

POTENCIAL ENZIMÁTICO DOS MICRO-ORGANISMOS

Christiana de Fátima Bruce da Silva

Introdução

Nos agroecossistemas tropicais, cuja interferência do homem é marcante, a interação sinérgica entre as plantas e os micro-organismos é fundamental para que ocorra o equilíbrio do sistema, resultando em incrementos na produtividade dos cultivos agrícolas (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Dentro desses ecossistemas, existem micro-organismos que participam das diversas etapas cruciais do sistema solo-água-planta, destacando-se os fungos e as bactérias como os principais responsáveis pelos processos biológicos vitais (Figura 1) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Os micro-organismos são responsáveis pela produção de diversos compostos interessantes, como, por exemplo, as enzimas que participam de eventos como a ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, biodegradação, biorremediação, bioestimulação, indução de resistência e controle biológico de enfermidades (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Os micro-organismos podem habitar os solos, crescendo por entre os agregados, bem como sobrevivendo com suas estruturas de resistência (clamidósporos, esclerócios ou endósporos). Podem ainda ocupar nichos ecológicos os mais diversos, como a madeira, realizando a sua decompo-

sição; a rizosfera (área de atuação das raízes das plantas) e o rizoplaneo (superfície das raízes), utilizando os exsudatos secretados pelas raízes. Além disso, os micro-organismos podem também localizar-se no interior das plantas, estes são conhecidos como endofíticos (MACCHERONI JÚNIOR; ARAÚJO; LIMA, 2004).

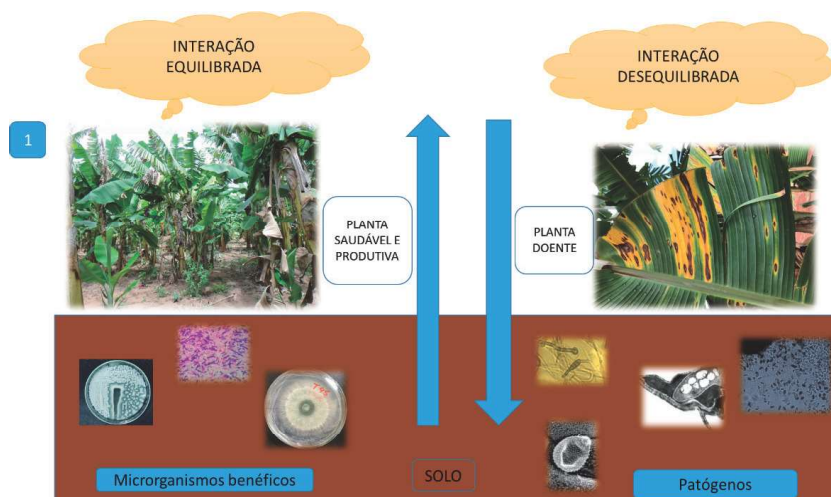
Quando ocorre um equilíbrio no agroecossistema, constata-se a presença de relações benéficas entre os dois atores essenciais nesse sistema: as plantas e os micro-organismos. Dentro desse contexto, podem-se citar as associações mutualísticas que ocorrem entre os fungos endofíticos e as plantas. Esses micro-organismos associam-se com as plantas, obtendo nutrientes e proteção e, ao mesmo tempo, podem proporcionar tolerância às plantas, em ambientes com estresses biótico e abiótico. Por exemplo, os fungos endofíticos competem com os patógenos, por nutrientes e espaço, e podem também produzir enzimas hidrolíticas, suprimindo o patógeno (MACCHERONI JÚNIOR; ARAÚJO; LIMA, 2004). Outros exemplos importantes são os micro-organismos fixadores de nitrogênio atmosférico e os fungos micorrízicos, que proporcionam benefícios às plantas (FIGUEIREDO; BURITY; STAMFORD, 2008; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Entretanto, devido ao cultivo intensivo das culturas agrícolas, aliado ao manejo inadequado do sistema solo-água-planta, vêm se constatando altas prevalências de enfermidades. Dessa forma, o equilíbrio biológico é “quebrado”, e a presença de micro-organismos fitopatogênicos é marcante. Dentre os patógenos que ocasionam doenças importantes nas culturas agrícolas, destacam-se os fungos, bactérias, nematoides e vírus (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIM, 1995; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Alguns fitopatógenos, durante o seu processo de patogênese, são importantes produtores de compostos, apresentando papel preponderante nas infecções. Dentre os compostos, destacam-se as enzimas produzidas pelas diferentes espécies de micro-organismos, tais como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (LIAO; HUNG; CHATTERJEE, 1988; PAYASI; SANWAL; SANWAL, 2009).

Finalmente, para conduzir o manejo sustentável das enfermidades, é imprescindível a utilização dos micro-organismos benéficos,

também conhecidos como antagonistas. Esses micro-organismos utilizam diferentes mecanismos de ação para controlar os patógenos. Nesse cenário, destacam-se as espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* como agentes de controle biológico (BENÍTEZ *et al.*, 2004; HARMAN *et al.*, 2004; PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; VICENTE, 2011; PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014; MARCANO *et al.*, 2016). Esses micro-organismos, além de realizarem o controle biológico de doenças, podem também promover o crescimento das plantas (MORTUZA; ILAG, 1999; GLICK, 2012). Nesse processo de biocontrole de patógenos e bioestimulação das plantas, espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* também são eficientes em produzir enzimas (HARMAN, 2006; PAYASI; SANWAL; SANWAL, 2009). Portanto, a seguir, serão mais bem detalhados os principais eventos, na interação planta – micro-organismo, em que a presença das enzimas é marcante: a patogênese, a promoção do crescimento das plantas e o controle biológico de doenças de plantas (Figura 1).

Figura 1 – Interação entre plantas e micro-organismos nos solos



Fonte: fotos de Christiana Bruce.

(1) Na interação equilibrada, observa-se a presença de micro-organismos benéficos, e as plantas alcançam a produtividade desejada; (2) Em condições de desequilíbrio biológico, a prevalência de patógenos é marcante, resultando na expressão de doenças.

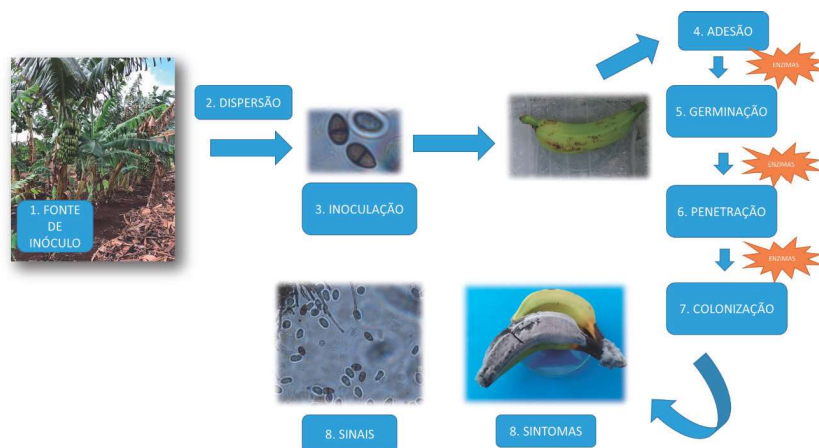
Enzimas e micro-organismos

Para os diferentes micro-organismos e suas interações com as plantas, as enzimas têm apresentado papel marcante. Pode-se destacar a importância das enzimas, para os eventos da **patogênese**, que vão culminar com a expressão de doenças. Nesse caso, os micro-organismos são fitopatogênicos e produzem/secretam as enzimas, nos nichos de infecção, provocando as alterações fisiológicas nas plantas. Existem também casos em que os micro-organismos são benéficos, produzindo/secretando as enzimas importantes para o controle de fitopatógenos (**controle biológico**) ou para a **promoção de crescimento** das plantas. Adicionalmente, as plantas também podem contra-atacar e produzir enzimas para **resistir** aos patógenos ou **tolerar** estes. Portanto, a seguir, serão mais bem detalhados esses eventos e será mostrado como ocorre o envolvimento das enzimas em cada uma dessas etapas essenciais da interação plantas – micro-organismos.

Enzimas e a patogênese

No processo de patogênese, uma série de eventos no ciclo das relações patógeno – hospedeiro ocorre para que culmine com a expressão dos sintomas de doenças (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Em muitos desses eventos (adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução), a participação das enzimas tem sido característica marcante, proporcionando alterações fisiológicas nas plantas (Figura 2). Entre as enzimas de importância na patogênese, podemos destacar as poligalacturonases, cutinases, proteases, pectinases e celulasas (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974; DE LORENZO; D’OVIDIO; CERVONE, 2001; TOTH *et al.*, 2003; NITURE, 2008; PHAN; HERBST; MONTAG, 2011; PFEILMEIER; CALY; MALONE, 2016). Muitos fitopatógenos produzem essas enzimas e as secretam, principalmente, pelo sistema de secreção tipo II (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012).

Figura 2 – Ciclo das relações patógeno – hospedeiro de fungos fitopatogênicos



Fonte: fotos de Christiana Bruce.

O evento tem início com a presença da (1) fonte de inóculo (conídios do patógeno) em restos de cultura no campo, (2) dispersão do inóculo, (3) inoculação em hospedeiro sadio, (4) adesão, (5) germinação, (6) penetração, (7) colonização e (8) expressão da doença (presença de sintomas e sinais). A participação das enzimas nas fases de adesão, germinação, penetração e colonização é destacada.

No ciclo das relações patógeno – hospedeiro, um dos primeiros atores essenciais para a ocorrência da infecção é a fonte de inóculo, a qual é constituída, essencialmente, pelas estruturas do patógeno (esporos, micélio, corpos de frutificação, células bacterianas, juvenis e/ou fêmeas de nematoides). Essas estruturas dispersam-se por diferentes vias (vento, água ou por movimentação própria) e atingem a superfície do hospedeiro. Dessa forma, o próximo evento no ciclo tem início: a adesão (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Na adesão, a primeira barreira que protege as plantas contra os patógenos é a cutícula. Ela é constituída, basicamente, da membrana, formada pela cutina, celulose e ceras e pela parede celular, com a presença da pectina (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974). A presença da cutícula tem importância na adesão do patógeno e nos eventos posteriores, que são a germinação e a penetração (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Ainda na fase de adesão, a participação de enzimas como as esterases e cutinases tem sido

constatada para diferentes patógenos, como, por exemplo, as ferugens. Essas enzimas facilitam a adesão dos esporos do patógeno no tecido do hospedeiro (DEISING *et al.*, 1992). Outras enzimas têm apresentado importância na degradação da parede celular, como as celulases e β -glicosidase, de fungos como *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* (KUBICEK; STARR; GLASS, 2014). Após a adesão das estruturas do patógeno na superfície hospedeira, se as condições forem favoráveis, inicia-se a fase de germinação. A presença de exsudatos na superfície hospedeira pode apresentar influência na atividade enzimática dos micro-organismos (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012).

O próximo evento no ciclo é a penetração. Para penetrar no tecido do hospedeiro, os patógenos utilizam diferentes vias, como os ferimentos, aberturas naturais e diretamente, pela superfície intacta do hospedeiro. A penetração, via superfície intacta do hospedeiro, pode ser realizada mecanicamente, através de estruturas conhecidas como apressórios, por atividade enzimática, ou por ambos os mecanismos (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974; DEISING *et al.*, 1995; MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996; ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012; PFEILMEIER; CALY; MALONE, 2016). Durante a penetração via apressório, a presença de enzimas como as esterases é marcante em alguns patossistemas (NICHOLSON; KUC; WILLIAMS, 1972).

Na penetração, por meio da atividade enzimática, os fungos podem utilizar enzimas que degradam a cutícula, como as cutinases (VAN DEN ENDE; LINSKENS, 1974). Esse tipo de penetração pela cutícula depende do patossistema envolvido (KOLATTUKUDY, 1985). Para alguns patógenos, como *Rhizoctonia solani*, agente causal de tombamento em mudas, e *Colletotrichum graminicola*, responsável pela antracnose em vários cereais, a presença da cutinase é importante para o avanço das infecções por esses patógenos (BAKER; BATEMAN, 1978). Outras enzimas podem também participar do processo de penetração dos patógenos no tecido do hospedeiro. Por exemplo, as camadas pécticas da parede celular e da lamela média podem sofrer ação

das enzimas pectato liase, pectina liase, pectina metil esterase e poligalacturonase (BARRAS; VAN GIJSEGEM; CHATTERJEE, 1994; PAYASI; SANWAL; SANWAL, 2009). Adicionalmente, vale destacar que muitos patógenos de solo produzem também enzimas. Entre os patógenos, destacam-se *Pectobacterium carotovorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina* (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Após a penetração no tecido hospedeiro, verifica-se também a atividade enzimática próxima ao halo onde se encontra a hifa “peg de penetração” (EMMETT; PARBERY, 1975). Ainda durante a fase de penetração e colonização, observa-se que, em patossistemas que apresentam o fenômeno da quiescência, a penetração no tecido do hospedeiro é inibida devido à presença de compostos fenólicos, como a epicatequina. Com o amadurecimento dos frutos, os níveis da epicatequina decrescem, e as lipoxigenases do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* podem atuar, ocasionando a antracnose em frutos (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992).

Já na colonização, ocorrem o crescimento e a reprodução do patógeno. Na reprodução, são produzidos os esporos sexuais e assexuais dos fungos; a fissão de células bacterianas; e a deposição de ovos pelos nematoides (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012). Para alguns patógenos fúngicos, os esporos (conídios) são produzidos numa massa mucilaginosa, constituída de glicoproteínas, enzimas e compostos inibidores da germinação. Por exemplo, para o patógeno *C. graminicola*, a massa mucilaginosa contém quatro cutinases, pertencentes à classe da serina esterase hidrolase (PASCHOLATI *et al.*, 1993).

Adicionalmente, as enzimas têm sido também constatadas por serem fatores de patogenicidade ou virulência em diferentes patossistemas (ROGERS; FLAISHMAN; KOLATTUKUDY, 1994; WALKER; REEVES; SALMOND, 1994). Por exemplo, no patossistema *Fusarium solani* f. sp. *pisi* x *Pisum sativum*, plantas inoculadas com os isolados do patógeno contendo uma mutação no gene relacionado à produção da enzima cutinase apresentavam menores lesões do que plantas inoculadas com os isolados sem a mutação. Nesse pa-

tossistema, ficou evidente a perda da virulência do isolado mutante, devido a uma mutação do gene relacionado à cutinase (ROGERS; FLAISHMAN; KOLATTUKUDY, 1994). Dessa forma, para que a infecção pelos patógenos seja bem-sucedida, a participação dos fatores de patogenicidade ou virulência, como as enzimas, nas interações planta-patógeno é de fundamental importância. Portanto, a seguir, serão descritos, detalhadamente, o patógeno *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da doença conhecida como podridão mole, e o principal mecanismo da sua patogênese, a produção de enzimas pécticas.

Patogênese: um exemplo com o patógeno *Pectobacterium carotovorum*

A bactéria fitopatogênica *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da doença conhecida como podridão mole, em diferentes hospedeiros, é um exemplo marcante de micro-organismo que produz enzimas necessárias para as infecções. As enzimas produzidas por essa bactéria são consideradas fatores de patogenicidade ou virulência, em muitos patossistemas (BATEMAN; MILLAR, 1966; COLLMER; KEEN, 1986; MARIANO *et al.*, 2005).

Durante o processo de infecção, ocorre uma série de alterações no hospedeiro, tais como acumulação de compostos, mudanças no padrão respiratório e na permeabilidade das membranas, que podem também interferir no modo de ação e na atividade enzimática nos tecidos do hospedeiro (BATEMAN; MILLAR, 1966). Dentro desse contexto, verifica-se que as principais enzimas envolvidas na patogênese de *P. carotovorum* são as pectinolíticas, as quais têm atuação nos compostos pécticos da lamela média, da parede celular. Com a sua atuação, ocorre a desintegração dos tecidos, facilitando a infecção pelo patógeno e, como resultado, a presença dos sintomas e sinais típicos da enfermidade: necrose, podridão mole, pus bacteriano e odor fétido (Figura 3) (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005; ABBOTT; BORASTON, 2008).

Figura 3 – Sintomas (necrose e podridão mole) e sinais (pus bacteriano e odor fétido) em tubérculo de batata



Fonte: foto de Christiana Bruce.

A fitobactéria *Pectobacterium carotovorum* utiliza enzimas pectinolíticas para degradar a parede celular dos seus hospedeiros.

As principais enzimas envolvidas na degradação das substâncias pécnicas da lamela média são as poligalacturonases (Peh), pectato liase (Pel), pectina liase (Pnl) e pectina metil esterase (Pme). Já outras enzimas têm papel fundamental na degradação da celulose (celulases) e de glicoproteínas (proteases) da parede celular (COLLMER; KEEN, 1986; DAHLER; BARRAS; KEEN, 1990).

Para secretar as enzimas pécnicas no tecido do hospedeiro, *P. carotovorum* pode utilizar os três tipos de sistemas de secreção (I, II e III), com diferentes mecanismos, que parecem ser conservados nessa espécie. Essas enzimas secretadas são importantes fatores de patogenicidade, como as proteases, relacionadas ao sistema de secreção tipo I (DAHLER; BARRAS; KEEN, 1990), e as pectinases e celulases, associadas ao sistema de secreção tipo II (ANDRO *et al.*, 1984). Já o sistema de secreção tipo III possui relação com as respostas de hipersensibilidade (HR) e patogenicidade, translocando proteínas necessárias para ocasionar infecção em plantas hospedeiras (reação incompatível) e HR em plantas não hospedeiras (reação compatível) (LAHAYE; BONAS, 2001). Vale destacar que as enzimas pécnicas são também importantes fatores de patogenicidade para outros patógenos ocasionarem enfermidades nas plantas, tais como: *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*

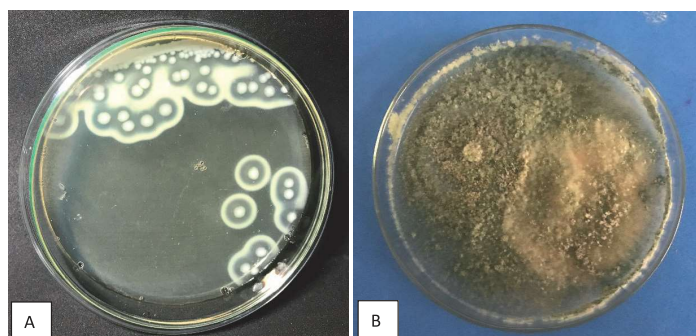
f. sp. *lycopersici*, (PAQUIN; COULOMBE, 1962; MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005; XUE *et al.*, 2018).

Enzimas e a promoção do crescimento em plantas

Os micro-organismos promotores de crescimento, como os fungos e as bactérias, podem ser encontrados em diferentes nichos ecológicos, como a rizosfera e a filosfera (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007; SILVA; BETTIOL, 2009). Nesses nichos, para promover o crescimento das plantas, os micro-organismos utilizam mecanismos de ação diretos e indiretos. Os mecanismos diretos estão relacionados à solubilização do fosfato, produções de antibióticos, fito-hormônios e sideróforos. Já os mecanismos indiretos estão intimamente relacionados à produção de celulases, proteases, amilases, ureases, lipases, entre outras enzimas (GLICK, 2012).

Entre os micro-organismos promotores de crescimento, as espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* destacam-se como as mais utilizadas na agricultura (BENÍTEZ *et al.*, 2004; PÉREZ MONTAÑO *et al.*, 2014). No caso de *Bacillus*, a sua ampla adoção como promotor de crescimento deve-se à facilidade no seu cultivo e à formação de esporos de resistência, os endósporos (CHOUDHARY; JOHRI, 2009; KUMAR; DUBEY; MAHESWARI, 2012). Por sua vez, *Trichoderma* também tem apresentado facilidade no cultivo e demonstra ser um fungo com grande capacidade de esporulação. Essa característica facilita a obtenção de bioformulados do micro-organismo (Figura 4) (PAPAVIZAS, 1985).

Figura 4 – Colônias típicas de micro-organismos promotores de crescimento

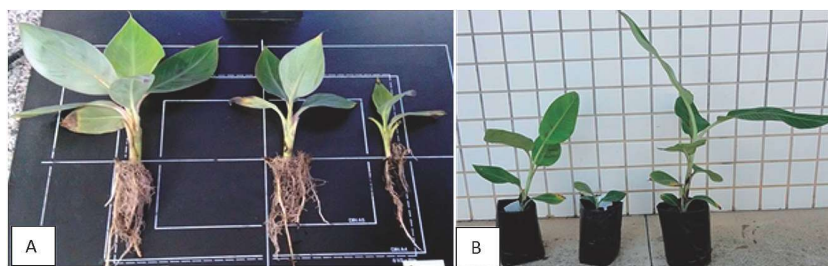


Fonte: fotos de Christiana Bruce.

(A) Colônias de isolado de *Bacillus* sp.; (B) Colônias de isolado de *Trichoderma harzianum*.

Para promover o crescimento das plantas, as espécies de *Bacillus* e *Trichoderma*, por meio dos mecanismos indiretos, podem produzir compostos, como as enzimas. Com a utilização desses mecanismos, os micro-organismos promovem o crescimento/desenvolvimento das plantas, culminando com incrementos na produtividade das culturas (GLICK, 2012). Por exemplo, isolados de *B. pumilus* (RAB9 e E2) foram capazes de produzir celulases, amilases, pectinases, lipases e proteases, enzimas relacionadas à promoção de crescimento, em mudas de bananeira (*Musa* spp.). As mudas inoculadas com esses micro-organismos estavam nas fases de aclimatização e cultivo em sacos, sob condições de casa de vegetação, na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE). Após esse período de cultivo, puderam-se observar ganhos em altura, comprimento da raiz, massa seca da raiz, diâmetro do pseudocaule e área foliar das plantas inoculadas com os isolados de *Bacillus* RAB9 e E2 (Figura 5) (SILVA *et al.*, 2018).

Figura 5 – Promoção do crescimento de mudas micropropagadas de bananeira por isolados de *Bacillus pumilus*



Fonte: fotos de Silva *et al.* (2018).

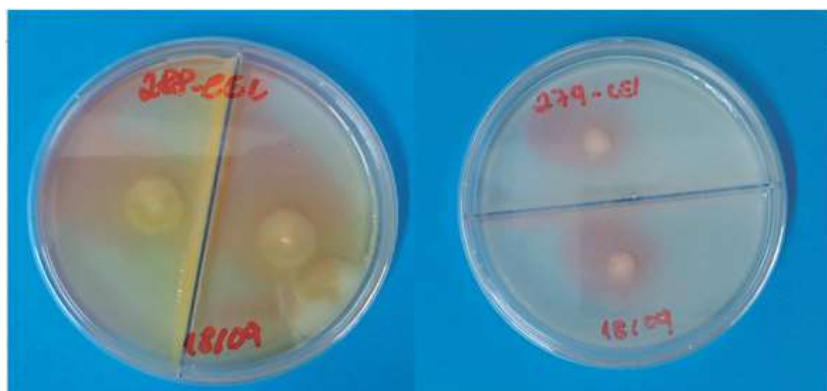
(A) Mudanças micropropagadas de bananeira cv. Prata Catarina tratadas e não tratadas com a biomassa bacteriana, após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE). Tratamentos: RAB9, E2 e controle (esquerda para direita), respectivamente; (B) Mudanças micropropagadas de bananeira cv. Prata Catarina tratadas e não tratadas com a biomassa bacteriana, após 120 dias de plantio. Tratamentos: E2, controle e RAB9 (esquerda para direita), respectivamente.

Entre as enzimas produzidas pelos micro-organismos, durante a fixação biológica do nitrogênio, a participação do complexo enzimático denominado nitrogenase é fundamental. Esse complexo converte

o nitrogênio (N_2) em amônia (NH_3), disponibilizando-a para as plantas e desempenhando um papel importante na agricultura, pois a ureia é utilizada como a fonte de nitrogênio. A principal enzima contida no solo, que hidrolisa a ureia, é a urease. A sua atividade é um indicador da qualidade biológica do solo, sendo influenciada por fatores como pH, teor de carbono e metais pesados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Na detecção da produção da enzima urease pelos micro-organismos, muitos são as provas bioquímicas que podem ser utilizadas. Uma delas é a suplementação de meios de cultura *in vitro* com ureia. Se os micro-organismos produzirem a enzima urease, é evidenciada a formação de halo claro ao redor das colônias (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Outra enzima produzida pelos micro-organismos que é importante na promoção de crescimento das plantas e que tem participação no ciclo do carbono é a celulase. Essa enzima degrada a celulose, liberando açúcares solúveis e glicose para as plantas (TÓTOLA; CHAER, 2002). A sua detecção pode ser realizada por testes *in vitro*, com a suplementação de meios de cultura com celulose microcristalizada. A produção pelo micro-organismo da enzima culmina com a formação de uma zona clara em torno das colônias (Figura 6), (adaptado de CATTELAN, 1999).

Figura 6 – Produção de celulase pelos isolados de *Bacillus* sp.

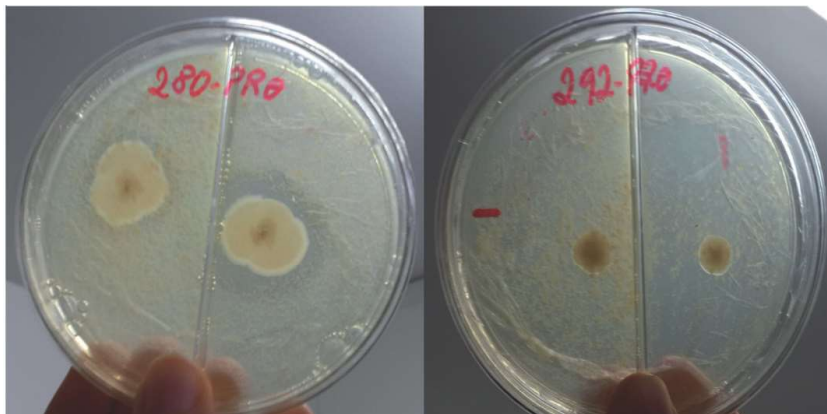


Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 288 apresentou a formação de halo claro ao redor das colônias (esquerda), em contraste com a não formação de halo isolado 279 (direita).

A protease é uma enzima também efetiva na promoção de crescimento das plantas. Assim como as ureases, a protease também participa da ciclagem do nitrogênio nos solos (TÓTOLA; CHAER, 2002). A constatação da sua produção pelos micro-organismos pode ser realizada por testes *in vitro* de detecção da formação de halos mais claros ao redor das colônias microbianas (adaptado de VERMELHO *et al.*, 1996) (Figura 7).

Figura 7 – Produção de protease pelos isolados de *Bacillus* sp.

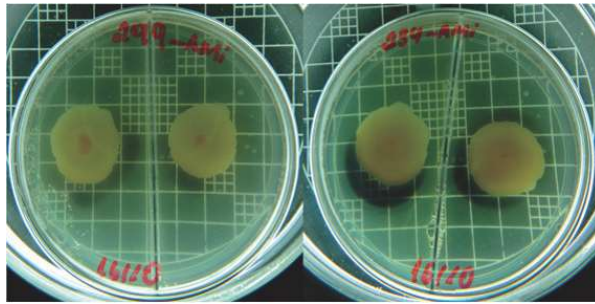


Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 280 apresentou a formação de halo claro ao redor das colônias (esquerda), em contraste com a não formação de halo do isolado 292 (direita).

A amilase também é uma enzima importante na promoção de crescimento das plantas. Essa enzima tem papel preponderante na clivagem do amido, principal polissacarídeo de reserva presente nas raízes, sementes e tubérculos (PANDEY *et al.*, 2000). A constatação da sua produção pelos micro-organismos pode também ser realizada por testes *in vitro* de detecção da formação de halos mais claros ao redor das colônias microbianas (Figura 8) (adaptado de SILVA *et al.*, 2017).

Figura 8 – Produção de amilase pelos isolados de *Bacillus* sp.



Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

Os isolados 299 e 234 de *Bacillus* apresentaram a formação de halo claro ao redor das colônias.

Outra enzima importante, por proteger as plantas contra os estresses ambientais, é a catalase. A produção da catalase pelos micro-organismos proporciona a tolerância das plantas a estresses abióticos. Dessa forma, permite, indiretamente, o crescimento/desenvolvimento das plantas (ISLAM *et al.*, 2016). Para detecção da atividade da enzima catalase pelos micro-organismos, os testes *in vitro* com solução de peróxido de hidrogênio permitem a visualização de bolhas características da sua formação (Figura 9) (adaptado de ZURITA; MEJÍA; GUZMÁN-BLANCO, 2010).

Figura 9 – Produção de catalase pelos isolados de *Bacillus* sp.



Fonte: foto de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 279 apresentou a formação de bolhas (esquerda), em contraste com a não formação do isolado 276 (direita).

Por fim, outro mecanismo importante dos micro-organismos para promover o crescimento das plantas é a solubilização do fosfato. Muitos micro-organismos conseguem solubilizar o fosfato da sua forma insolúvel para aquela prontamente assimilável para as plantas, utilizando as enzimas. Algumas das enzimas envolvidas são as fosfatases e fitases (RODRÍGUEZ *et al.*, 2006). Para detectar a produção de fosfatase pelos micro-organismos, a realização de testes *in vitro*, com meios de culturas suplementados com fontes de fósforo (fosfato de cálcio ou fosfato de potássio), proporciona a visualização de halos claros ao redor das colônias dos micro-organismos produtores dessa enzima (Figura 10) (CATTELAN, 1999).

Figura 10 – Solubilização do fosfato por isolados de *Bacillus* sp.



Fonte: foto de Christiana Bruce.

O isolado 186 apresentou produção de enzimas com a formação de halo mais claro ao redor das colônias bacterianas.

Enzimas e o controle biológico de plantas

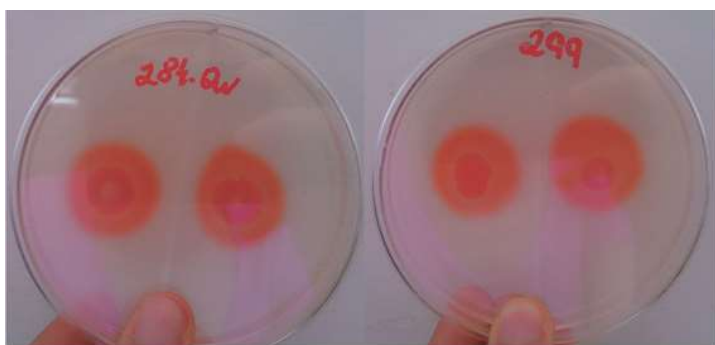
Além de promoverem o crescimento/desenvolvimento das plantas, muitos dos micro-organismos benéficos podem também realizar o controle biológico das doenças incidentes nas diferentes espécies vegetais. O controle biológico é um método de controle ambientalmente sustentável, e a sua adoção deve ser estimulada, dentro do contexto de manejo integrado nos sistemas de produção agrícolas. Os micro-organismos benéficos que apresentam atuação

sobre os patógenos são conhecidos como agentes de controle biológico ou antagonistas (COOK; BAKER, 1983). Entre as espécies mais utilizadas como antagonistas, destacam-se *Bacillus* e *Trichoderma* (BENÍTEZ *et al.*, 2004; RADHAKRISHNAN; HASHEM; ALLAH, 2017). Esses micro-organismos têm apresentado o maior número de princípios ativos registrados para o controle de doenças de plantas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2019).

Para realizar o biocontrole, os antagonistas utilizam diferentes mecanismos de ação. Os principais mecanismos envolvidos no controle biológico são o antagonismo direto, com a produção de metabólitos; indução de resistência; competição por nutrientes e espaço e o parasitismo (CHIN-A WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003; ROMEIRO, 2007). No processo de antagonismo direto, há a participação de enzimas que atuam na degradação da parede celular, como as quitosanases, proteases, celulasas e glucanases (KUBICEK; MACH; PETERBAUER, 2001; CHIN-A WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003; RADHAKRISHNAN; HASHEM; ALLAH, 2017). Em vários trabalhos, é evidenciada a importância fundamental das enzimas no biocontrole de fitopatógenos. Por exemplo, a produção de enzimas quitinolíticas pela bactéria *Paenibacillus* sp., como a quitinase e β -1,3 glucanase, proporcionou a lise da parede celular do patógeno *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (SINGH *et al.*, 1999). Por sua vez, a utilização de isolados de *Bacillus* spp. produtores das enzimas protease e quitinase apresentou a inibição do crescimento micelial de diferentes fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *S. oryzae* (SEITH; MUKHERJEE, 2018).

Em estudos conduzidos no Laboratório de Patologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), foi constatado que diferentes isolados de *Bacillus*, provenientes da rizosfera de bananeiras, produziam *in vitro* enzimas voltadas para o controle biológico de patógenos. As enzimas mais marcantes produzidas por esses isolados bacterianos foram a quitinase (Figura 11) e a lipase (Figura 12) (dados ainda não publicados).

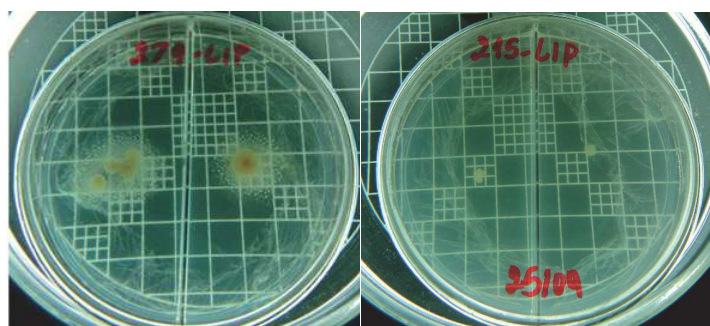
Figura 11 – Produção de quitinase *in vitro* pelos isolados de *Bacillus* sp.



Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

Os isolados 284 e 299 de *Bacillus* apresentaram a formação de halo claro ao redor das colônias, após a revelação com corante vermelho congo.

Figura 12 – Produção de lipase *in vitro* pelos isolados de *Bacillus* sp.

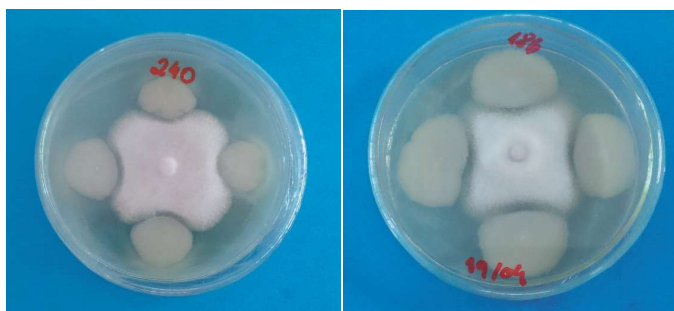


Fonte: fotos de Christiana Bruce e Naomi Freitas.

O isolado 279 produziu a enzima lipase, com a formação de cristais ao redor das colônias bacterianas (esquerda). Já o isolado 215 não produziu a enzima (direita).

A produção dessas enzimas pelos micro-organismos antagonistas tem importância fundamental no biocontrole, pois esses metabólitos atuam na degradação da parede celular dos fitopatógenos, agentes causais de doenças de plantas (CHIN-A WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003). Pode-se visualizar o efeito das enzimas *in vitro*, por exemplo, pela inibição do crescimento micelial dos patógenos (Figura 13). O mecanismo envolvido, nesse caso, foi o antagonismo direto.

Figura 13 – Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), pelo método do pareamento de culturas



Fonte: fotos de Christiana Bruce e Francisco Henrique Alves.

As colônias do antagonista *Bacillus* estavam localizadas em quatro pontos equidistantes do centro da placa de Petri, enquanto as colônias do patógeno FOC estavam localizadas no centro das placas de Petri. (A) Placa contendo o isolado 240 de *Bacillus* e o patógeno FOC (colônia ao centro da placa de Petri); (B) Placa contendo o isolado 186 de *Bacillus* e o patógeno FOC. Todas as placas estão com cinco dias de crescimento.

Outro mecanismo de ação apresentado pelos antagonistas, em que a participação de enzimas tem característica marcante, é o parasitismo. Por exemplo, no processo de micoparasitismo, realizado por espécies de *Trichoderma* em hifas de *Rhizoctonia solani* (importante patógeno causador de tombamentos de mudas), ocorre a expressão de diferentes enzimas responsáveis pela degradação da parede celular do patógeno (HARMAN *et al.*, 2004). As enzimas produzidas pelas espécies de *Trichoderma* responsáveis pelo micoparasitismo são as β -1,3 glucanase (NORONHA; ULHOA, 2000; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012), quitinases (KUBICEK; MACH; PETERBAUER, 2001; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012), quitosanases, proteases (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012), L-aminoácido oxidase (CHENG; YANG; PENG, 2012), entre outras. Dessa forma, é essencial que ocorra a secreção do arsenal de enzimas dos micro-organismos antagonistas para que os seus mecanismos de ação sejam eficientes no biocontrole dos patógenos de plantas.

Considerações finais

As enzimas são importantes metabólitos produzidos pelos diferentes micro-organismos, que interagem com as plantas. Os micro-organismos

produtores desses compostos podem utilizar-se das enzimas para adentrar no tecido do hospedeiro, ocasionando doenças nas plantas. Mas também as enzimas são fundamentais em ações benéficas para as plantas, como a promoção do crescimento vegetal e o controle de fitopatógenos. Portanto, o entendimento do papel desses metabólitos nas interações planta – micro-organismos é de fundamental importância dentro dos agroecossistemas agrícolas.

Referências

ABBOT, D. W.; BORASTON, A. B. Structural biology of pectin degradation by *Enterobacteriaceae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, United States, v. 72, n. 2, p. 301-316, June 2008.

ANDRO, T. *et al.* Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *Journal of Bacteriology*, United States, v. 160, n. 3, p. 1199-1203, Dec. 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO. 2019. Disponível em: <http://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados>. Acesso em: 10 jan. 2019.

BAKER, C. J.; BATEMAN, D. F. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 68, n. 11, p. 1577-1584, Nov. 1978.

BARRAS, F.; VAN GIJSEGEM, F.; CHATTERJEE, A. K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 32, p. 201-234, Sept. 1994.

BATEMAN, D. F.; MILLAR, R. L. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 4, p. 119-144, Sept. 1966.

BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, Spain, v. 7, n. 4, p. 249-260, Dec. 2004.

BERGAMIN FILHO, A. *et al.* (ed.). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. *Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1996. 289 p.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. *Microbiologia do solo*. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (org.). *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. p. 79-96.

CATTELAN, A. J. *Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal*. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36 p.

CHENG, C-H.; YANG, C-A.; PENG, K-C. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 102, n. 11, p. 1054-1063, Nov. 2012.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines in their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, Lancaster, v. 157, n. 3, p. 503-523, Mar. 2003.

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, Germany, v. 164, n. 5, p. 493-513, Oct. 2009.

COLLMER, A.; KEEN, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 24, p. 383-429, Sept. 1986.

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

DAHLER, G. S.; BARRAS, F.; KEEN, N. T. Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Journal of Bacteriology*, United States, v. 172, n. 10, p. 5803-5815, Oct. 1990.

- DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 39, p. 313-335, Sept. 2001.
- DEISING, H. *et al.* Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *The Plant Cell*, United States, v. 4, n. 1, p. 1101-1111, Sept. 1992.
- DEISING, H. *et al.* Differentiation and cell wall degrading enzymes in the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Canadian Journal of Botany*, Canada, v. 73, p. 624-631, 1995. Supplement 1.
- EMMETT, R. W.; PARBERY, D. G. Appressoria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 13, p. 147-165, Sept. 1975.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.
- FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.* *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568 p.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, London, v. 2012, p. 1-15, Sept. 2012.
- GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, Great Britain, v. 158, p. 26-34, Jan. 2012.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, United States, v. 67, n. 3, p. 597-607, May/June 1975.
- HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 2, n. 1, p. 43-56, Jan. 2004.
- HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 190-194, Feb. 2006.

ISLAM, F. *et al.* Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. *Plant Growth Regulation*, Netherlands, v. 80, n. 1, p. 23-36, Sept. 2016.

KOLATTUKUDY, P. E. Enzymation penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 23, p. 223-250, Sept. 1985.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 5, n. 10, p. 336-351, Apr. 2012.

KUBICEK, C. P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, Bari, v. 83, n. 2, p. 11-23, Sept. 2001.

KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 52, p. 427-451, Aug. 2014.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, Germany, v. 167, n. 8, p. 493-499, Sept. 2012.

LAHAYE, T.; BONAS, U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends in Plant Science*, Bethesda, v. 6, n. 10, p. 479-485, Oct. 2001.

LIAO, C-H.; HUNG, H-Y.; CHATTERJEE, A. K. An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Palo Alto, v. 1, n. 5, p. 199-206, Jan. 1988.

MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org.). *Fungos: uma*

introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 451-490.

MARCANO, I.-E. *et al.* Assessment of bacterial populations associated with banana tree roots and development of successful plant probiotics for banana crop. *Soil Biology & Biochemistry*, United Kingdom, v. 99, p. 1-20, Aug. 2016.

MARIANO, R. L. R. *et al.* Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, v. 2, p. 121-153, dez. 2005.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 34, p. 367-386, Sept. 1996.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 398 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (ed.). *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MORTUZA, M. G.; ILAG, L. L. Potential for biocontrol of *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biological Control*, Switzerland, v. 15, n. 3, p. 235-240, July 1999.

NICHOLSON, R. L.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 62, n. 11, p. 1242-1247, Nov. 1972.

NITURE, S. K. Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*, Bratislava, v. 63, n. 1, p. 1-19, 2008.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDaL-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, Bethesda, v. 183, n. 1, p. 119-123, Feb. 2000.

PANDEY, A. *et al.* Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Winnipeg, v. 31, n. 2, p. 135-152, Apr. 2000.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 23, p. 23-54, Sept. 1985.

PAQUIN, R.; COULOMBE, L. J. Pectin enzyme synthesis in relation to virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen. *Canadian Journal of Botany*, Canada, v. 40, n. 4, p. 533-541, Apr. 1962.

PASCHOLATI, S. F. *et al.* Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, England, v. 42, p. 37-51, Jan. 1993.

PAYASI, A.; SANWAL, R.; SANWAL, G. G. Microbial pectate lyases: characterization and enzymological properties. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, Switzerland, v. 25, n. 1, p. 1-14, Jan. 2009.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, England, v. 22, n. 2, p. 187-193, Apr. 2011.

PÉREZ-MONTAÑO, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, Germany, v. 169, n. 5/6, p. 325-336, May/June 2014.

PFEILMEIER, S.; CALY, D. L.; MALONE, J. G. Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective. *Molecular Plant Pathology*, England, v. 17, n. 8, p. 1298-1313, Oct. 2016.

PHAN, T. D.; HERBST, F.; MONTAG, F. *Xanthomonas*. Munich, dez. 2011. Disponível em: <https://vimeo.com/34378870>. Acesso em: 3 nov. 2018.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R. A. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (org.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England: CAB International, 1992. p. 289-307.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ALLAH, E. F. A. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, Switzerland, v. 8, n. 9, p. 1-14, Sept. 2017.

RODRÍGUEZ, H. *et al.* Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 287, n. 1/2, p. 15-21, 2006.

ROGERS, L. M.; FLAISHMAN, M. A.; KOLATTUKUDY, P. E. Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* f. sp *pisi* decreases its virulence on pea. *The Plant Cell*, United States, v. 6, n. 7, p. 935-945, July 1994.

ROMEIRO, R. S. *Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. 269 p.

SEITH, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Screening of biocontrol potential of indigenous *Bacillus* spp. isolated from rice rhizosphere against *R. solani*, *S. oryzae*, *S. rolfsii* and response towards growth of rice. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, India, v. 12, n. 1, p. 41-53, Mar. 2018.

SILVA, C. F. B. *et al.* Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 22, n. 11, p. 782-787, Sept. 2018.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W. Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro e de promoção de crescimento. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (org.). *Biocontrole*

de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 277-287.

SILVA, L. A. F. *et al.* Produção de amilase por fungo filamentoso endofítico em fermentação submersa. *Caderno de Ciências Agrárias*, Montes Claros, v. 9, n. 3, p. 49-53, dez. 2017.

SINGH, P. *et al.* Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 89, n. 1, p. 92-99, Jan. 1999.

TOTH, I. K. *et al.* Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, England, v. 4, n. 1, p. 17-30, Jan. 2003.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. *Tópicos em Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 2, p. 195-276, Jan. 2002.

VAN DEN ENDE, G.; LINSKENS, H. F. Cutinolytic enzymes in relation to pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 12, p. 247-258, Sept. 1974.

VERMELHO, A. B. *et al.* Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 755-760, Nov./Dec. 1996.

WALKER, D. S.; REEVES, P. J.; SALMOND, G. P. C. The major secreted cellulase, CeIV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important soft rot virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 7, n. 3, p. 425-431, May 1994.

XUE, C. Y. *et al.* Cell-wall-degrading enzymes produced in vitro and in vivo by *Rhizoctonia solani*, the causative fungus of peanut sheath blight. *Peer J*, Bethesda, v. 6, p. 1-22, Sept. 2018.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C. O ciclo das doenças. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. (org.). *O essencial da fitopatologia: agentes causais*. Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 111-140.

ZURITA, J.; MEJÍA, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 14, p. 97-107, dez. 2010. Suplemento 2.