ter havido indução sistêmica da resistência.

Palavras-chave: controle biológico, resistência sistêmica induzida, *Coffea*.

ABSTRACT

Endophytic bacteria inducing enzymes correlated to the control of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*)

Four endophytic bacteria strains (3F - *Brevibacillus choshinensis*, 109G - *Bacillus megaterium*, 115G - *Microbacterium testaceum*, and 119G - *Cedecea davisae*), isolated from healthy coffee plants, and screened previously as biocontrol agents of coffee leaf rust, were assessed for their ability in producing enzymes correlated to the control of the causal agent *Hemileia vastatrix*. Cell suspensions of these strains were sprayed on leaves three days before the inoculation of the pathogen. The enzymatic activities and the number of lesion per leaf were evaluated after seven and 18 days, respectively, after inoculation. The results showed that the peroxidase activity was increased in plants treated with *B. choshinensis* and *C. davisae* strains. On the other hand, no increase in phenylalanine ammonia-lyase and lipoxigenase activities was detected. The strains *C. davisae* reduced the numbers of lesions per leaf, suggesting in this case, that beside resistance induction, others mechanisms of action probably is involved in the process. The detection of peroxidase in leaves free of the pathogen and endophytes, as well as, the spatial separations between them, furnish strong evidence of systemic resistance induction.

Keywords: biological control, induced systemic resistance, *Coffea*.

INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix* Berk et Br., incide em plantações de café em todas as regiões do mundo, sendo a principal doença da cultura em nível mundial (Zambolim *et al.*, 2002). A doença compromete, em alguns casos, em mais de 50 %, a produção do cafeeiro (Gree, 1993; Zambolim *et al.*, 1997). O controle da ferrugem é baseado principalmente em aplicações de fungicidas protetores e sistêmicos, que são eficientes a curto ou médio prazo até o surgimento de raças resistentes (Pereira, 1995; Zambolim *et al.*, 1997).

Uma alternativa de menor impacto ambiental para o controle da ferrugem é o uso de bactérias endofíticas. A capacidade destes microrganismos de colonizarem os tecidos internos das plantas lhes confere uma vantagem

ecológica sobre os microrganismos que colonizam as plantas epifiticamente, por exemplo, no sentido de que são menos expostos às adversidades do ambiente. Além disso, por ocuparem um habitat semelhante àqueles ocupados por patógenos, os microrganismos endofíticos apresentam potencial para o controle biológico (Hallmann *et al.*, 1997).

Um dos modos de ação relacionados a bactérias endofíticas é a ativação dos mecanismos de defesa das plantas (van Loon *et al.*, 1998), conhecida como resistência sistêmica induzida (RSI). Benhamou *et al.* (1996) observaram que nas raízes de plântulas de ervilha originadas de sementes microbiolizadas com o endófito *Bacillus pumilus* Meyer & Gottheil (strain SE34) o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* Snyder & Hansen ficou restrito à epiderme e ao córtex externo. Por outro lado, nas não microbiolizadas o

fungo cresceu abundantemente nos tecidos, inclusive no vascular. Nas raízes microbiolizadas com o endófito foram observadas reações do hospedeiro tais como, aumento da espessura das paredes celulares de células epidérmicas e corticais, assim como aposições próximas aos sítios de infecção, essas ricas em calose e compostos fenólicos.

Diversas enzimas estão relacionadas com a resistência induzida, como peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, lipoxigenase, β -1,3-glucanase e quitinase (Ye *et al.*, 1990; Koch *et al.*, 1992; Schneider & Ullrich, 1994; van Loon, 1997). Quitinases e β -1,3-glucanases (proteínas PR - pathogenesis-related) têm atividade antifúngica sinérgica e estão relacionadas à rota de SAR, “systemic acquired resistance”, que tem o ácido salicílico como molécula sinalizadora, e é desencadeada por patógenos necrotizantes e indutores químicos (van Loon *et al.*, 1994).

De maneira geral, a atuação dessas enzimas está relacionada com a atividade antimicrobiana direta na presença de peróxidos de hidrogênio e compostos fenólicos, e na lignificação celular (Ride, 1975; Klessig & Malamy, 1994). A lignificação pode contribuir para a resistência de diferentes maneiras, embora pouco se saiba sobre seu papel na resistência induzida. Em primeiro lugar podem incorporar lignina na parede celular da planta, fazendo-a mais resistente à degradação pelo arsenal enzimático do patógeno ou à penetração mecânica. Células lignificadas também podem constituir uma barreira prevenindo o livre movimento de nutrientes, interferindo na nutrição do patógeno. Precursores de lignina podem exercer efeito tóxico sobre o patógeno, ou podem se ligar à parede celular fúngica, fazendo-a mais rígida e impermeável (Hammerschmidt *et al.*, 1982).

O presente trabalho teve por objetivos verificar em mudas de café tratadas com bactérias endófitas, previamente selecionadas como promissores agentes de biocontrole de *H. vastatrix*, o aumento da atividade de peroxidase, fenilalanina amônia-liase e lipoxigenase, bem como uma possível relação com a redução da severidade da ferrugem.

MATERIAL E MÉTODOS

Aplicação das bactérias endófitas e inoculação com *Hemileia vastatrix*

Os testes foram realizados com quatro bactérias endófitas de café, identificadas pelos códigos 3F [*Brevibacillus choshinensis* (Takagi *et al.*) Shida *et al.*], 109G [*Bacillus megaterium* de Bary], 115G [*Microbacterium testaceum* (Komagata & Iizuka) Takeuchi & Hatano] e 119G [*Cedecea davisae* Grimont *et al.*], provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, e selecionadas em ensaios anteriores como bons agentes de controle biológico da ferrugem (Bettiol *et al.*, 2004). As bactérias foram cultivadas em meio triptona de soja ágar (TSA) (7,5 g NaCl; 2,5 g Peptona de Soja; 7,5 g Triptona, 1000 mL Água Destilada), a 28 °C. Os isolados foram aplicados às plantas após 24 horas de crescimento no meio.

Suspensões aquosas das bactérias endófitas (10^8 ufc mL⁻¹) foram pulverizadas manualmente em duas folhas, sendo uma do segundo e outra do terceiro pares de folhas, contados do ápice para a base, de cada muda de café e as plantas foram mantidas em câmara úmida por 12 horas a 22 °C, quando foram transportadas para um telado. Após 72 h, as outras duas folhas dos mesmos pares de folhas foram inoculadas com uma suspensão aquosa de uredíniosporos (2,0 mg mL⁻¹) de *H. vastatrix*, coletados de folhas lesionadas de café minutos antes da inoculação das mudas com auxílio de um coletor de esporos acoplado a um compressor de 1,0 HP. A inoculação foi realizada por meio de um atomizador acoplado ao mesmo compressor. As plantas foram mantidas em câmara úmida (UR 100 %), no escuro, por 24 h a 22 °C, e a seguir transferidas para o telado.

Aos 25 dias após a inoculação procedeu-se às contagens do número de lesões nas folhas inoculadas e calculou-se o número médio de pústulas por folha por tratamento. Utilizaram-se plantas com oito pares de folhas. Plantas tratadas com água e inoculadas compuseram o controle. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado com seis repetições (vasos com duas plantas) para cada tratamento. As médias dos números de lesões por folha dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

Ensaio de detecção da atividade enzimática

A detecção enzimática deu-se via extrato foliar. Para isso, sete dias após a inoculação, folhas de café do primeiro e quinto pares de folhas das duas plantas que compuseram cada repetição, do ápice para a base, foram coletadas para preparo do extrato. As folhas foram armazenadas sob nitrogênio líquido, e acondicionadas a -80 °C para posterior preparo do extrato vegetal, segundo Lanna *et al.* (1996).

As amostras de tecido vegetal, cerca de 1,0 g de peso fresco, foram trituradas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi macerado por 30 segundos em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, adicionado de polivinilpirrolidona 1 % (p v⁻¹) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM (tampão de extração), com posterior centrifugação em 20.000 g por 25 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para as determinações das atividades de lipoxigenase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase, e para as dosagens de proteína total, mantendo-os em banho de gelo. Seis repetições (extratos) por tratamento foram analisadas para todas as enzimas, e as médias comparadas pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

O teste de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras. Para tanto, foram adicionados a cada 0,1 mL de amostra, 1,0 mL do reagente de Bradford, e realizada a leitura de absorbância a 595 nm, após dois minutos de reação. A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes μ g de albumina de soro bovino (BSA) por 0,1 mL de amostra (μ g proteína 0,1 mL⁻¹) foi

determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de BSA variando de 0 a 100 µg 0,1 mL⁻¹.

O aumento da atividade de lipoxigenase (LOX) foi detectado segundo metodologia descrita por Axelrod *et al.* (1981), através do aumento da absorbância a 234 nm pela formação de um sistema de ligações duplas conjugadas no hidroperóxido formado, utilizando ácido linoléico (linoleato de sódio 10 mM, pH 9,0) como substrato. A mistura de reação consistiu de 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 20 µL do substrato e 10 µL do extrato vegetal. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro entre 30 s e 10 min e 30 s da reação, a temperatura ambiente (25 °C). A velocidade de formação dos produtos (*V*) foi calculada pela equação $V = \Delta A_{234} / \epsilon \cdot I \cdot \Delta t$ utilizando o coeficiente de extinção molar (ϵ) dos hidroperóxidos para o ácido linoléico de 25.000 M⁻¹ cm⁻¹ (Axelrod *et al.*, 1981), o caminho ótico (*I*) de 1,0 cm e o tempo de reação (Δt) de 10 min. Os resultados finais de atividade enzimática foram expressos em µmol de produto formado min⁻¹ mg proteína⁻¹.

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C através do método espectrofotométrico direto (Hammerschmidt *et al.*, 1982). A mistura de reação consistiu de 1019 µL de uma solução contendo guaiacol, peróxido de hidrogênio e tampão fosfato de sódio (125 µL guaiacol + 153 µL peróxido de hidrogênio em 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0) e 1 µL do extrato vegetal. A reação foi incubada em banho maria e foram realizadas leituras de absorbância a 30 s e depois em 15 min e 30 s. Os resultados foram expressos em Δ unidades de absorbância min⁻¹ mg proteína⁻¹.

A atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) foi determinada de acordo com método descrito por Pascholati *et al.* (1986) com pequenas modificações, por medida espectrofotométrica direta, pela conversão de L-fenilalanina para ácido cinâmico a 290 nm a 37 °C, no intervalo entre 30 s e 5 min e 30 s após o início da reação. A mistura da reação continha 10 µL do extrato foliar e 1000 µL de uma solução 0,2 % de L-fenilalanina. A cubeta referência continha 10 µL de tampão de extração e 1000 µL de uma solução 0,2 % de L-fenilalanina. As variações (Δ) das leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para ácido cinâmico e os resultados foram expressos como atividade específica: nmol ácido cinâmico min⁻¹ mg proteína⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as bactérias endófitas testadas apenas o isolado 119G proporcionou valores significativos de redução da severidade da ferrugem, apresentando níveis de controle acima de 60 % nas mudas tratadas com esta endófito (Tabela 1). Cabe ressaltar que foi mantido o intervalo ótimo de 72 horas entre a aplicação das bactérias endofíticas e a inoculação do patógeno, conforme estabelecido por Bettiol *et al.* (2004) em testes primários de seleção dos endófitos. Embora haja uma considerável diferença entre o teste inicial de seleção, feito em discos de folhas, e o ensaio realizado

neste trabalho, a manutenção do intervalo de aplicação certamente contribuiu para os resultados obtidos.

Este intervalo longo garantiu aos antagonistas uma vantagem de adaptação, pois houve tempo para colonização epifítica, bem como dos sítios de infecção (Hallmann *et al.*, 1997). Uma vez na folha pré-colonizada com a bactéria endofítica, os uredíniosporos de *H. vastatrix* podem ter tido, em primeiro lugar, sua germinação inibida por prováveis substâncias antimicrobianas secretadas com propriedades de inibir sua germinação (Shiomi *et al.*, 2006). Posteriormente, se houvesse germinação, o fungo encontraria a competição por espaço e sítios de infecção, no caso os estômatos (Levy & Carmeli, 1995; Godoy *et al.*, 1997; Hallmann *et al.*, 1997).

Embora tenha sido menos eficaz do que a bactéria endofítica 3F nos testes de seleção em discos de folhas (Bettiol *et al.*, 2004), o isolado 119G mostrou-se como o mais eficaz no teste em mudas, o que se verificou pelo menor número de lesões por folha. Este resultado pode ser explicado considerando as diferenças existentes entre os testes realizados, no que se refere às condições gerais de ambiente em que os endófitos atuaram. Nos testes em discos de folhas, as variáveis climáticas, como luz, temperatura e umidade são controladas, o que facilita o estabelecimento dos antagonistas. No ensaio com as mudas, a exposição às variações de temperatura e umidade, principalmente, foi um desafio a mais para as bactérias endofíticas colonizarem o filoplano e, possivelmente, os tecidos internos.

Os maiores níveis de atividade enzimática foram detectados em mudas tratadas com a bactéria endófito 3F (Tabela 1), com valores acima do controle e dos demais endófitos testados, embora não houvesse diferença significativa para lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase. Já para peroxidase, a diferença nos níveis da enzima foi de quase 100 % comparado ao controle, nas plantas tratadas com as endófitas 3F e 119G.

A enzima peroxidase geralmente está associada com o aumento de lignificação das paredes celulares (Hammerschmidt *et al.*, 1982). Segundo Birecka *et al.* (1975), a presença extracelular de peroxidase estimulada durante o ataque de patógenos e/ou indução de resistência, e sua afinidade por substratos envolvidos na lignificação, bem como sua capacidade de formar peróxidos de hidrogênio, a tornam envolvida com processos de formação de barreiras físicas que limitam o crescimento de patógenos. Van Loon & Callow (1983) postularam que os produtos da peroxidase na presença de um hidrogênio doador podem ter efeito antimicrobiano e antiviral.

Segundo Stenzel *et al.* (1985), a resistência induzida afeta fungos biotróficos ao nível celular, ou seja, não afeta a germinação dos uredíniosporos, no caso das ferrugens, e a formação do apressório. Já a formação do haustório primário e o número de colônias subsequentes, em plantas expressando algum tipo de resistência é menor. Além do efeito tóxico dos produtos da peroxidase sobre o patógeno, as alterações celulares decorrentes do evento da lignificação, desencadeado pela enzima, podem inibir os processos de

TABELA 1 - Severidade da ferrugem do cafeeiro e atividade de lipoxigenase (LOX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e peroxidase em mudas tratadas com bactérias endófitas

Tratamento	Número médio de lesões por folha	LOX ¹	PAL ²	Peroxidase ²
119G	2,1 a*	0,13 a	35,0 a	89,0 a
3F	4,2 b	0,18 a	38,0 a	96,0 a
115G	4,8 b	0,14 a	36,0 a	58,0 b
109G	4,9 b	0,15 a	29,0 a	54,0 b
Controle	5,5 b	0,13 a	32,0 a	50,0 b
CV⁴	15.3	6.2	5.2	5.9

* Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

¹ Resultado expresso em μmol de produto formado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹;

² Resultado expresso Δ unidades de absorvância $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹;

³ Resultado expresso em nmol ácido cinâmico $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹;

⁴ Coeficiente de variação (%).

transporte entre membranas, tanto das células vegetais quanto do agente causal. Isso impede que os processos de nutrição do fungo ocorram normalmente limitando o seu crescimento e, conseqüentemente, seus danos à planta.

Nesse trabalho não se estudou a presença de β -1,3-glucanase e quitinase (PRPs - “pathogenesis related proteins”) que também são marcadoras de resistência induzida. Segundo Sticher *et al.* (1997), proteínas PR são mecanismos de defesa relacionados à SAR, envolvendo a rota do ácido salicílico como molécula sinalizadora, e desencadeados por exposição prévia da planta a isolados fitopatogênicos avirulentos, moléculas químicas, tratamentos físicos ou ataque de insetos.

Diferentemente, a aplicação de microrganismos saprófitas, sejam eles rizosféricos, epífitas ou endófitas, desencadeia o processo de resistência sistêmica induzida (ISR – induced systemic resistance) via moléculas de jasminatos e etileno, com aumento da atividade de peroxidase, lipoxigenase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase, e em raros casos se confirma a produção de proteínas PR (van Loon, 1997). Com base nisso é que se procurou detectar neste trabalho apenas as enzimas ligadas a ISR.

No trabalho de Guzzo e Martins (1996) verificou-se que uma formulação comercial à base de *Bacillus thuringiensis*, Berliner induziu aumento da atividade de β -1,3-glucanase e quitinase em cafeeiro, contra *H. vastatrix*, de forma sistêmica. Porém, os autores não discutem a possibilidade de algum componente da formulação ter atuado como um indutor químico de resistência, ativando a rota de SAR. Os endófitas 3F e 119G provavelmente desencadearam a rota de ISR, mediada por jasminatos e etileno, uma vez que se detectou o aumento da atividade de peroxidase, como foi demonstrado por vários trabalhos referentes à indução de resistência (Tuzun & Kloepper, 1995; Sticher *et al.*, 1997; van Loon, 1997; Pieterse *et al.*, 1998; van Loon *et al.*, 1998; Pieterse & van Loon, 1999). Contudo, não se tem a intenção aqui de excluir a possibilidade dos isolados

testados induzirem o aumento das PR proteínas, via rota de SAR, uma vez que fenômenos biológicos geralmente não obedecem a regras fixas. É o caso de se estudar e comprovar essa hipótese.

A escolha de uma data fixa, sete dias após a inoculação, para a coleta do material vegetal e a análise da presença das enzimas pode ter contribuído para a não detecção do aumento da atividade de PAL e lipoxigenase, e ter favorecido a observação da atividade da peroxidase. Bhattacharya & Ward (1988) reportam que na fase de estabelecimento de um patógeno nos tecidos do hospedeiro, PAL geralmente aumenta sua atividade. Ainda, segundo Podile & Laxmi (1998), os maiores níveis de atividade desta enzima acontecem em torno de 24 horas após o início da infecção. Deste modo, não se descarta a possibilidade de ter havido picos de atividade de PAL nos dois primeiros dias após a inoculação. Já o aumento da atividade de peroxidase, geralmente está associado com estádios mais tardios do processo de infecção (Hammerschmidt *et al.*, 1982). Essa linha de raciocínio pode explicar o fato do isolado 119G ter reduzido a severidade da ferrugem significativamente. Aventa-se a hipótese da mesma ter induzido a atividade de outras enzimas de defesa, além da peroxidase, diferentemente da endófitas 3F, que mesmo proporcionando aumento nos níveis dessa enzima não contribuiu para redução da severidade da ferrugem.

Os resultados de atividade de peroxidase do presente trabalho estão de acordo com o Podile & Laxmi (1998), que verificaram aumento nos níveis da enzima em plantas de ervilhaca tratadas com *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, com ótimo aos sete dias após inoculá-las com *Fusarium udum* Butler. Assim, estudos sobre a cinética da atividade das enzimas devem ser conduzidos de modo a cobrir todas as possibilidades de detecção do ponto ótimo de atividade, uma vez que o ápice de atividade para uma enzima pode ocorrer em um momento diferente do de outra (van Loon *et al.*, 1998).

Steiner & Schönbeck (1995) propuseram sete critérios básicos para se investigar se a resistência exibida por uma planta foi realmente induzida ou ocorreu devido a outros fatores, que, de alguma forma, contribuíram para reduzir a incidência e, ou, severidade da doença. Três desses critérios podem ser verificados no presente trabalho.

O primeiro diz respeito à necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao agente indutor, e a expressão da resistência. O intervalo de 72 horas entre a aplicação dos isolados endofíticos e a inoculação do patógeno, conforme recomendaram Bettiol *et al.* (2004) para ótimo desempenho dos isolados pode agora ser entendido, julgando-se a possibilidade da resistência sistêmica induzida ter acontecido nos testes iniciais de seleção dos agentes de biocontrole.

Outro critério leva em consideração o fato da sistemicidade da resposta de resistência gerada nas plantas tratadas com as endófitas 3F e I19G. A detecção das enzimas se deu em folhas onde tanto as bactérias antagonistas quanto o patógeno não estavam presentes, já que as análises foram realizadas nos extratos das folhas do primeiro e quinto pares de folhas, enquanto os organismos foram aplicados no segundo e terceiros pares de folhas.

Por último, a separação espacial que existiu entre as bactérias antagonistas e o patógeno, uma vez que foram aplicados em folhas do mesmo par, porém distintas, e culminou com a redução dos sintomas da ferrugem, descarta a possibilidade de ter havido ação direta das endófitas sobre *H. vastatrix*. Isso leva a crer que de fato as bactérias endofíticas 3F e I19G possam estar induzindo resistência sistêmica, uma vez que o caráter sistêmico é uma característica inerente a este fenômeno biológico, além do aumento da atividade das enzimas verificadas neste trabalho, que normalmente são utilizadas como marcadores de resistência induzida (Sticher *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998; Tuzun, 2001).

Não há estudos conclusivos a respeito de indução de resistência sistêmica em órgãos vegetais destacados. Logo, o bom desempenho da endófito I19G reduzindo a severidade da ferrugem neste teste, em comparação com os testes preliminares de seleção em discos de folhas (Bettiol *et al.*, 2004), pode estar associado ao fato de que este isolado possua mais de um mecanismo de ação. Um direto, que se manifestou nos testes em discos de folhas, podendo ser a competição por espaço e nutriente ou a inibição da germinação dos uredíniosporos e, o outro, indireto, sob a forma da indução da resistência. Pode acontecer desta endófito ter seu desempenho como biocontrolador da ferrugem aumentado, caso seja aplicada em toda a planta, atuando direta e indiretamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S, (1981) Lipoxygenase from soybean. *Methods Enzymology* 71:441-451.

Benhamou N, Kloepper JW, Quadt Hallman A, Tuzun S (1996)

Induction of defense-related ultra-structural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology* 112:919-929.

Bettiol W, Silva HSA, Tozzi JPL, Terrasan CRF, Melo IS (2004) Seleção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro em discos de folhas. *Fitopatologia Brasileira* 29 (Supl.):223-224.

Bhattacharya MK, Ward EWB (1988) Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean hypocotyls and leaves following infection with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Canadian Journal of Botany* 66:18-23.

Birecka H, Catalfamo JL, Urgan P (1975) Cell wall and protoplast isoperoxidases in tobacco plants in relation to mechanical injury and infection with tobacco mosaic virus. *Plant Physiology* 55: 611-619.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Godoy CV, Bergamin Filho A, Salgado CL (1997) Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati H (Ed.) Manual de Fitopatologia: Doenças e seu controle. V. 2. *Agrônômica Ceres*. São Paulo SP. pp. 184-200.

Gree G (1993) Epidemiology of coffee leaf rust in the Eastern Highlands. *Newsletter - Coffee - Research - Institute* 2:16-20.

Guzzo SD, Martins EMF (1996) Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Phytopathology* 144:449-454.

Hallmann J, Quadt-Hallmann, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43:895-914.

Hammerschmidt R, Nuckles E, Kuc J (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiology Plant Pathology* 20:73-80.

Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26:1439-1458.

Koch E, Meier BM, Eiben HG, Slusarenko A (1992) A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiology* 99:571-576.

Lanna AC, Oliveira MGA, Barros EG, Moreira MA (1996) Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pool from normal soybean genotypes and from a line devoid of seed lipoxygenases. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8:87-92.

Levy E, Carmeli S (1995) Biological control of plant pathology by antibiotic-producing bacteria. In: Levy E, Carmeli S (Eds.) Allelopathy, organisms, process and applications. American Chemical Society. Washington DC. pp. 300-309.

Pascholati SF, Nicholson RL, Butler LG (1986) Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *Journal of Phytopathology* 115:165-172.

Pereira AA (1995) Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. Tese Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

- Pieterse CMJ, Van Loon LC (1999) Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, Van Loon LC (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10:1571-1580.
- Podile AR, Laxmi VDV (1998) Seed factorization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia-lyase and reduces the incidence of Filarial wilt in pigeon pea. *Journal of Phytopathology* 146:255-259.
- Ride JP (1975) Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiology Plant Pathology* 5:125-134.
- Schneider S, Ullrich WR (1994) Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiology Molecular Plant Pathology* 43:57-67.
- Shiomi HF, Silva HSA, Melo IS, Nunes F, Bettiol W (2006) Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* 63:32-39.
- Steiner U, Schönbeck F (1995) Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt R, Kúc J (Eds.) *Induced Resistance to Disease in Plants*. Kluwer. Dordrecht. pp. 86-110.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270.
- Stenzel K., Steiner U., Schönbeck F. (1985) Effect of induced resistance on the efficiency of powdery mildew haustoria in wheat and barley. *Physiological Plant pathology* 27: 357-367.
- Tuzun S (2001) The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107:85-93.
- Tuzun S, Kloepper J (1995) Practical application and implementation of induced resistance. In: Hammerschmidt R, Kúc J (Eds.) *Induced resistance to disease in plants*. Kluwer. Dordrecht. pp. 152-168.
- Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103:753-765.
- Van Loon LC, Bakker Pahn, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 12:245-264.
- Van Loon LC, Callow JA (1983) Transcription and translation in the diseases plant. In: Callow JA (Ed.) *Biochemical Plant Pathology*. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 385-414.
- Ye XS, Pan SQ, Kuc J (1990) Association of pathogenesis-related proteins and activities of peroxidase, β -1,3-glucanase and chitinase with systemic induced resistance to blue mould of tobacco but not to systemic tobacco mosaic virus. *Physiology Molecular Plant Pathology* 36: 523-531.
- Zambolim L, Vale FXR, Costa H, Pereira AA, Chaves GM (2002) Epidemiologia e controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). In: Zambolim L (Ed.) *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*. Viçosa, Minas Gerais. Suprema Gráfica e Editora.. pp. 369-433.
- Zambolim L, Vale FXR, Pereira AA, Chaves GM (1997) Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: Vale FXR, Zambolim L (Eds.) *Controle de doenças de plantas*. Viçosa MG. Suprema Gráfica e Editora. pp. 83-180.

Recebido 11 Abril 2007 - Aceito 25 Fevereiro 2008 - TPP 7034
Editor Associado: Reginaldo S. Romeiro