

GUILHERME PEIXOTO DE FREITAS

**PROBIÓTICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DO CAFEIRO**

Botucatu

2024

GUILHERME PEIXOTO DE FREITAS

**PROBIÓTICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção em Plantas).

Orientador: Wagner Bettiol

Botucatu

2024

F866p

Freitas, Guilherme Peixoto de

Probióticos no controle de doenças e na promoção de crescimento do cafeeiro / Guilherme Peixoto de Freitas. -- Botucatu, 2024

85 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Wagner Bettiol

1. Probióticos. 2. Controle biológico. 3. Doenças do cafeeiro. 4. Promoção de Crescimento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PROBIÓTICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO CAFEIEIRO

AUTOR: GUILHERME PEIXOTO DE FREITAS

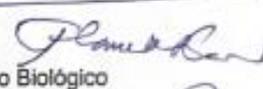
ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL (Participação Presencial)
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente



Prof.ª Dr.ª FLÁVIA RODRIGUES ALVES PATRÍCIO (Participação Presencial)
Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal / Instituto Biológico



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu UNESP



Botucatu, 24 de janeiro de 2024

Aos meus amados pais,

Rozeli e Edivaldo,

dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pelo dom da vida e por sempre abençoar os caminhos que até aqui trilhei.

Aos meus pais Rozeli e Edivaldo, pelo apoio, amor, carinho e dedicação. Vocês são minha maior fonte de inspiração e a razão pela qual posso seguir em busca dos meus sonhos. Por tudo que fizeram e fazem por seus filhos, meu muito obrigado, amo muito vocês.

Ao meu irmão Gustavo, por todo apoio, carinho e amizade, amo você meu irmão.

Aos meus avós Claudete, Osmar (*in memoriam*) e Maria (*in memoriam*), que sempre foram os meus maiores exemplos de vida. Vocês foram e continuam sendo as minhas maiores fontes de inspiração sobre como a vida deve ser vivida e sobre o poder de ter uma família para compartilhar momentos.

À minha noiva Jessica, por todo o afeto, carinho, apoio e amor partilhado durante todos estes anos, contigo a vida é mais leve e harmônica, te amo muito.

À toda minha família que são minha fortaleza e sempre estiveram me apoiando e vibrando a cada conquista, agradeço a Deus por terem vocês comigo.

Ao Dr. Wagner Bettiol, meu orientador, pelo apoio, ensinamentos e compartilhamento de conhecimento, sinto-me honrado por ter sido orientado por um dos maiores nomes do controle biológico no país. Muito obrigado!

À Dra. Flávia Patrício, pela receptividade, carinho, atenção, ensinamentos e conversas diárias no Instituto Biológico. Sempre serei extremamente grato por tudo que fez por mim; devo muito a você. Muito obrigado!

Ao Matheus Cipriano, pela parceria e partilhamento de conhecimento e aos colegas do Instituto Biológico e da Embrapa, Rafaela, Osmane, Karina, Peterson, Luana, Tamires, Mateus, João, Neusa e todos os demais por toda ajuda e apoio no desenvolvimento do trabalho e conversas diárias. Muito obrigado!

A todos os professores e funcionários da FCA pelos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa de estudos concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

RESUMO

A demanda por uma produção agrícola mais sustentável, tem impulsionado a busca por alternativas ao uso de pesticidas químicos e fertilizantes minerais, incluindo o uso de produtos biológicos. Este estudo avaliou o potencial de probióticos, de uso animal e humano, sobre o controle de doenças que impactam a produtividade e sobre o crescimento do cafeeiro. Os probióticos possuem microrganismos vivos que beneficiam a saúde humana e animal, ao competir com patógenos, produzir compostos antimicrobianos, estimular a proliferação da microbiota intestinal e a modulação do sistema imunológico, e têm a vantagem de ter a tecnologia para seu preparo desenvolvida. Neste estudo foram testados os probióticos de uso animal, Colostrum[®] BIO 21 em formulação líquida e em pó (renomeados como: BIO 21 L e BIO 21 PÓ) e Colostrum[®] BS também em formulação líquida e pó (renomeados como: BS L e BS PÓ) e o probiótico de uso humano, Enterogermina[®]. Avaliou-se o efeito dos probióticos sobre a inibição da germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* e do crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* e de *Boeremia exigua* pv. *coffea*, agentes causais da ferrugem, cercosporiose e mancha de Phoma, respectivamente. O controle dessas doenças, além da mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, em mudas de cafeeiro também foi avaliado. Experimentos com mudas de cafeeiro, tanto em bandejas quanto em rizotrons, foram realizados para avaliar o potencial na promoção de crescimento. Todos os experimentos foram repetidos. Os probióticos tiveram pouco efeito sobre a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*. Apenas o produto BIO 21 L inibiu 100% a germinação dos urediniósporos na concentração de 1×10^7 UFC/mL. Os probióticos BS e BIO 21 PÓ, juntamente com BS L, reduziram em 63, 49 e 46% o crescimento micelial de *C. coffeicola*. Os probióticos BS e BIO 21 PÓ inibiram 37 e 18% o crescimento micelial de *B. exigua*, respectivamente. Os probióticos BS e BIO 21 PÓ reduziram em 97 e 96% a severidade da ferrugem; 59 e 79% a da mancha de Phoma e 57 e 38% a da mancha aureolada em mudas de cafeeiro. Entretanto, os probióticos não tiveram efeito no controle da cercosporiose. Os probióticos BS e BIO 21 PÓ promoveram o aumento da massa fresca e seca da parte aérea, do volume radicular, da área foliar e do conteúdo de clorofila tanto das mudas de cafeeiro cultivadas em bandejas quanto das cultivadas em rizotrons. Os incrementos de massa seca de raiz foram de 35% e 70% para o BS e BIO 21 PÓ, respectivamente, nas mudas em bandejas e de 51 e 37% para as mudas cultivadas em rizotrons. Para a massa seca da parte aérea, os incrementos foram de 97% e 67%, para as mudas mantidas em bandejas e de 76% e 58% nas mudas em rizotrons, para o BS e BIO 21 PÓ, respectivamente. O probiótico Enterogermina[®] não apresentou efeito sobre as variáveis estudadas. Os probióticos BS e BIO 21 PÓ se destacaram para o controle de doenças e para a promoção do crescimento de mudas de cafeeiro.

Palavras-chave: probióticos; controle biológico; doenças do cafeeiro; promoção de crescimento.

ABSTRACT

The demand for more sustainable agricultural production has driven the search for alternatives to the use of chemical pesticides and mineral fertilizers, including the use of biological products. This study evaluated the potential of probiotics, used in both animal and human applications, in controlling diseases that impact productivity and coffee plant growth. Probiotics contain live microorganisms that benefit human and animal health by competing with pathogens, producing antimicrobial compounds, stimulating the proliferation of intestinal microbiota, modulating the immune system, and having the advantage of developed technology for their preparation. In this study, probiotics for animal use, Colostrum[®] BIO 21 in liquid and powder formulations (renamed as BIO 21 L and BIO 21 PÓ), and Colostrum[®] BS also in liquid and powder formulations (renamed as BS L and BS PÓ), along with the human-use probiotic Enterogermina[®], were tested. The effect of probiotics on inhibiting the germination of *Hemileia vastatrix* urediniospores and the mycelial growth of *Cercospora coffeicola* and *Boeremia exigua* pv. *coffea*, are the causal agents of coffee diseases, rust leaf coffee, brown eye spot, and Phoma leaf spot, respectively, was evaluated. The control of these diseases, as well as bacterial-halo-blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, in coffee seedlings, was also assessed. Experiments with coffee seedlings in trays and rhizotrons were conducted to evaluate their potential for growth promotion. All experiments were repeated. Probiotics had little effect on the germination of *H. vastatrix* urediniospores. Only the product BIO 21 L inhibited 100% of urediniospore germination at a concentration of 1×10^7 CFU/mL. Probiotics BS and BIO 21 PÓ, along with BS L, reduced the mycelial growth of *C. coffeicola* by 63, 49, and 46%, respectively. BS and BIO 21 PÓ inhibited the mycelial growth of *B. exigua* by 37 and 18%, respectively. BS and BIO 21 PÓ reduced rust leaf severity by 97 and 96%, Phoma leaf spot by 59 and 79%, and bacterial-halo-blight by 57 and 38% in coffee seedlings. However, probiotics had no effect on brown eye spot control. Probiotics BS and BIO 21 PÓ promoted increased fresh and dry mass of the root and shoot, root volume, leaf area, and chlorophyll content in both tray and rhizotron-grown coffee seedlings. Dry mass increases for root were 35% and 70% for BS and BIO 21 PÓ, respectively, in tray-grown seedlings and 51% and 37% in rhizotron-grown seedlings. For shoot dry mass, increases were 97% and 67% in tray-grown seedlings and 76% and 58% in rhizotron-grown seedlings for BS and BIO 21 PÓ, respectively. Enterogermina[®] showed no effect on the studied variables. Probiotics BS and BIO 21 PÓ stood out for disease control and the promotion of coffee seedling growth.

Keywords: probiotics; biological control; coffee diseases; plant growth-promotion.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Controle biológico de doenças.....	18
2.2	Bactérias promotoras do crescimento de plantas.....	20
2.3	Probióticos.....	21
2.4	Doenças do cafeeiro.....	23
2.4.1	Ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	23
2.4.2	Cercosporiose ou mancha de olho pardo (<i>Cercospora coffeicola</i>)....	25
2.4.3	Mancha de Phoma (<i>Boeremia exigua</i> pv. <i>coffea</i>).....	27
2.4.4	Mancha Aureolada (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>).....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Probióticos utilizados nos experimentos.....	30
3.2	Experimentos in vitro.....	31
3.2.1	Inibição da germinação dos urediniósporos de <i>Hemilia vastratrix</i>	31
3.2.2	Inibição do crescimento micelial de <i>Cercospora coffeicola</i>	33
3.2.3	Inibição do crescimento micelial de <i>Boeremia exigua</i> pv. <i>coffea</i>	34
3.3	Experimentos in vivo.....	35
3.3.1	Probióticos para o controle da ferrugem do cafeeiro (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	35
3.3.2	Probióticos para o controle da cercosporiose do cafeeiro (<i>Cercospora coffeicola</i>).....	36
3.3.3	Probióticos para o controle de mancha de Phoma (<i>Boeremia exigua</i> pv. <i>coffea</i>).....	37
3.3.4	Probióticos para o controle da mancha aureolada (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>).....	38
3.4	Promoção de crescimento.....	40
3.4.1	Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em bandejas.....	40
3.4.2	Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em rizotrons.....	41
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Experimentos in vitro.....	45
4.1.1	Inibição da germinação dos urediniósporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	45
4.1.2	Inibição do crescimento micelial de <i>Cercospora coffeicola</i>	46
4.1.3	Inibição do crescimento micelial de <i>Boeremia exigua</i> pv. <i>coffea</i>	48
4.2	Experimentos <i>in vivo</i>	50

4.2.1	Probióticos para o controle da ferrugem do cafeeiro (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	50
4.2.2	Probióticos para o controle da cercosporiose do cafeeiro (<i>Cercospora coffeicola</i>).....	53
4.2.3	Probióticos para o controle de mancha de Phoma (<i>Boeremia exigua</i> pv. <i>coffea</i>).....	54
4.2.4	Probióticos para o controle da mancha aureolada (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>).....	56
4.3	Promoção de crescimento.....	58
4.3.1	Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em bandejas.....	58
4.3.2	Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em rizotrons.....	62
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A população global está em constante crescimento. De acordo com a FAO, a produção de alimentos terá que aumentar entre 70% e 100% para atender à demanda projetada de 9,3 bilhões de pessoas até 2050 (Undp, 2021; Wang, 2022). Este aumento na produção de alimentos é uma necessidade devido aos desafios a serem enfrentados, como o esgotamento dos recursos naturais, as mudanças climáticas e o aumento de pragas e doenças que causam grandes perdas na produção (Jaffar *et al.*, 2022).

Além disso, é fundamental que qualquer aumento na produção de alimentos seja alcançado seguindo as premissas de sustentabilidade, conforme proposto na Agenda 2030 da ONU, que abrange 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (Fonseca *et al.*, 2020). Dentre esses objetivos, destacam-se a erradicação da fome, a promoção de uma agricultura sustentável, a adoção de padrões de produção e consumo sustentáveis, bem como a proteção, promoção e recuperação do uso sustentável dos ecossistemas e a reversão da perda de terra e biodiversidade (Un Desa, 2023). Assim, o aumento da produção de alimentos precisa ser acompanhado pelo compromisso de produzi-los com qualidade e em quantidade, garantindo a segurança alimentar global com o mínimo impacto ambiental (Clark *et al.*, 2022).

Nesse contexto, no âmbito do manejo fitossanitário de doenças, é imperativo buscar soluções que visem à racionalização do uso de agrotóxicos. Esses produtos estão frequentemente associados ao aumento da população de patógenos resistentes, aos impactos negativo na microbiota do solo e à diminuição da biodiversidade, além das restrições de uso em diversos segmentos devido aos efeitos no ecossistema (Sindhu *et al.*, 2016; Parra-Arroyo *et al.*, 2022).

O cafeeiro, uma das culturas de maior importância nacional, na qual o Brasil lidera a produção e exportação do grão, é suscetível ao ataque de doenças que afetam diretamente sua produtividade. Isso demanda dos cafeicultores o uso de agrotóxicos para o controle das doenças e, assim, manter a produtividade (Cui *et al.*, 2020; Zambolim, 2016). No cenário desafiador em relação ao controle de patógenos a necessidade de manejar doenças é evidente.

A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, é a principal doença da cultura. Altos índices de severidade da ferrugem podem resultar em perdas de

produção que variam de 35% a 50% (Meira *et al.*, 2009; Zambolim, 2016). Lavouras com manejo inadequado estão sujeitas aos danos causados pela cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), levando a perdas significativas (Nelson, 2008). Além disso, cafezais cultivados em regiões de alta altitude podem sofrer perdas significativas de produtividade devido à mancha de Phoma (*Boeremia exigua* pv. *coffea*) e à mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) (Badel; Zambolim, 2019; Patricio *et al.*, 2021; Rodrigues, 2019).

Nesse contexto desafiador, em que o controle de patógenos é fundamental, agentes de controle biológico emergem como uma solução promissora para o manejo fitossanitário e racionalização do uso de produtos químicos. Esses microrganismos, por meio de diversos mecanismos, desempenham um papel importante na mitigação do estabelecimento, desenvolvimento e proliferação de doenças no campo (Backer, 1968; O'Brien, 2017; Ram *et al.*, 2018).

No cenário atual, a aplicação de agentes de controle biológico é amplamente adotada no manejo de doenças, desempenhando um papel essencial na busca por reduzir a utilização de defensivos químicos, preservar a biodiversidade e promover uma agricultura com baixa emissão de carbono (Baker *et al.*, 2020; Cabi, 2022). Como exemplo, microrganismos como *Bacillus* e *Trichoderma* possuem registro junto ao Ministério da Agricultura (MAPA) e são aprovados para o controle de doenças radiculares e foliares em diversas culturas (Agrofit, 2023).

Além dos microrganismos convencionais utilizados, outras alternativas devem ser consideradas no controle biológico de doenças. Os microrganismos presentes em probióticos surgem como candidatos promissores para o desenvolvimento de bioprotetores, pois são consideradas seguros pela US Food and Drug Administration e European Food Safety Authority, além de produzirem compostos com atividade antimicrobiana contra patógenos (Daranas *et al.*, 2019).

Definidos de maneira semelhante pela FAO/OMS, pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI) e pela Associação Europeia de Alimentos e Culturas para Alimentação Animal (EFFCA), os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde dos consumidores (Vandenplas *et al.*, 2015). Tais definições proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (Williams, 2010). Considerando os microrganismos utilizados nos probióticos, como as espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus* e *Bacillus* (Khaneghah *et al.*, 2020; Plaza-Dias *et al.*, 2019), as quais

possuem a capacidade de competir com patógenos, produzir compostos antimicrobianos e modular o sistema imunológico do hospedeiro (Anne *et al.*, 2021), este estudo teve como objetivo avaliar o potencial dos probióticos no controle de doenças específicas do cafeeiro, como a ferrugem, a cercosporiose, a mancha de Phoma e a mancha aureolada, ao mesmo tempo em que investigou sua capacidade de promover o crescimento de mudas de cafeeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle biológico de doenças

O controle biológico de doenças pode ser considerado como a atividade de um ou mais organismos vivos atuando, de forma direta ou indireta, no sítio de infecção do patógeno, reduzindo a população do inóculo ou das suas atividades determinantes para a expressão da doença na planta. Esta atividade pode ocorrer de forma natural ou induzida, isolada ou associada (Bettiol, 1991; Köhl *et al.*, 2019).

A utilização de agentes de controle biológico tem sido amplamente adotada na agricultura como uma alternativa eficaz para o gerenciamento de doenças. Além disso, esses agentes desempenham um papel fundamental na redução do uso de defensivos químicos, na preservação da biodiversidade e na promoção da agricultura de baixa emissão de carbono (Baker *et al.*, 2020; Cabi, 2022).

Bacillus e *Trichoderma* são exemplos de agentes de controle biológico com registro no Ministério da Agricultura (MAPA) para o controle de doenças radiculares e foliares em diversas culturas. Esses agentes são indicados para o controle de fitopatógenos, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola* e *Hemileia vastatrix* entre outros (Agrofit, 2022).

Os agentes de controle biológico atuam frente aos fitopatógenos por meio de diversos mecanismos que mitigam o estabelecimento, o desenvolvimento ou a multiplicação no campo (Backer, 1968; O'Brien, 2017; Ram *et al.*, 2018). As interações entre antagonistas e fitopatógenos podem ser descritas a partir da antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de resistência do hospedeiro (Bettiol; Morandi, 2009; Köhl *et al.*, 2019).

A antibiose é comumente presente na interação antagonista-patógeno. A inibição ocorre pela atividade de metabólitos produzidos pelo antagonista que podem inviabilizar o crescimento morfológico ou a manutenção da atividade fisiológica do fitopatógeno (Bettiol, 1991; Köhl *et al.*, 2019; Raaijmakers *et al.*, 2002). Vários agentes de controle biológico são responsáveis pela produção de metabólitos que podem atuar frente a um ou mais patógenos, aumentando sua efetividade de controle (Ram *et al.*, 2018). Espécies de *Bacillus* são amplamente utilizadas no mercado de bioprotetores e são conhecidas pela capacidade de produzirem metabólitos como biosurfactantes e

bacteriocinas que possuem atividade inibitória frente a fungos e bactérias fitopatogênicas (Borris, 2015; Ben Khedher *et al.*, 2020; Khochamit *et al.*, 2015).

Os microrganismos também podem competir entre si por espaço e nutrientes na busca pelo estabelecimento no ambiente natural (Köhl *et al.*, 2019). Muitos antagonistas possuem a capacidade de sintetizarem moléculas que capturam elementos essenciais e pela depleção de nutrientes privam o crescimento dos fitopatógenos (Freimoser *et al.*, 2019). O ferro, por exemplo, é um micronutriente essencial para todos os microrganismos. Algumas cepas de *Trichoderma* agem pela produção de sideróforos que conseguem quelatizar o ferro disponível no sistema e pela limitação nutricional estabelecida inviabilizam o crescimento dos patógenos (Köhl *et al.*, 2019; Segarra *et al.*, 2010). Ainda, alguns agentes de controle biológico impedem a penetração dos patógenos no tecido do hospedeiro pela formação de biofilme nos sítios de infecção (Di canito *et al.*, 2021).

Outro mecanismo importante é o parasitismo, no qual um microrganismo parasita o outro. Alguns microrganismos se destacam pela capacidade de hiperparasitismo frente a patógenos fúngicos (Ram *et al.*, 2018). Por exemplo, espécies de *Trichoderma* possuem um aparato enzimático como glucanases, proteases e quitinases que são capazes de penetrar nas hifas e nas estruturas de sobrevivência e de reprodução dos fitopatógenos, destruindo seu conteúdo citoplasmático e inviabilizando a manutenção da sua atividade fisiológica (Monte *et al.*, 2019).

No ambiente natural alguns organismos também atuam como predadores de fitopatógenos utilizando-os como fonte de alimento e remetendo o princípio básico da predação (Bettiol, 1991). Também é relevante mencionar que, de forma induzida ou natural, certas cepas de microrganismos podem contribuir para a redução de doenças transferindo características genéticas de hipovirulência para cepas patogênicas, diminuindo sua patogenicidade (Fulbright *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 2010).

A indução de resistência do hospedeiro aos estresses bióticos é um mecanismo indireto pelo qual os agentes de controle biológico atuam frente aos fitopatógenos (Sharif; Ryu, 2016; Vejan *et al.*, 2016). Muitos antagonistas, por meio da presença ou produção de metabólitos secundários, estimulam as plantas hospedeiras a ativar suas vias metabólicas ou genes de defesa buscando reduzir o estresse biótico (Liu *et al.*, 2020).

Microrganismos também contribuem para o crescimento das plantas atuando na aquisição ou disponibilização de recursos, seja pela produção de fitohormônios, a

fixação biológica de nitrogênio e a solubilização e mineralização de importantes nutrientes como fósforo, potássio e ferro (Glick; Babalola, 2017; Glick, 2012; Olanrewaju; Kumar *et al.*, 2020).

Os modos de ação são descritos para elucidar de forma sucinta a atividade dos agentes de controle biológico frente aos fitopatógenos, porém, elencar a utilização de um mecanismo de forma isolada no controle da doença pode ser equivocada. É importante ressaltar que no campo, os agentes de controle biológico muitas vezes atuam de forma combinada e sinérgica, empregando uma variedade de mecanismos para mitigar a expressão de doenças nas plantas (Köhl *et al.*, 2019).

2.2 Bactérias promotoras do crescimento de plantas

No ambiente natural, diversas interações ocorrem entre microrganismos e plantas, sejam elas benéficas, neutras ou prejudiciais (Hassani *et al.*, 2018). Nas interações benéficas entre plantas e bactérias, a maior atividade ocorre na rizosfera devido a disponibilidade de nutrientes, açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos provenientes da exsudação radicular. No entanto, bactérias também estão presentes na filosfera, vivendo de forma epifítica, ou na endosfera de forma endofítica (Dong *et al.*, 2019).

Nessas interações, as bactérias podem contribuir para a promoção do crescimento das plantas de várias maneiras, incluindo a aquisição ou disponibilização de recursos, a modulação dos níveis de fitohormônios e a inibição de patógenos que, indiretamente, contribuem para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Entre os mecanismos diretos de promoção de crescimento destacam-se a capacidade de produzir hormônios vegetais, como o ácido indol-acético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas, a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização e mineralização de nutrientes essenciais, como fósforo e potássio, e a maior resistência a estresses abióticos (Glick, 2012; Kumar *et al.*, 2020).

A produção de ácido indol-acético pelas bactérias pode contribuir para a promoção do crescimento estimulando a divisão e diferenciação celular (Spaepen; Vanderleyden, 2011). As citocininas produzidas estimulam o desenvolvimento das raízes e a formação de pelos radiculares, enquanto as giberelinas podem atuar

diretamente nos processos de germinação de sementes, divisão celular e alongamento do caule (Pathania *et al.*, 2020).

Bactérias fixadoras de nitrogênio utilizam a enzima nitrogenase para fixar nitrogênio atmosférico e esse processo envolve genes *nif*, podendo ser utilizado tanto por bactérias diazotróficas de vida livre quanto simbióticas (Hayat *et al.*, 2010).

Apesar da abundância de fósforo no solo, muitas vezes ele se encontra em uma forma não prontamente disponível nem assimilável pelas plantas (Sharma *et al.*, 2013). Nesse contexto, as bactérias desempenham papel crucial, uma vez que possuem a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos e mineralizar fosfatos orgânicos, contribuindo significativamente para estimular o crescimento das plantas pela sua disponibilização. A solubilização ocorre por meio da produção de ácidos de baixo peso molecular, como o ácido cítrico e o ácido glucônico, enquanto a mineralização é facilitada por enzimas, tais como a fosfatase (Glick, 2012; Hayat *et al.*, 2010).

Da mesma forma, o ferro é abundante no solo, mas geralmente não é facilmente assimilado pelas plantas devido à sua forma predominante, o íon férrico (Fe^{3+}), que é insolúvel (Colombo *et al.*, 2014). As bactérias podem desempenhar um papel crucial na melhoria da disponibilidade de ferro no sistema por meio da produção de sideróforos, que têm alta afinidade com as moléculas de ferro, formando complexos ferro-sideróforo solúveis que podem ser absorvidos por meio de receptores de membrana e, posteriormente, disponibilizados para as plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Dadas as vantagens oferecidas, as bactérias promotoras do crescimento de plantas são consideradas uma alternativa viável e segura que pode contribuir estrategicamente para a redução da utilização de fertilizantes químicos no sistema (Pathania *et al.*, 2020).

2.3 Probióticos

Probióticos são considerados ingredientes alimentares microbianos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde dos consumidores. Esses microrganismos vivos, quando ingeridos ou aplicados localmente em quantidades suficientes, demonstram proporcionar um ou mais benefícios comprovados à saúde do hospedeiro (Vandenplas *et al.*, 2015). Essas

definições sugerem que a ingestão de probióticos tem um impacto positivo na saúde do hospedeiro (Williams, 2010). Esses conceitos são compartilhados de maneira semelhante por várias organizações, incluindo a Food and Agriculture Organization (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI) e a Associação Europeia de Alimentos e Culturas para Alimentação Animal (EFFCA).

Para que esses microrganismos sejam seguros e eficazes aos animais, eles devem atender a requisitos específicos estabelecidos pela FAO/OMS, como a identificação dos microrganismos em nível de espécie e a comprovação de sua capacidade de sobreviver nas condições do ambiente, incluindo a tolerância ao ácido gástrico, à bile e às enzimas digestivas, bem como a resistência às bactérias que são patogênicas aos humanos e animais (Vandenplas *et al.*, 2015). A pureza e a segurança dos probióticos também devem ser avaliadas antes de estudos *in vivo* serem realizados para comprovar seus benefícios à saúde (Ganguly *et al.*, 2011; Morelli; Capurso, 2012).

Os probióticos podem ser administrados de várias formas, incluindo formulações encapsuladas, comprimidos, líquidos ou pós, e podem conter um ou mais microrganismos. Esses microrganismos são frequentemente bactérias lácticas, como espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, leveduras como *Saccharomyces* e *Streptococcus* e algumas espécies de *Bacillus* (Khaneghah *et al.*, 2020; Plaza-Dias *et al.*, 2019). A combinação desses microrganismos é comum devido aos benefícios sinérgicos que oferecem na supressão de patógenos e na eficácia da colonização no hospedeiro (Williams, 2010).

Uma vez administrados, os probióticos competem com os patógenos, impedindo sua adesão no trato gastrointestinal, produzindo compostos antimicrobianos, reduzindo o pH intestinal, promovendo a proliferação de microflora benéfica e modulando o sistema imunológico do hospedeiro (Anne *et al.*, 2021).

Além de seu uso na saúde humana (Ghasemian, 2018; Ibrahim *et al.*, 2021), os probióticos têm sido amplamente empregados na produção e saúde animal, como na avicultura, onde ajudam a reduzir contaminações por *Salmonella* spp., um grande desafio sanitário em frangos de corte (Redweik *et al.*, 2020; Vandeplass *et al.*, 2010). Na suinocultura, os probióticos protegem os animais contra microrganismos prejudiciais, como *Escherichia coli*, contribuindo para seu desempenho e crescimento (Hayakma *et al.*, 2016). Os probióticos também são utilizados na piscicultura para

controlar bactérias patogênicas, como *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* (Cao *et al.*, 2011; El-Saadony *et al.*, 2021; Pirarat *et al.*, 2006).

No setor agrícola, embora haja poucos estudos sobre o potencial dos probióticos no controle de doenças em plantas, frutos e grãos, as bactérias do ácido láctico, comumente encontradas nesses produtos, demonstram atividade antimicrobiana e podem ter potencial no controle de patógenos (Liu *et al.*, 2014). Alegre *et al.* (2011) verificaram que *Lactobacillus rhamnosus* foi utilizado com sucesso na redução do do patógeno *Listeria monocytogenes* é frequentemente encontrado em alimentos como em maçãs minimamente, contribuindo assim para a manutenção da qualidade dos frutos durante o armazenamento. Além disso, bactérias probióticas como *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus delbruecki* têm mostrado potencial no controle de *Aspergillus parasiticus* em grãos de amendoim, reduzindo a produção de aflatoxinas pelo fungo (Silva *et al.*, 2015).

É importante também ressaltar que as bactérias do ácido láctico, que são em grande parte componentes dos probióticos, também são encontradas em diversos ambientes, como a rizosfera, a filosfera e a endosfera (Liu *et al.*, 2014). Na filosfera, de acordo com Di Cagno *et al.* (2013), a concentração dessas bactérias varia entre 10^2 e 10^4 UFC/g, e, além disso, de acordo com Fhoula *et al.* (2013), as bactérias do ácido láctico encontradas na rizosfera exibem atividade antimicrobiana.

Considerando estes aspectos, outros estudos devem ser conduzidos para explorar o potencial desses microrganismos em vários contextos, além da saúde humana e animal, devido à sua eficácia comprovada contra patógenos e à sua aplicação potencial no controle de doenças em plantas.

2.4 Doenças do cafeeiro

2.4.1 Ferrugem (*Hemileia vastatrix*)

A ferrugem é considerada a principal doença do cafeeiro causando a queda precoce de folhas e a seca de ramos que levam a perdas de produtividade e qualidade. Com distribuição cosmopolita, em condições favoráveis a ferrugem pode causar perdas na produção que variam de 35 a 50% (Meira *et al.*, 2009; Zambolim, 2016). A ferrugem é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* que possuem

urediniósporos reniformes com parede hialina, equinulados dorsalmente, lisos ventralmente e representam o ciclo assexuado da doença, onde penetram, esporulam e reinfectam as folhas penetrando pelos estômatos em condições ambientais favoráveis. Os teliósporos raramente ocorrem e são caracterizados por serem unicelulares, globosos, lisos e que germinam “*in situ*” que culminará na formação dos basidiósporos (Talhinhas *et al.*, 2017).

A germinação e infecção dos urediniósporos da ferrugem nas folhas do café são dependentes da temperatura, umidade e luminosidade. Faixas de temperatura entre 21 a 24 °C, ausência de luminosidade e molhamento foliar mínimo de 24 horas são consideradas condições ideais. Temperaturas superiores a 28 °C e abaixo de 15 °C, a presença de luz e baixa umidade afetam diretamente a germinação dos urediniósporos e a infecção (Zambolim, 2016).

Os urediniósporos são disseminados pelo vento e pela chuva e após a adesão nas folhas com a presença de água, temperatura ótima de 22 °C e ausência de luz, inicia-se o processo de germinação, formação do apressório e penetração pelos estômatos (Zambolim, 2016). A colonização intercelular dos tecidos ocorre pela formação e diferenciação das hifas em haustórios que evoluem até as células do parênquima esponjoso, paliçádico e epiderme superior, permitindo assim visualização dos sintomas iniciais de clorose amarelo-pálida que evoluem para pústulas de coloração alaranjada com a projeção dos urediniósporos (Silva *et al.*, 2006).

No campo, nos anos de alta produtividade é quando se observa as maiores incidências e severidade da doença, com início em regiões de altitude (acima 800 m) em meados de dezembro/janeiro e com pico em junho/julho. Em contrastes, os anos seguintes são caracterizados por menor incidência da doença com pico da doença entre maio e setembro (Zambolim, 2016).

Visando minimizar os impactos da doença no campo, o manejo da ferrugem é realizado por meio de variedades resistentes e aplicação de fungicidas registrados para a cultura do café como triazóis, dicarboximidas, estrobilurinas e cúpricos que são utilizados de forma associada ou não (Agrofit, 2022; Sera *et al.*, 2022). Em geral os fungicidas cúpricos são utilizados de forma preventiva e são indispensáveis para reduzir a pressão de seleção dentro da população do patógeno, haja visto os problemas da resistência do fungo aos grupos dos triazóis, estrobilurinas e dicarboximidas (Silva, *et al.*, 2019). No entanto, no manejo da ferrugem os cúpricos

são utilizados em mistura ou de forma intercalada com os fungicidas sistêmicos como os triazóis ou carboxamidas com pulverização de estrobilurina (Sera *et al.*, 2022).

A aplicação de produtos biológicos também é realizada de forma integrada aos químicos no manejo da ferrugem do café. Atualmente no mercado estão disponíveis cinco fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis* e *Bacillus pumilus* formulados em suspensão concentrada (Agrofit, 2023).

O uso de variedades resistentes, quando disponíveis na região produtora, é considerada uma das medidas preventivas de maior importância para mitigar a doença no campo. Contudo, grande parte das cultivares são suscetíveis ao patógeno e mesmo as com resistência vertical tem tido vida útil curta com quebra da resistência de 4 a 6 anos após o lançamento (Zambolim, 2016).

2.4.2 Cercosporiose ou mancha de olho pardo (*Cercospora coffeicola*)

A cercosporiose é uma das doenças mais antigas do café, sendo responsável por grandes danos em regiões produtoras que possuem déficit na fertilidade do solo (Nelson, 2008; Zambolim, 2016). Lavouras mal manejadas, com plantas enfraquecidas por desequilíbrio nutricional e o transplante realizado em solos secos, arenosos e mal drenados estão sujeitas à ocorrência da doença. A severidade é agravada quando as plantas estão expostas ao uso intensivo de fungicidas sistêmicos por longos períodos e com ampla exposição da cultura a insolação no período da tarde (Souza *et al.*, 2012; Zambolim, 2016). Lavouras com nutrição desequilibrada, principalmente quanto a disponibilidade de nitrogênio ou excesso de potássio estão sujeitas ao ataque do patógeno (Pozza *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2010).

Os cafeeiros estão sujeitos a infecção do patógeno durante todo seu ciclo vegetativo e reprodutivo com a formação de lesões circulares de coloração variando do pardo-clara a marrom escuro e o centro com coloração branco acinzentado (Nelson, 2008; Silva *et al.*, 2016). As lesões podem se desenvolver tanto nas folhas como nos frutos. Nas folhas, a presença de uma única lesão pode causar a sua queda (Vale *et al.*, 2021). Nos frutos contendo a lesão, a face exposta ao sol desenvolve manchas necróticas com coloração marrom ou arroxeada levando a um acelerado processo de maturação que pode causar a queda prematura dos frutos e em lesões mais antigas ocorre o ressecamento da casca ficando retida junto ao pergaminho, prejudicando o beneficiamento pós-colheita (Zambolim *et al.*, 2016).

A formação das lesões também é diretamente influenciada pelas características fisiológicas do patógeno devido à produção de toxinas como a cercosporina que, sob constante presença de luz, reagem com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio que são altamente prejudiciais na manutenção da atividade fisiológica das células do hospedeiro (Andrade *et al.*, 2021).

A reprodução do agente causal da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) no ambiente ocorre assexuadamente com a formação de conidióforos multiseptados, de coloração amarronzada e dispostos de forma irregular no estroma culminando com a liberação de conídios hialinos que são formados principalmente no período noturno ou dias frios nublados (Zambolim, 2016). O fungo é necrotrófico sobrevivendo nos restos culturais até a completa decomposição dos tecidos e reprodução pela disseminação dos conídios (Andrade *et al.*, 2021).

A disseminação dos conídios no campo é realizada pelo vento e a água e quando em contato com o hospedeiro na presença de alta umidade e temperatura na faixa de 20 a 28 °C germinam e com a liberação do tubo germinativo penetram na cutícula da planta (Nelson, 2008). Condições de alta temperatura e umidade podem favorecer que novas infecções e esporulações ocorram em um período entre 7 a 10 dias. Embora presente no campo durante o ano todo, os maiores prejuízos causados pelo patógeno são observados durante o período de formação dos frutos, que vai de janeiro a meados de abril e maio, tornando o monitoramento durante este período, imprescindível para o manejo da doença (Lu *et al.*, 2022; Patricio; Braghini, 2011).

O manejo cultural da doença inicia-se no viveiro com a preparação e condução das mudas em substrato adequadamente adubado, principalmente em relação à adubação com nitrogênio e potássio, além de controlar o excesso de umidade no substrato e a insolação sobre as mudas (Botelho *et al.*, 2011; Patricio; Braghini, 2011).

Durante o período que antecede o transplântio para o campo, as mudas devem ser tratadas com produtos à base de cobre e mancozebe de forma alternada visando prevenir o ataque da doença (Zambolim, 2016). No campo é recomendado evitar o transplântio em solos muito arenosos e monitorar durante todo o ciclo os aspectos relacionados a fertilidade da cultura (Patricio; Braghini, 2011).

Como o maior pico de disseminação da *Cercospora* ocorre de forma simultânea com a expansão da ferrugem no campo, o manejo químico de ambas as doenças é realizado de maneira conjunta e integrada por meio do uso de fungicidas cúpricos e a mistura de triazóis com estrobirulinas (Patricio; Braghini, 2011). Atualmente nenhum

produto biológico possui registro no MAPA para o controle de *C. coffeicola*, tornando o uso dos fungicidas químicos e o controle cultural da doença as únicas ferramentas disponíveis para o manejo integrado no campo (Agrofit, 2023).

2.4.3 Mancha de Phoma (*Boeremia exigua* pv. *coffea*)

A mancha de Phoma é uma doença que acomete a cultura do café principalmente em regiões de altitude com clima relativamente ameno ou em locais com menor altitude, porém sujeito a ventos intensos e frio, que tornam a condição ideal para o desenvolvimento do patógeno (Zambolim, 2016). A mancha de Phoma é causada pelo patógeno *Boeremia exigua* pv. *coffea*, anteriormente conhecido como *Phoma tarda* (Aveskamp *et al.*, 2010). O patógeno causa lesões nas folhas jovens e evoluem até morte dos ramos, flores e frutos que, quando novos, apresentam aspecto mumificado reduzindo o número por rosetas e por consequência, a produtividade (Patricio; Oliveira, 2013). As lesões são caracterizadas por manchas irregulares de coloração negra que podem tornar o limbo foliar retorcido seguido de necrose e queda das folhas. Em condições favoráveis, a doença pode promover intensa desfolha no campo (Zambolim, 2016).

A reprodução do patógeno ocorre por meio da produção de picnídios que são facilmente visualizados nas lesões, caracterizados como pequenas pontuações negras e que, após a sua ruptura, liberam os conídios para o ambiente para um novo ciclo (ZAMBOLIM 2016).

Baseado nas condições ideais de desenvolvimento de patógeno no campo com temperaturas entre 16 e 20 °C, em regiões de altitude, os sintomas são observados principalmente entre os meses de setembro e outubro ou março e abril, sendo crucial o monitoramento para o manejo da doença durante os meses que antecedem este período (Patricio; Oliveira, 2013; Zambolim, 2016).

Viveiros devem iniciar o manejo da doença prevenindo que o transplante no campo seja realizado com mudas infectadas com o patógeno. Para tanto, é recomendado que as mudas sejam conduzidas em locais drenados com controle do excesso de umidade pela irrigação, protegido de correntes de ventos além do controle da aeração entre mudas através do espaçamento e aplicações de fungicidas químicos no período crítico da ocorrência da doença (Zambolim, 2016).

O manejo da doença é iniciado com a escolha do local da implantação da lavoura, sendo recomendado evitar regiões com a forte presença de ventos frios que favorecem a doença ou manejar a lavoura com a instalação de quebra-ventos (Ferrão *et al.*, 2017; Zambolim, 2016). No campo, o manejo químico é imprescindível para mitigar os danos da doença sendo ideal realizar aplicações pós-colheita, pré e pós-florada em regiões com alta pressão do patógeno (Zanardo *et al.*, 2014). Os fungicidas químicos à base de boscalida, piraclostrobina, difenoconazole + pidiflumetofem e trifloxistrobina + tebuconazol têm sido recomendados para o manejo da doença visando reduzir a pressão do patógeno, garantindo a uniformidade dos frutos nas rosetas e conseqüentemente, a manutenção da produtividade (Agrofit, 2023; Penaro *et al.*, 2018; Zanardo *et al.*, 2014).

Não existe produto biológico recomendado para o controle da mancha de Phoma até o momento (Agrofit, 2023).

2.4.4 Mancha Aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*)

A mancha aureolada do cafeeiro, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, é uma doença que pode causar danos em larga escala tanto em condições de campo quanto viveiros. Estima-se que os danos com a doença podem chegar até a 70% (Badel; Zambolim, 2019; Rodrigues, 2019). Por muitos anos no Brasil, foi considerada uma doença secundária frente às demais. Porém, nos últimos anos tornou-se uma das mais importantes do café cultivado em regiões de altitude (Patricio *et al.*, 2021). No Brasil, com a migração do cultivo do café das regiões mais baixas para regiões de maior altitude e por consequência, a exposição as condições adequadas à ocorrência da doença, a doença vem causando danos no cultivo do café em altitude (Mariuccl Junior *et al.*, 2019; Patricio *et al.*, 2021).

Condições de alta precipitação e a constante presença de água nos tecidos foliares são consideradas ideais para a penetração da bactéria via estômatos, hidatódios ou nas injúrias que foram causadas pelo vento, chuva ou resultante dos tratamentos culturais realizados de forma mecânica (Zambolim, 2016).

A doença causa lesões nas folhas, ramos, flores e frutos em formação que são caracterizadas por manchas irregulares de coloração padro-escuro podendo ou não serem envolvidas por um halo clorótico de coloração amarelada. É comum que nas lesões foliares o tecido necrosado seja degradado formando um furo ao centro da

lesão. Nas flores, frutos e ramos é observado uma necrose descendente, caracterizando a translocação da doença nos feixes vasculares que são seguidos de necrose e morte dos meristemas (Badel; Zambolim, 2019; Patricio *et al.*, 2021; Zambolim, 2016). O patógeno sobrevive nos restos culturais tanto em folhas quanto frutos e sementes do café (Badel; Zambolim, 2019).

O manejo da doença nos viveiros deve ser realizado com a instalação de quebra-ventos impedindo a exposição das mudas aos ventos frios, controle da umidade excessiva para mitigar a proliferação da bactéria além do uso de fungicidas cúpricos com ditiocarbamatos (Zambolim, 2016). O manejo químico da doença é realizado de forma preventiva com a aplicação de produtos à base de cobre e o bactericida kasugamicina que podem ser utilizados tanto em condições de campo quanto nos viveiros visando reduzir os sintomas da doença e mitigar sua proliferação (Patricio *et al.*, 2021).

No Brasil, em alguns estudos foi observado que *Coffea arabica* cultivar IPR 102 foi totalmente resistente à doença sob condições naturais de campo, assim como a cultivar IAPAR-59 que foi potencialmente resistente. Porém, quando inoculado de forma artificial a mesma resistência não foi relatada, possivelmente pela distinção de cepa de *P. syringae* (Badel; Zambolim, 2019).

Cultivares selvagens de *C. arabica* oriundas do Quênia foram estudadas no Brasil quanto à resistência a cepas de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* sendo observado que todas foram consideradas resistentes a diversas cepas das duas espécies de *Pseudomonas*, indicando um diverso *pool* genético para atribuir resistência à doença em estudos de melhoramento futuros (Rodrigues *et al.*, 2021).

Atualmente, não há produto biológico registrado no Brasil para o controle da doença (Agrofit, 2023).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Probióticos utilizados nos experimentos

Cinco probióticos, sendo quatro da área animal e um da área humana, foram selecionados para avaliar potencial no controle biológico de doenças e na promoção do crescimento de plantas de café. Os probióticos utilizados na área animal foram cedidos pela empresa Biocamp Ltda. e o de uso humano foi adquirido em farmácias (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição dos probióticos utilizados nos estudos

Probiótico	Composição	Concentração	Fornecedor
Colostrum® BIO 21 Líquido	<i>Enterococcus faecium</i> (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158)	1x10 ⁸ UFC/mL	Biocamp Laboratórios Ltda.
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LOFU 63)		
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (LOFU 65)		
	<i>Lactobacillus plantarum</i> (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147)		
	<i>Lactobacillus reuteri</i> (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48)		
	<i>Lactobacillus salivarius</i> (LOFU 44)		
	<i>Pediococcus acidilactici</i> (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82)		
	<i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)		
	<i>Enterococcus faecium</i> (LOFU 84, LOFU 124, LOFU 140, LOFU 145, LOFU 146, LOFU 158)		
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LOFU 63)		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (LOFU 65)			
<i>Lactobacillus plantarum</i> (LOFU 79, LOFU 83, LOFU 147)	1x10 ⁸ UFC/g	Biocamp Laboratórios Ltda.	
<i>Lactobacillus reuteri</i> (LOFU 18, LOFU 21, LOFU 22, LOFU 35, LOFU 48)			
<i>Lactobacillus salivarius</i> (LOFU 44)			
<i>Pediococcus acidilactici</i> (LOFU 57, LOFU 58, LOFU 82)			
<i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)			

Colostrum® BS (Formulado em pó)	<i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)	1x10 ⁸ UFC/g	Biocamp Laboratórios Ltda.
Colostrum® BS Líquido	<i>Bacillus subtilis</i> (LOFU 160)	1x10 ⁹ UFC/mL	Biocamp Laboratórios Ltda.
Enterogermina	<i>Bacillus clausii</i>	2x10 ⁹ UFC/mL	Sanofi Aventis

Os probióticos foram nomeados como: BS L (Colostrum® BS Líquido), BS PÓ (Colostrum® BS, formulado em pó), BIO 21 L (Colostrum® BIO 21 Líquido), BIO 21 PÓ (Colostrum® BIO 21 MIX, formulado em pó) e Enterogermina.

Os probióticos foram testados em experimentos *in vitro* e *in vivo* quanto ao potencial de controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), mancha de Phoma (*Boeremia exigua* pv. *coffea*) e mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) do cafeeiro. Além do controle dos fitopatógenos, os probióticos foram avaliados quanto ao potencial de promoção do crescimento de plantas de cafeeiro.

3.2 Experimentos in vitro

3.2.1 Inibição da germinação dos urediniósporos de *Hemilia vastratrix*

Folhas naturalmente infectadas com o patógeno apresentando presença dos urediniósporos nas lesões foram coletadas de cafeeiros no setor de fitopatologia do Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária do Instituto Biológico de São Paulo em Campinas – SP e levadas para laboratório. Com auxílio de capsulas de gelatina, os urediniósporos foram coletados raspando de forma direta nas lesões (Figura 1). As capsulas contendo os urediniósporos foram fechadas, envoltas com papel alumínio e armazenadas em potes vedados hermeticamente e com a presença de sílica em geladeira a ± 4 °C, até a instalação dos experimentos. Os experimentos para avaliar o potencial dos probióticos na inibição da germinação dos urediniósporos foram instalados em microplacas de 24 células, que foram preenchidas com meio de cultura ágar-água. Em seguida, suspensões dos probióticos foram preparadas em cinco concentrações, sendo a primeira diluição 10 vezes abaixo

da concentração comercial de cada produto. Sendo assim foram testadas as respectivas concentrações para cada probiótico (Tabela 2).

Figura 1 – Cápsula de gelatina contendo urediniósporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*)



Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

Tabela 2 - Descrição das concentrações testadas dos probióticos para o avaliar o potencial em inibir a germinação dos urediniósporos de *Hemileia vastatrix*

Probióticos	Concentrações testadas (UFC/mL ou g)
BIO 21 L	1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7
BIO 21 PÓ	1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7
BS PÓ	1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7
BS L	1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^6 , 1×10^8
Enterogermina	1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^6 , 1×10^8

Em cada célula da microplaca foram adicionadas 150 μ L de cada diluição dos probióticos. Em seguida, em cada célula, foram transferidos os urediniósporos com o auxílio de um pincel. Como controle foi utilizada apenas solução salina (NaCl 0,85%), a mesma utilizada para o preparo das suspensões. As microplacas foram vedadas, colocadas em câmara úmida e incubadas no escuro em B.O.D na temperatura de 22 ± 2 °C por 6 horas (Adaptado Shiomi *et al.*, 2006).

A avaliação da germinação dos urediniósporos foi realizada com a observação de cada célula em microscópio óptico, na qual foram contados 100 urediniósporos, determinando os números de germinados e não germinados. Foram considerados germinados os urediniósporos que apresentavam o comprimento do tubo germinativo igual ou maior que seu maior diâmetro. A porcentagem de germinação foi calculada para cada repetição. Os dados foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, quando normais, foram submetidos à análise de regressão ($p < 0,05$). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro

repetições, sendo cada repetição representada por uma célula. O experimento foi repetido duas vezes.

3.2.2 Inibição do crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*

O isolado de *C. coffeicola* IBLF 1312 da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo foi utilizado neste estudo. Discos do fungo foram transferidos para placas de petri de plástico esterilizadas (FIRSTLAB) contendo meio de cultura V8 e as placas foram mantidas, por 12 dias, em B.O.D, na temperatura de 28 ± 2 °C sob luz fluorescente constante. Discos de 6 mm contendo o micélio e meio de cultura foram coletados das bordas das colônias e transferidos para o centro de placas de Petri (Ø 60 mm) contendo meio de cultura V8. Na periferia da placa, com o auxílio de um furador, quatro poços equidistantes foram perfurados conforme Figura 2 (Adaptado de Dhingra; Sinclair, 2017). Em cada poço foram adicionados 50 µL da suspensão com a concentração de 1×10^7 UFC/mL ou g de cada probiótico. Como controle foi adicionado solução salina (NaCl 0,85%) nos poços. As placas foram mantidas em B.O.D a 25 °C por 12 dias sob luz fluorescente de 12 horas de luz por 12 horas de escuro. Cinco dias após a instalação do experimento, foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial do fungo, em dois eixos ortogonais, até que o mesmo atingisse a borda dos poços.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Foi testada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e estes foram submetidos a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O experimento foi repetido duas vezes.

Figura 2 - Placa de Petri com meio de cultura V8 e o disco do fitopatógeno ao centro com os poços na periferia contendo o probiótico

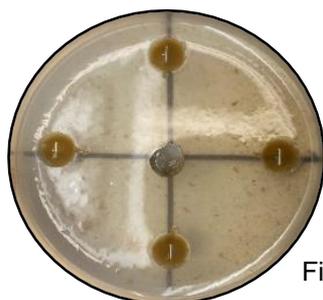


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

3.2.3 Inibição do crescimento micelial de *Boeremia exigua* pv. *coffea*

Para a realização dos experimentos, foi utilizado o isolado de *Boeremia exigua* pv. *coffea* IBLF 1199 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia, do Instituto Biológico de São Paulo. Discos do fungo foram transferidos para meio de aveia contido em placas de Petri e incubados em B.O.D na temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob com fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro por 7 dias. Discos de 6 mm de diâmetro contendo o micélio e meio de cultura foram coletados nas bordas das colônias e transferidos para o centro de placas de petri (\varnothing 90 mm) contendo meio de aveia. Quatro poços foram realizados nas extremidades das placas de forma semelhantes aos do experimento com *C. coffeicola*. Em cada poço foram adicionados 50 μL da concentração a ser testada de cada probiótico nas concentrações apresentadas na Tabela 3. Como controle foi utilizada solução salina (0,85%). As placas de Petri foram colocadas em B.O.D na temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas de luz por 12 horas de escuro por 11 dias. Avaliações diárias, em dois eixos ortogonais do crescimento do fungo, foram realizadas a partir do terceiro dia da transferência dos discos para as placas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade por Shapiro-Wilk e análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O experimento foi repetido duas vezes.

Tabela 3 - Descrição das concentrações testadas dos probióticos para o controle da *Boeremia exigua* pv. *coffea*

Probióticos	Concentrações testadas (UFC/mL ou g)
BIO 21 L	1×10^7
BIO 21 PÓ	1×10^7
BS PÓ	1×10^7
BS L	1×10^8
Enterogermina	1×10^8

3.3 Experimentos in vivo

3.3.1 Probióticos para o controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*)

Para avaliar o potencial de cada probiótico no controle da ferrugem do cafeeiro foram utilizadas mudas de cafeeiro da cultivar Topázio provenientes do município de Patrocínio–MG, contendo 3 a 4 pares de folhas verdadeiras. Os probióticos BIO 21 L, BIO 21 PÓ, BS L, BS PÓ e Enterogermina foram aplicados na concentração padronizada de 1×10^7 UFC/mL ou g de produto. Foram feitas três aplicações nas mudas das suspensões de cada probiótico, sendo a primeira sete dias antes da inoculação do patógeno, a segunda 24 horas antes e a terceira sete dias depois da inoculação. A aplicação dos produtos foi realizada com um pulverizador manual até ponto de escorrimento, em ambas as faces das folhas com um volume médio de aplicação por planta de 16 mL de calda. No tratamento controle foi aplicado água destilada.

O inoculo foi obtido em folhas de café conforme descrito no item 3.2.1. Foi preparada uma suspensão com 0,8 mg de urediniósporos/mL de água destilada e calibrada a concentração de urediniósporos em câmara de Neubauer em 1×10^5 urediniósporos/mL. A suspensão foi aplicada na face inferior das folhas com um pulverizador manual. Após a aplicação, as mudas foram acondicionadas em câmara úmida (95% UR) no escuro, por 72 horas. Em seguida as mudas foram transferidas para telado com irrigação por microaspersão com temporização automática de 4 mm a cada 24 horas, onde permaneceram até a visualização dos sintomas da doença.

As avaliações da severidade da doença nas folhas foram iniciadas no momento que apareceram os primeiros sintomas (esporulação). Foram feitas cinco avaliações da severidade da doença nas folhas por meio do registro de imagens fotográficas e posterior quantificação utilizando o software R pelo uso do pacote Pliman (Olivoto, 2022). A quantificação da severidade pelo software é obtida através do fornecimento de uma paleta de cores representando o limbo foliar saudável, os sintomas e o fundo da imagem.

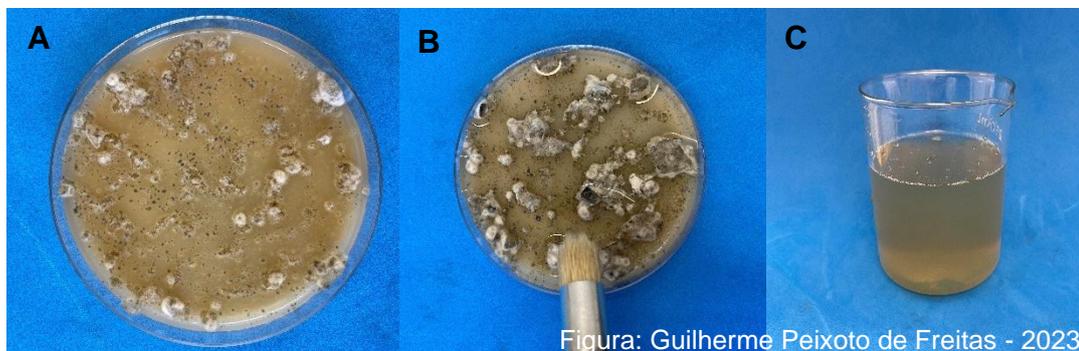
O experimento foi realização em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, cada repetição representada por uma muda de cafeeiro. Os resultados de severidade foram testados quanto a normalidade e transformados em arco seno da raiz quadrada de $X/100$ para atender os pressupostos estatísticos. Os dados foram

submetidos a análise de variância e ao teste de médias Tukey ($p < 0,05$). A partir dos resultados também foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) (Campbell; Madden, 1990). Os dados foram transformados em raiz de X para obter a normalidade. O experimento foi repetido duas vezes.

3.3.2 Probióticos para o controle da cercosporiose do cafeeiro (*Cercospora coffeicola*)

Mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo provenientes de Garça–SP foram aclimatadas por 15 dias sob telado no setor de fitopatologia no Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária do Instituto Biológico em Campinas – SP. As mudas foram tratadas com os probióticos na concentração de 1×10^7 UFC/mL ou g de produto, sendo a primeira aplicação sete dias antes, a segunda 24 horas antes e a terceira sete dias após a inoculação do fitopatógeno. A aplicação dos probióticos foi realizada com pulverizador manual, aplicando nas faces abaxial e adaxial das folhas até ponto de escorrimento. O volume médio de calda foi de 16 mL/planta. Como controle foi aplicada água destilada nas mudas. Para o preparo do inóculo de *C. coffeicola*, o isolado IBLF 1312 foi previamente crescido em meio V8 por 10 dias à 28 °C sob luz constante. Após o crescimento, discos contendo meio de cultura e micélio foram retirados e transferidos para cadinho esterilizado contendo 10 mL de água destilada autoclavada. Com auxílio de um pistilo em porcelana, o conteúdo presente no cadinho foi macerado até a obtenção de uma mistura homogênea. A mistura obtida foi transferida para uma placa de Petri contendo meio V8 com antibiótico (pentabiótico) e espalhado uniformemente com alça de Drigalski. As placas preparadas foram incubadas em B.O.D à 28 ± 2 °C por 72 horas sob regime constante de luz. Após o crescimento, as placas contendo o fungo foram raspadas com um pincel e água destilada e a suspensão obtida foi filtrada em gaze para a retenção de meio de cultura e micélio (Figura 3). A suspensão obtida teve a concentração dos conidióforos ajustada em 5×10^4 esporos/mL.

Figura 3 – A. Placa de petri com *Cercospora coffeicola*. B. Raspagem do micélio com o auxílio de pincel e água destilada. C. Suspensão dos conidióforos obtido após a filtragem e gaze



O inóculo preparado em suspensão foi inoculado nos três pares de folhas superiores das mudas na face inferior e a seguir transferidas para câmara por 72 horas à 28 °C com umidade relativa de 80% na ausência de luz. Em seguida as mudas foram transferidas para telado com irrigação por microaspersão com temporização automática de 4 mm a cada 24 horas, onde permaneceram até a visualização dos sintomas da doença. Duas avaliações foram realizadas com o registro fotográfico de imagens a partir do início dos sintomas. As imagens com os sintomas da cercosporiose nas folhas tiveram a severidade quantificada a partir do uso do *software R* utilizando o pacote Pliman (Olivoto, 2022).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com oito repetições, sendo cada repetição representada por uma muda. Os dados obtidos tiveram a normalidade testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram transformados para arco seno da raiz quadrada de $X/100$ e em seguida a análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O experimento foi repetido duas vezes.

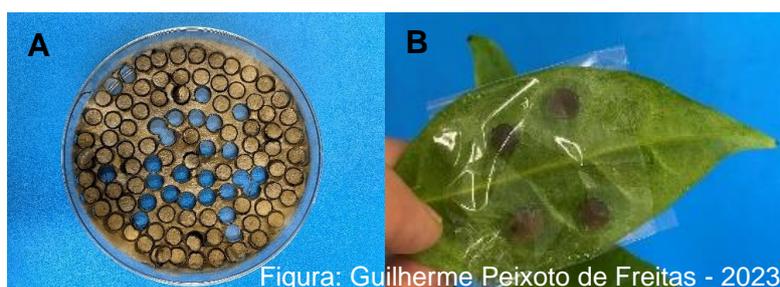
3.3.3 Probióticos para o controle de mancha de Phoma (*Boeremia exigua* pv. *coffea*)

Mudas de cafeeiro da cultivar Topázio foram adquiridas no município de Patrocínio – MG e levadas para o setor de fitopatologia do Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária do Instituto Biológico de São Paulo em Campinas – SP, onde foram aclimatadas por 15 dias em sob telado de sombrite. Os probióticos foram aplicados conforme descrito no item 3.3.2. O isolado de *B. exigua*

pv. *coffea* IBLF 1199 foi multiplicado em meio aveia por 10 dias à 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. Para a inoculação, após o crescimento, quatro discos de micélio ($\varnothing \pm 6$ mm) contendo meio de cultura foram coletados da placa de Petri e depositados na face abaxial das folhas. Foram inoculadas quatro folhas do terço superior e os discos foram fixados com fita adesiva (Figura 4). Como controle discos de micélio foram depositados nas folhas das mudas tratadas apenas com água destilada. Após a inoculação as mudas foram mantidas em câmara úmida em sacos plásticos e acondicionadas em B.O.D de 20 ± 2 °C na ausência de luz até a visualização dos sintomas. As folhas que foram inoculadas foram destacadas e avaliadas quanto a severidade da doença sete dias após a inoculação. A severidade foi quantificada por meio do registro de imagens e análise no *software* R através do uso do pacote Pliman (Olivoto, 2022).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, sendo uma muda para cada tratamento. O experimento foi repetido duas vezes e todos os dados obtidos de severidade foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quando não normais, foram transformados em arco seno da raiz de $X/100$. Em seguida os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 4 – A Placa de Petri com *Boeremia exigua* pv. *coffea*. B. Folha de café contendo quatro discos de micélio fixados na face abaxial com fita adesiva



3.3.4 Probióticos para o controle da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*)

Para o experimento de controle da mancha aureolada, mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo foram adquiridas no município de Garça – SP e levadas para o setor de fitopatologia do Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária do Instituto Biológico de São Paulo em Campinas – SP. As

mudas foram aclimadas por um período de 15 dias sob telado e irrigação conforme a necessidade da cultura até o momento da instalação do experimento. As mudas de cafeeiro foram tratadas com os probióticos com a concentração biológica ajustada em 10^7 UFC/mL ou g de produto. A aplicação dos probióticos nas mudas foi realizada com pulverizador manual aplicando em ambas as faces das folhas do café um volume de calda de 16 mL por planta. Os probióticos foram aplicados 7 dias e 24 horas antes da inoculação do patógeno. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* foi multiplicada inicialmente em meio de cultura ágar nutriente (NA) por 72 horas em B.O.D à 28 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento e visualização das colônias puras, a bactéria foi repicada para meio de cultura NA pelo método de estrias por esgotamento e submetida a crescimento nas mesmas condições anteriores. Uma suspensão bacteriana foi preparada lavando as placas com as colônias crescidas com água destilada. Após o preparo da suspensão foi realizado um ajuste óptico em espectrofotômetro a 65% de transmitância ($1,0 \times 10^7$ UFC/mL).

Três folhas do terço superior das mudas de café foram selecionadas para a inoculação. A inoculação foi realizada utilizando o método de ferimentos nas folhas com o auxílio de uma rolha contendo na ponta uma lixa de parede. O ferimento foi realizado pressionando levemente a rolha na face abaxial das folhas (Figura 5). Imediatamente após a realização dos ferimentos, as folhas foram inoculadas com a suspensão da bactéria com o auxílio de um borrifador manual. Como controle as mudas foram tratadas com água destilada. Após a inoculação da bactéria, as mudas foram mantidas em câmara úmida (80% UR) por 72 horas à 28 °C e após este período foram acondicionadas sob telado com irrigação por microaspersão com temporização automática de 4 mm a cada 24 horas, onde permaneceram até a visualização dos sintomas da doença. Aos 14 dias após a inoculação, as folhas inoculadas foram avaliadas quanto a severidade através do registro de imagens e análise no software R através do uso do pacote Pliman (Olivoto, 2022).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, sendo uma muda de café por repetição. O experimento foi repetido 2 vezes. Os dados de severidade obtidos foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 5 – A. Rolha com lixa utilizada para promover os ferimentos nas folhas.

B. Método utilizado para a realização dos ferimentos



3.4 Promoção de crescimento

3.4.1 Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em bandejas

Mudas de cafeeiro da cultivar Ouro verde, com um par de folhas verdadeiras foram cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC. Bandejas plásticas de 32 células com volume total de 2 litros foram fracionadas para manter oito células por repetição. As células foram totalmente preenchidas com substrato comercial Multiplant® (casca de pinus e vermiculita) próprio para o cultivo de mudas. As mudas foram previamente padronizadas quanto ao tamanho e realizada a poda do sistema radicular para auxiliar no momento do transplântio nas células (Figura 6).

Após o transplântio as mudas foram acondicionadas sob telado por 72 horas com irrigação por microaspersão com temporização automática de 4 mm a cada 24 horas. Posteriormente, as mudas foram tratadas com os probióticos com a aplicação de uma suspensão ajustada em 10^7 UFC/mL ou g de produto. O tratamento das mudas foi realizado aplicando as suspensões diretamente no colo das plantas, sendo utilizado um volume de 20 mL para cada célula. Foram realizadas três aplicações dos probióticos, sendo a primeira 72 horas, a segunda sete dias e a terceira 21 dias após o transplântio.

Quinzenalmente foram feitas avaliações do comprimento de parte aérea e aos 90 dias após a instalação foi avaliado o teor de clorofila com o uso de um medidor de clorofila SPAD-502 Plus. No final do experimento foram avaliados a massa fresca e seca de raiz e parte aérea, o volume radicular e área foliar total de cada planta. A área

foliar foi determinada com auxílio do registro fotográfico de imagens de todas as folhas destacadas por repetição e análise no *software* R utilizando o pacote Pliman (Olivoto, 2022) (Figura 7).

Para o teste foram utilizadas 8 repetições por tratamento e como controle foi feito o tratamento das mudas apenas com água destilada. Os dados obtidos dos parâmetros avaliados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida realizado a análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 6 – A. Muda de café com 1 par de folha verdadeira. B. Poda do sistema radicular da muda para facilitar o transplântio nas bandejas. C. Bandeja contendo as mudas transplântadas

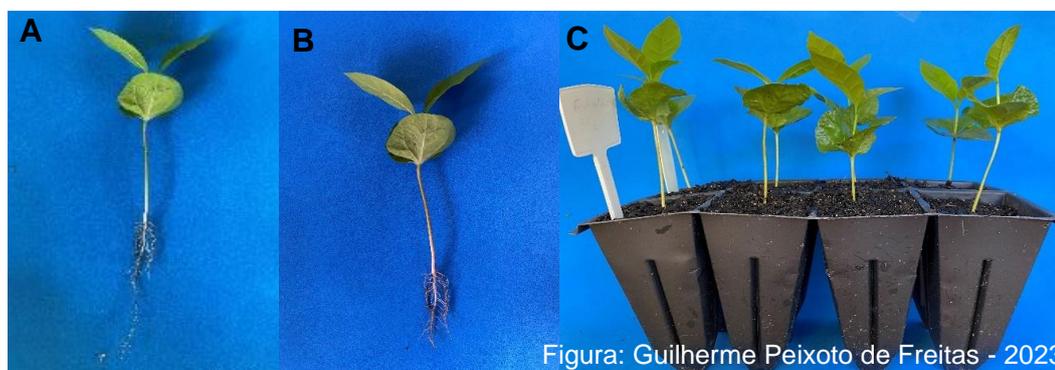


Figura 7 – Folhas de café para análise da área foliar total com objeto de referência em 4 cm²



3.4.2 Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em rizotrons

Mudas de café (cv. Mundo Novo) em tubetes com 5-6 pares de folhas foram cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC para a realização do

experimento. As mudas foram levadas para a Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna– SP onde permaneceram por cinco dias aclimatando em casa de vegetação. Um solo de mata foi coletado na Embrapa Meio Ambiente e peneirado para retirar excesso de raízes e particulados. O solo utilizado foi analisado quimicamente e os valores obtidos foram: 11 e 219 mg dm³ de P e de K; 1,5, 0,7, 3,2 e 0,10 cmolc/dm³ de Ca, Mg e H+Al, Al; 35, 1,9, 21,9 e 2,2 mg dm³ de Fe, Cu, Mn e Zn, respectivamente, além de 2 mg dm³ de Na e pH 5,3. O solo peneirado foi misturado e homogeneizado na proporção 3:1 (v/v) com o substrato comercial Trospstrato®, próprio para mudas de café. O substrato contém casca de pinus, vermiculita e superfosfato simples. No preparo da mistura foi utilizado dois gramas de calcário calcítico por litro para correção do pH da mistura (Figura 8).

Após o preparo, rizotrons (17,5 centímetros de diâmetro x 100 centímetros de comprimento) foram preenchidos com a mistura de solo:substrato e irrigados para que seu volume fosse totalmente preenchido. As mudas de café foram retiradas do tubetes com o substrato e tratadas com os probióticos adicionando a suspensão com os probióticos. Quatro probióticos e um tratamento utilizando levedura inativada (proveniente do processo fermentativo da cana de açúcar e inativada por calor), todos com a concentração ajustada em 10⁷ UFC/mL ou g de produto, para a levedura foi utilizado 100 gramas em 900 mL de água destilada. Como controle as mudas foram tratadas com água. O tratamento foi realizado colocando as mudas em um recipiente sendo adicionada a suspensão dos probióticos até que o volume de raiz e substrato estivessem totalmente imersos. As mudas permaneceram imersas por cinco minutos e imediatamente após a retirada, foram transplantadas para os rizotrons (Figura 9). Após as mudas serem transplantadas nos rizotrons, estes foram envoltos com plástico preto na face exposta para impedir a incidência de luz nas raízes e foram inclinados em ângulo de, aproximadamente, 45° para permitir o crescimento das raízes na face frontal e sua visualização. (Figura 10). Passados 15 dias da instalação do experimento, uma nova aplicação dos probióticos foi realizado aplicando no colo das plantas 100 mL da mesma concentração da anterior.

Durante o experimento as mudas foram irrigadas três vezes ao dia por 5 minutos com um volume total de 200 mL por rega/diária. O experimento foi conduzido por 120 dias e quinzenalmente foram avaliados os aspectos agrônômicos como altura de plantas, número de folhas e comprimento de raízes. Aos 90 dias após a instalação do experimento também foi avaliado o índice de clorofila utilizando o SPAD. Ao final do

experimento foram avaliados as massas frescas e seca de parte aérea e da raiz e o volume radicular.

Figura 8 – A. Solo original coletado na Embrapa Meio Ambiente. B. Substrato comercial. C. Mistura obtido da homogeneização do solo, substrato e calcário



O ensaio foi conduzido em blocos casualizados com seis repetições. Todos os dados obtidos dos parâmetros avaliados foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e após submetidos a análise variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 9 – A. Muda no tubete. B. Muda retirada do tubetes. C. Tratamento das mudas sendo imersas em suspensão dos probióticos. D. Muda transplantada para rizotron contendo a mistura de solo e substrato comercial

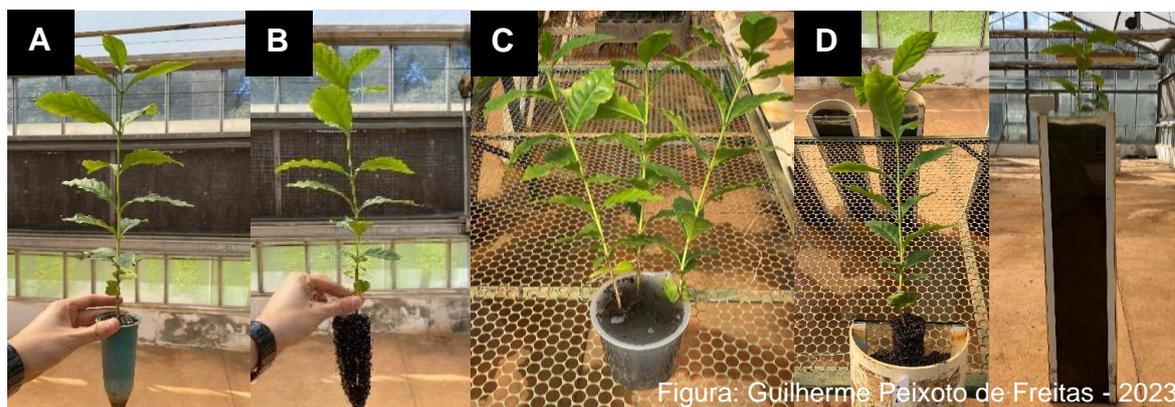


Figura 10 - Rizotrons contendo as mudas tratadas dispostos em ângulo de 45° para possibilitar o crescimento e a visualização das raízes na face frontal



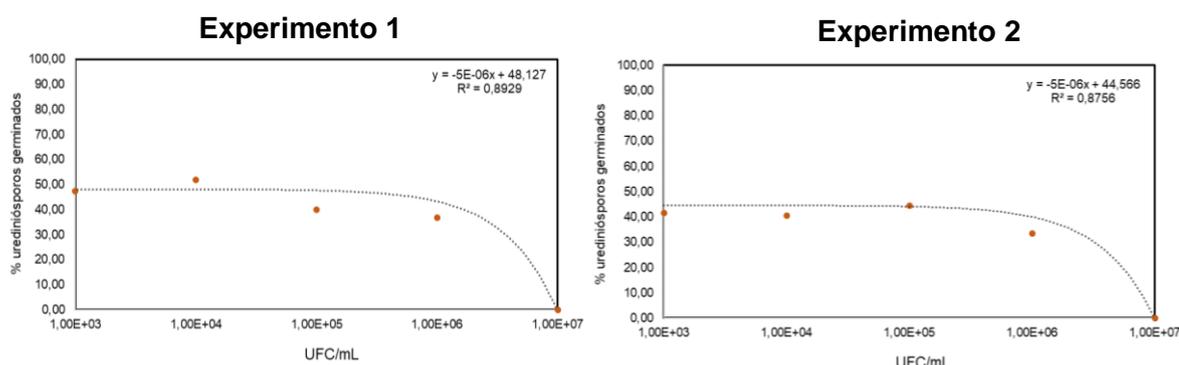
4 RESULTADOS

4.1 Experimentos in vitro

4.1.1 Inibição da germinação dos urediniósporos de *Hemileia vastatrix*

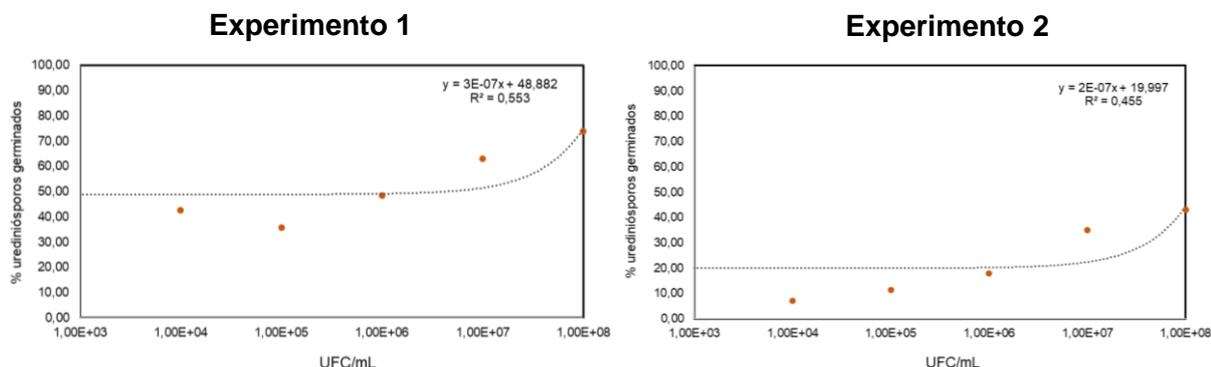
Nos dois experimentos realizados o probiótico BIO 21 L foi o único que inibiu em 100% a germinação dos urediniósporos na concentração de 10^7 UFC/mL (Figura 11). A concentração de 1×10^7 UFC/mL foi a mais eficiente entre as testadas. Quando comparada ao controle as concentrações de 1×10^6 e 10^5 UFC/mL reduziram significativamente a germinação dos urediniósporos. As concentrações do BIO 21 L foram estatisticamente significativas quando submetidas à análise regressão ($p < 0,05$), tendo o melhor ajuste no modelo linear.

Figura 11 – Efeito das concentrações em UFC/mL do probiótico BIO 21 L na germinação dos urediniósporos de *Hemileia vastatrix*



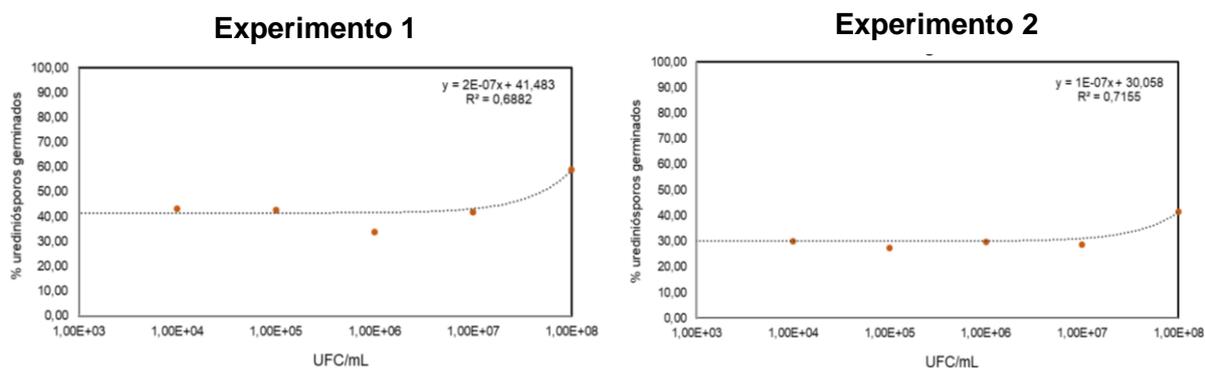
Para o probiótico BS L a redução da germinação dos urediniósporos foi inversamente proporcional à concentração do produto, sendo a concentração 1×10^4 UFC/mL mais eficiente que a 1×10^8 UFC/mL nos dois experimentos realizados (Figura 12). Os resultados foram significativos quando submetidos a análise de regressão com ajuste pelo modelo linear.

Figura 12 – Efeito das concentrações em UFC/mL do probiótico BS L na germinação dos urediniósporos de *Hemileia vastatrix*



Para a Enterogermina, a concentração de 1×10^6 e 1×10^7 UFC/mL apresentaram a maior redução da germinação dos urediniósporos nos dois experimentos realizados e foram significativos pela regressão com ajuste linear (Figura 13).

Figura 13 – Efeito das concentrações em UFC/mL do probiótico Enterogermina na germinação dos urediniósporos de *Hemileia vastatrix*

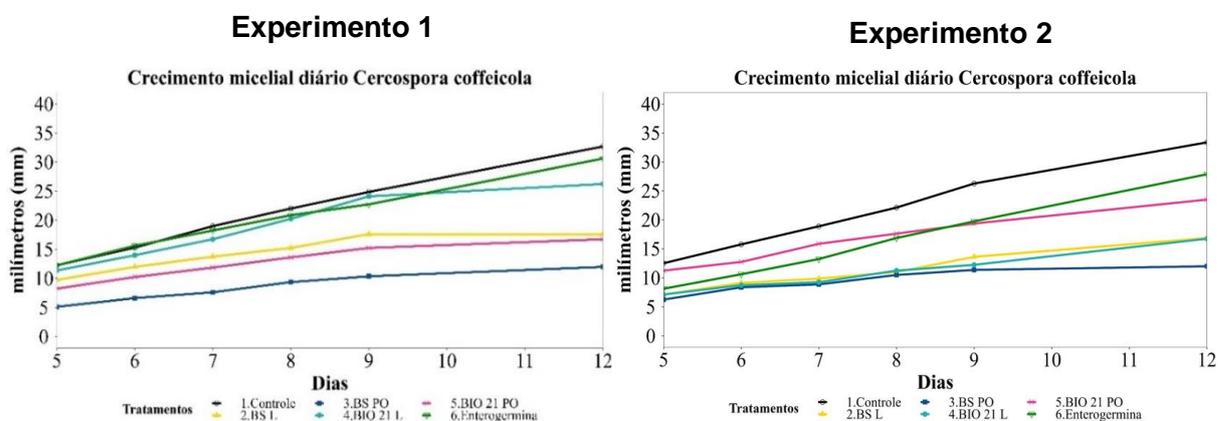


Os demais probióticos, BS e BIO 21 PÓ, não apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) quando realizada a análise de regressão.

4.1.2 Inibição do crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*

Os probióticos BS PÓ, BIO 21 PÓ e BS L reduziram o crescimento micelial do fitopatógeno no primeiro experimento. No segundo experimento, BS PÓ, BS L e BIO 21L foram os produtos que reduziram o crescimento micelial de *C. coffeicola* (Figura 14).

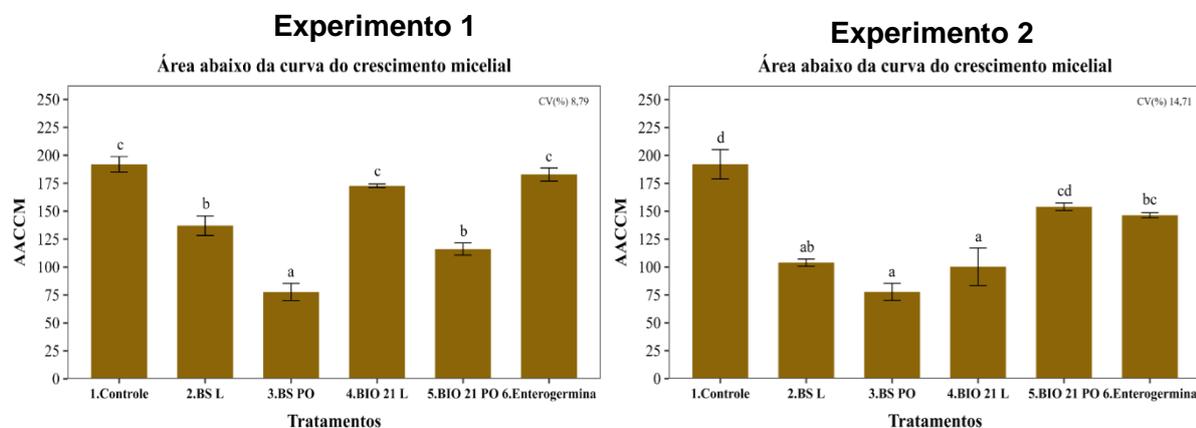
Figura 14 – Efeito de probióticos sobre o crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* nos dois experimentos realizados



No primeiro experimento, o probiótico BS PÓ foi o que apresentou a maior inibição do crescimento micelial de *Cercospora*, seguido do BIO 21 PÓ e do BS L, com 63,3, 48,8 e 46,1% de inibição. Também as áreas abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) foram reduzidas com esses probióticos (Figura 15). Enterogermina e BIO 21 L não inibiram o crescimento micelial (Figuras 15 e 16). No segundo experimento, os probióticos BS PÓ, BIO 21 L e BS L inibiram o crescimento micelial em 64,0, 49,8 e 49,4% e também reduziram a área abaixo da curva do crescimento micelial (Figura 14 e 15).

De acordo com a Figura 16 é possível visualizar a inibição promovida pelos probióticos BS PÓ, BIO 21 PÓ, BS L e BIO 21 L ao comparar com o tratamento controle (Figura 16). Os microrganismos presentes na formulação também apresentaram ação direta contra o patógeno *Cercospora coffeicola*.

Figura 15 – Efeito de probióticos sobre a área abaixo da curva do crescimento micelial de *Cercospora coffeicola* nos dois experimentos realizados



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 16 – Placas de Petri comparando o efeito de probióticos no crescimento micelial de *C. coffeicola* nos dois experimentos realizados

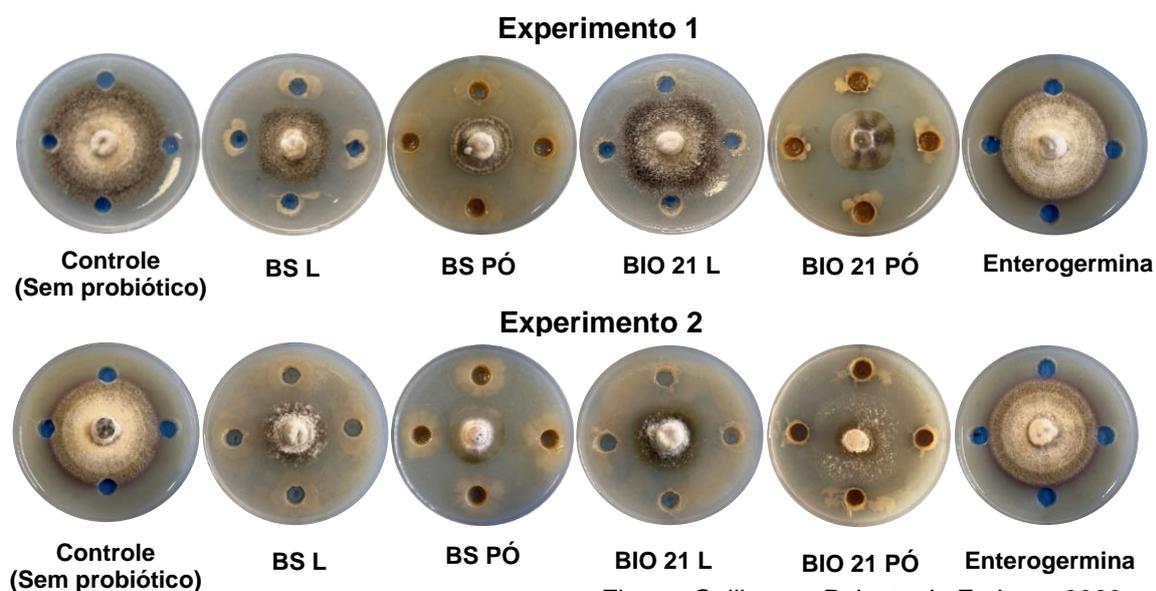


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

* 1ª Linha, experimento 1, 2ª linha, experimento 2.

4.1.3 Inibição do crescimento micelial de *Boeremia exigua* pv. *coffea*

Somente os probióticos BS e BIO e 1921 PO inibiram o crescimento micelial do patógeno em 36,7 e 18,4%, respectivamente e também reduziram a AACCM no primeiro experimento (Figuras 17, 18 e 19). Os demais probióticos não inibiram o crescimento micelial de *Boeremia*. No segundo experimento, apenas o probiótico BS

PÓ reduziu o crescimento micelial de *B. exigua* em 21,1% e área abaixo da curva do crescimento micelial em 11,9% (Figuras 17, 18).

Figura 17 – Efeito de probióticos sobre o crescimento micelial de *Boeremia exigua* pv. *coffea* nos dois experimentos realizados

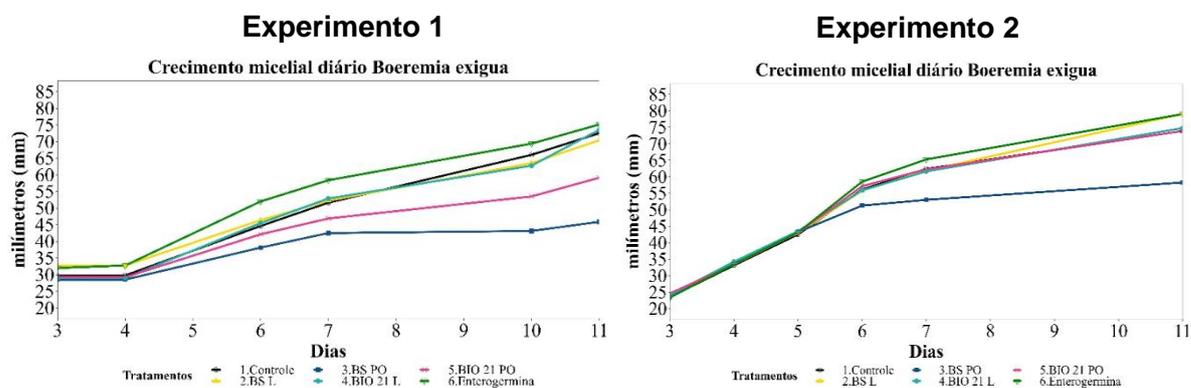
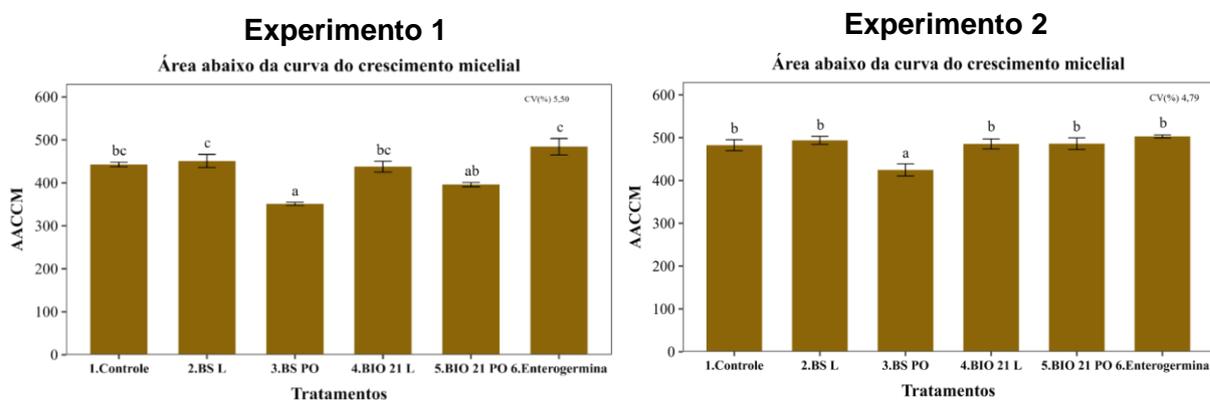
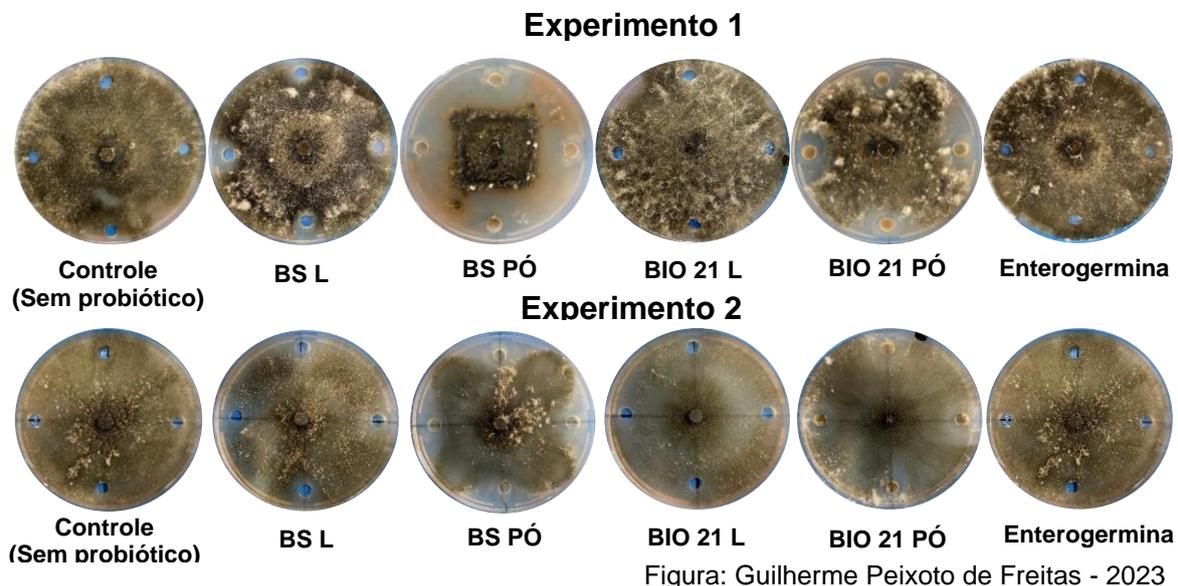


Figura 18 – Efeito de probióticos sobre a área abaixo da curva do crescimento micelial de *Boeremia exigua* pv. *coffea* nos dois experimentos realizados



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 19 – Placas de Petri comparando o efeito de probióticos no crescimento micelial de *Boeremia exigua* pv. *coffea* nos dois experimentos realizados



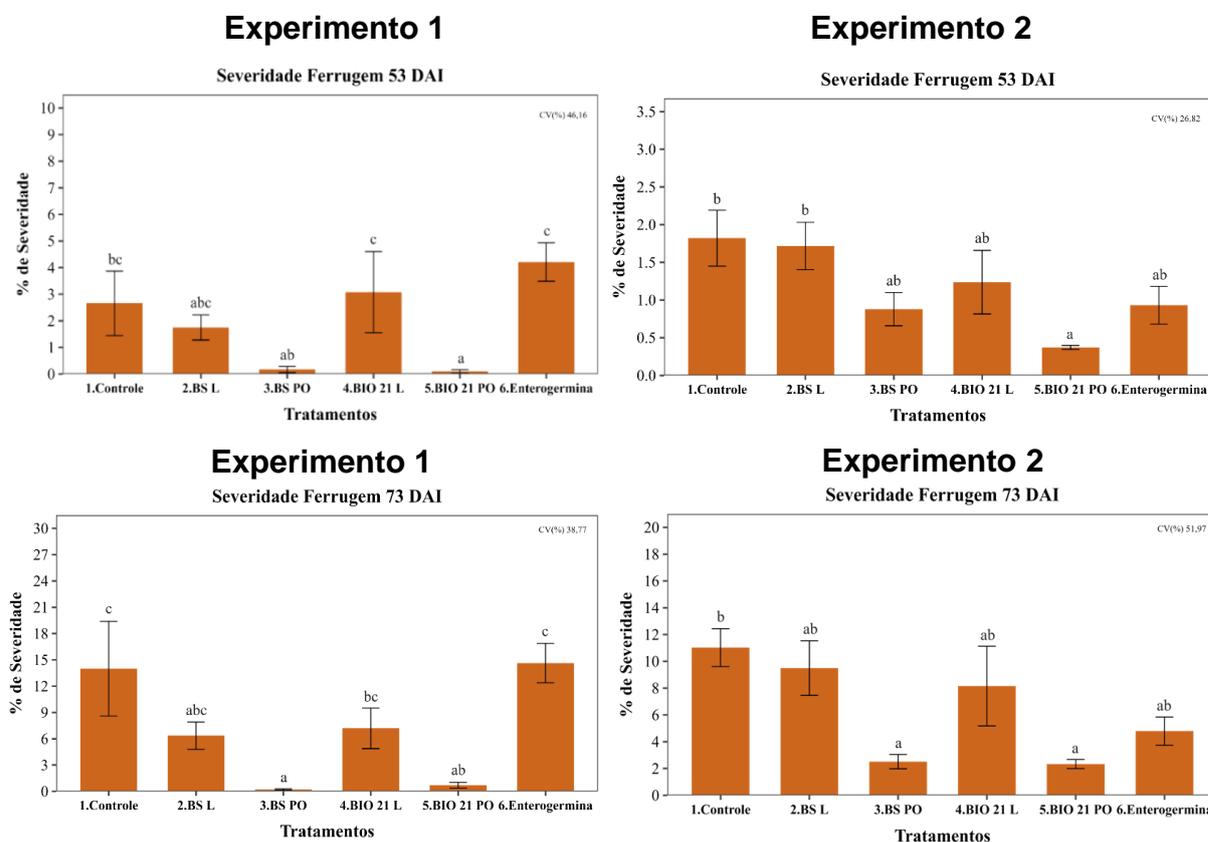
* 1ª Linha, experimento 1, 2ª linha, experimento 2.

4.2 Experimentos *in vivo*

4.2.1 Probióticos para o controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*)

As primeiras lesões esporuladas da ferrugem do cafeeiro nas mudas foram observadas a partir do 53º dia após a inoculação do patógeno. Na primeira avaliação realizada no primeiro experimento, a severidade foi de 2,65% no controle e nas mudas tratadas com os probióticos BIO 21 e BS PÓ foi de 0,16 e 0,09% respectivamente (Figura 20). No segundo experimento, a severidade no controle foi de 1,82% enquanto para os probióticos BS e BIO 21 PÓ foram de 0,87 e 0,37%, respectivamente (Figura 20).

Figura 20 – Efeito de probióticos na severidade da ferrugem do cafeeiro aos 53 e 73 dias após a inoculação do patógeno nos dois experimentos realizados



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao final do 1º experimento, 73 dias após a inoculação do patógeno, a média de severidade no tratamento controle foi de 14,0%, enquanto para BS PÓ e BIO 21 PÓ as severidades foram de 0,22 e 0,70%, resultando em um controle de 98,4 e 95%, respectivamente, a doença em relação à testemunha. Os tratamentos BS e BIO 21 L também controlaram em 54,7 e 48,8% a severidade da doença, porém estatisticamente inferiores ao BS e BIO 21 PÓ (Figura 20).

No 2º experimento a média de severidade no tratamento controle foi de 11,02% após 73 dias da inoculação do patógeno e os probióticos BIO 21 e BS PÓ apresentaram severidades de 2,33 e 2,51% resultando em um controle de 78,8 e 77,2%, respectivamente (Figura 20). Os probióticos BIO 21 L, Enterogermina e BS L reduziram a severidade da doença, porém de forma inferior aos BS e BIO 21 PÓ.

Com exceção da Enterogermina, todos os probióticos reduziram a área abaixo da curva do progresso da doença (Figuras 23).

Nas figuras 21 e 22 observa-se as lesões da ferrugem nas folhas de cada tratamento no primeiro e no segundo experimento respectivamente.

Figura 21 – Efeito dos probióticos na severidade da ferrugem em folhas do cafeeiro após 73 dias da inoculação do patógeno no 1º experimento

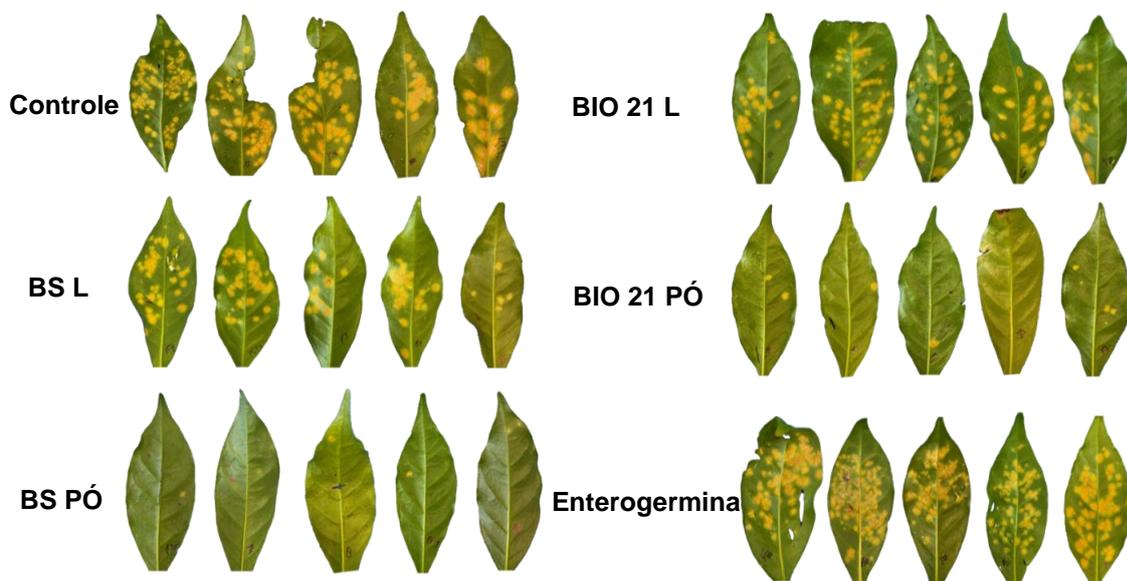


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

Figura 22 – Efeito dos probióticos na severidade da ferrugem em folhas do cafeeiro após 73 dias da inoculação do patógeno no 2º experimento

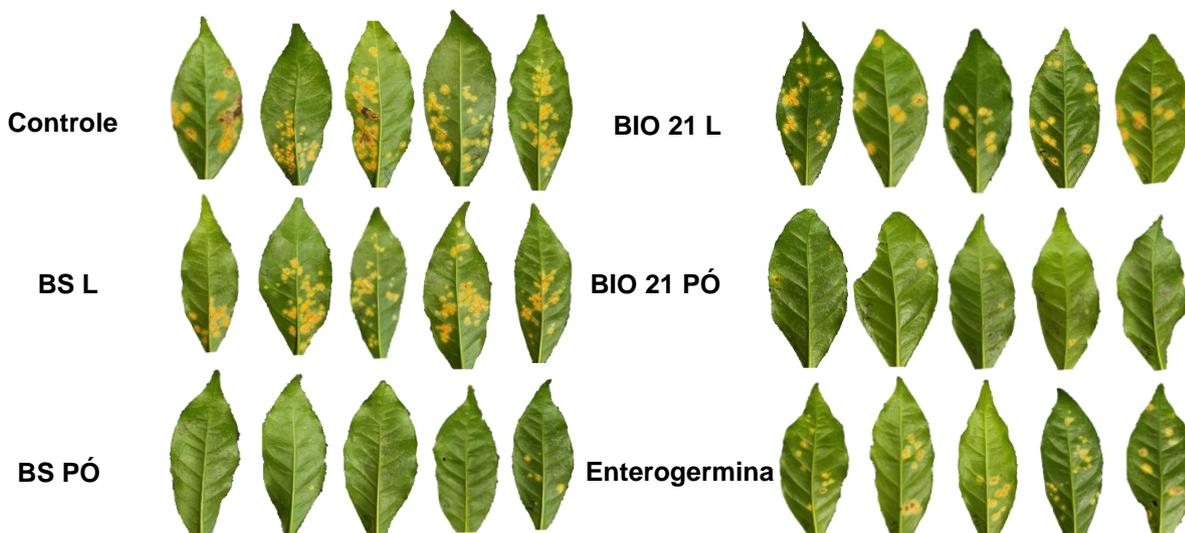
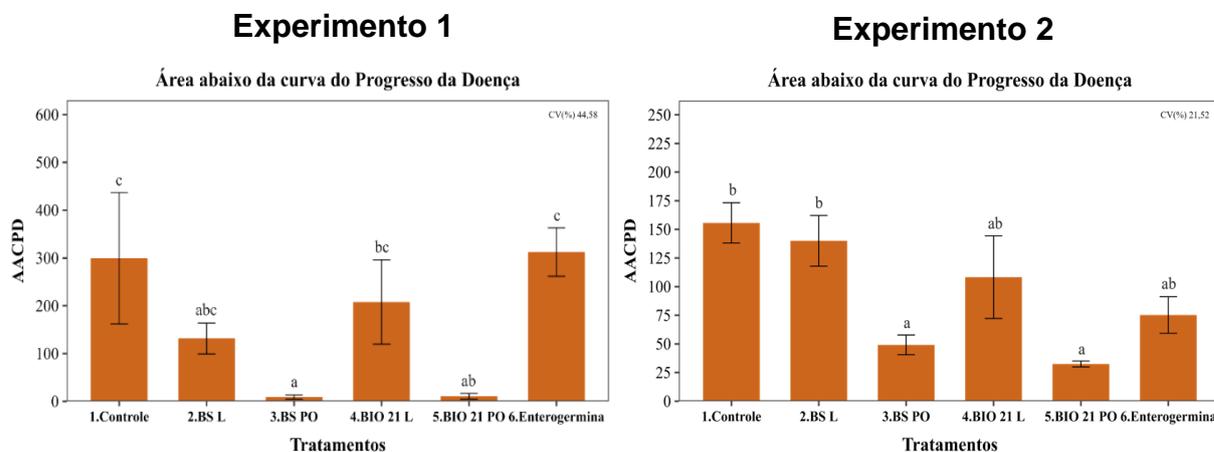


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

Figura 23 – Efeito de probióticos sobre a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) nos dois experimentos realizados



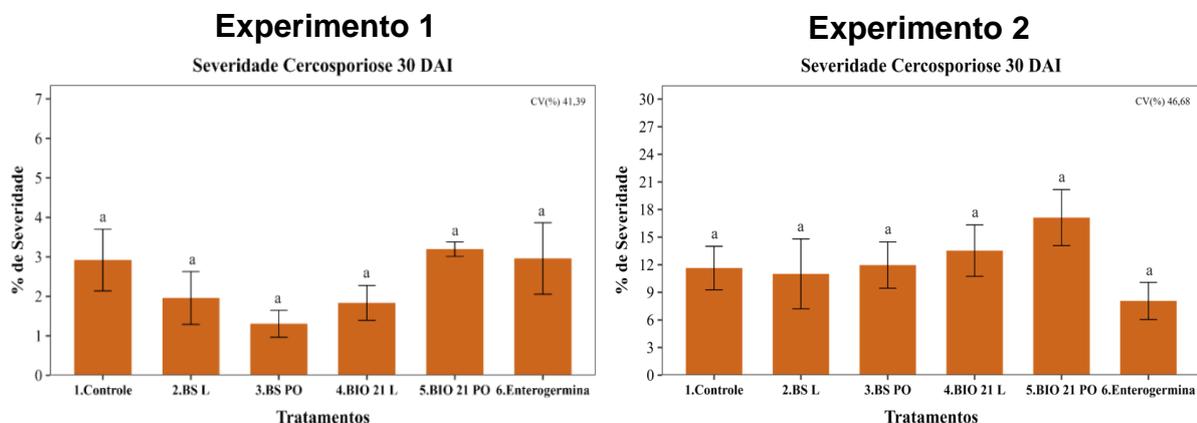
* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No segundo experimento, os probióticos BIO 21 e BS PÓ também foram os mais eficientes em reduzir a área abaixo da curva da doença em 79,1 e 68,4% ao comparar com o controle, enquanto BIO 21 L e Enterogermina tiveram resultados melhores em relação a testemunha, porém inferiores ao BIO 21 e BS PÓ (Figura 23).

4.2.2 Probióticos para o controle da cercosporiose do cafeeiro (*Cercospora coffeicola*)

A aplicação dos probióticos nas mudas de cafeeiro, na concentração de 1×10^7 UFC/mL ou g, não reduziu a severidade da cercosporiose (Figura 24). De um modo geral, no primeiro experimento, foi observado uma tendência dos probióticos BS PÓ, BS e BIO 21 L em reduzirem a severidade da doença quando comparado com o controle, mas sem diferir estatisticamente (Figura 24). A severidade média no tratamento com BS PÓ foi de 1,3% enquanto no controle foi 2,9%, correspondendo a uma redução de 55%. Para os probióticos BS e BIO 21 L a severidade observada foi de 1,83 e 1,88%, respectivamente. No segundo experimento a média de severidade no tratamento controle foi de 11,6% e nenhum dos probióticos obteve resultados estatisticamente superiores.

Figura 24 - Efeito de probióticos na severidade da cercosporiose cafeeiro aos 30 dias após a inoculação do patógeno nos dois experimentos realizados



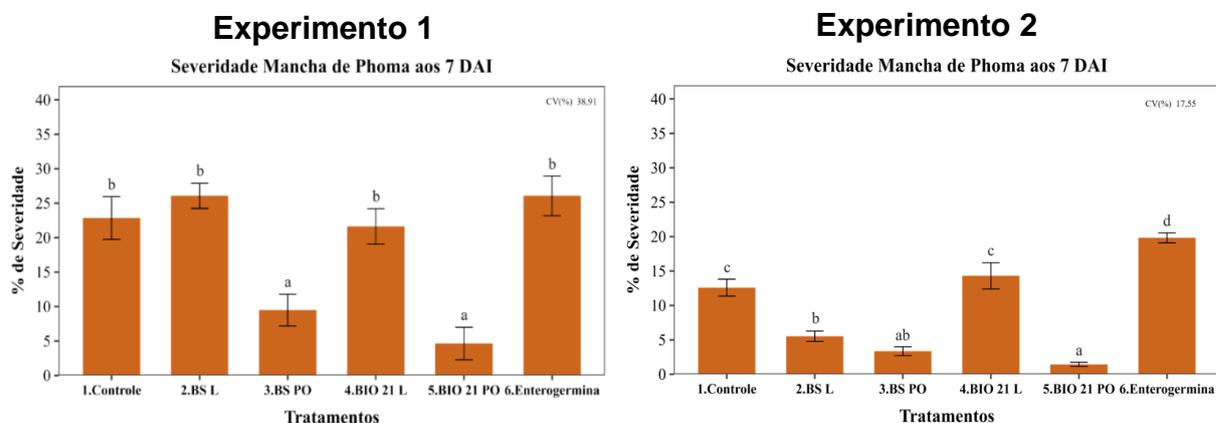
* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.3 Probióticos para o controle de mancha de Phoma (*Boeremia exigua* pv. *coffea*)

Os probióticos BIO 21 e BS PÓ reduziram a severidade da mancha de Phoma em 79,5 e 58,6% quando comparado ao controle no primeiro experimento. A severidade média obtida nos probióticos BIO 21 e BS PÓ foi de 4,7 e 9,5% respectivamente enquanto no tratamento controle foi de 22,9% (Figura 25). Para os probióticos BS L e Enterogermina a severidade foi superior que o controle, ambos com severidade média de 26,08%. O probiótico BIO 21 L apresentou severidade similar ao controle com 21,7%. Na Figura 26 observa-se os sintomas da mancha de Phoma nas folhas de café tratadas ou não com probióticos.

No segundo experimento, os probióticos BIO 21 e BS PÓ também foram os mais eficientes em reduzir a severidade da doença ao comparar com o controle (Figura 25 e 27). Os probióticos apresentaram uma severidade média de 1,43% para o BIO 21 PÓ e de 3,35% para o BS PÓ, enquanto na testemunha a severidade foi de 12,59%. Ambos os probióticos reduziram a severidade em 88,6 e 73,39%, respectivamente. O probiótico BS L reduziu a severidade da mancha de Phoma, porém com resultados inferiores aos do BIO 21 e BS PÓ.

Figura 25 – Efeito de probióticos na severidade da mancha de Phoma aos 7 dias após a inoculação do patógeno nos dois experimentos realizados



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 26 – Efeito de probióticos na severidade da mancha de Phoma em folhas do cafeeiro após 7 dias da inoculação do patógeno no primeiro experimento

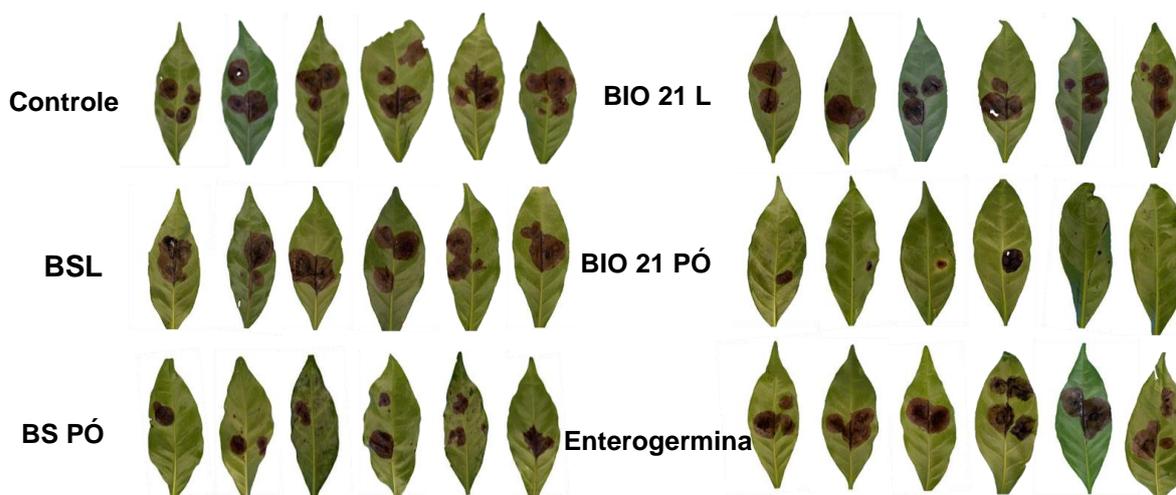


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

Figura 27 – Efeito de probióticos na severidade da mancha de Phoma em folhas do cafeeiro após 7 dias da inoculação do patógeno no segundo experimento

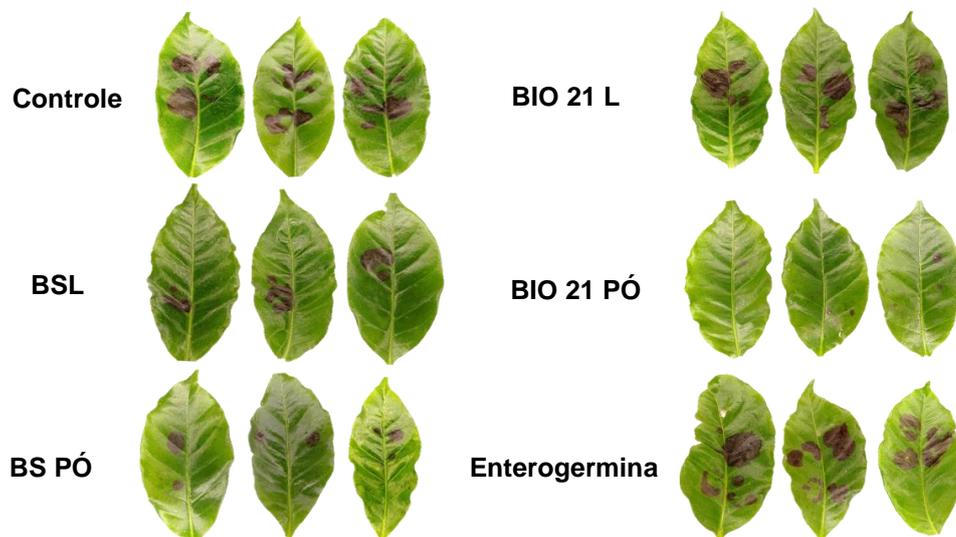
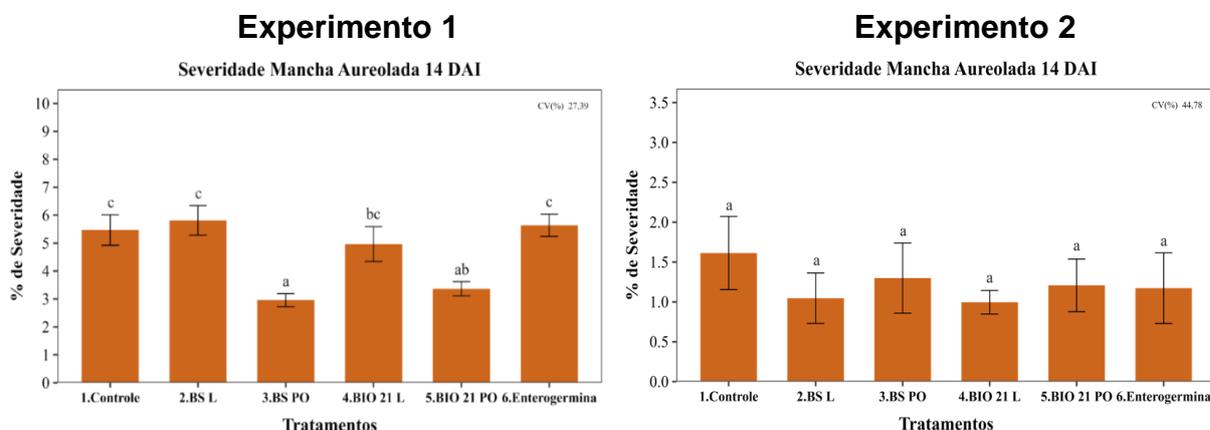


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

4.2.4 Probióticos para o controle da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*)

Os probióticos BS e BIO 21 PÓ, no primeiro experimento, reduziram a severidade da mancha aureolada em 56,6 e 38,5% quando comparado ao controle (Figura 28). Os demais produtos (BIO 21 e BS L e Enterogermina) não reduziram a severidade da doença. A Figura 29 ilustra esses resultados. No segundo experimento, todos os probióticos testados apresentaram resultados de severidade estatisticamente iguais ao tratamento controle, não sendo eficientes em reduzir severidade da doença.

Figura 28 - Efeito de probióticos na severidade da mancha aureolada aos 14 dias após a inoculação do patógeno nos dois experimentos realizados



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 29 - Efeito de probióticos na severidade da mancha aureolada em folhas do cafeeiro após 14 dias da inoculação do patógeno

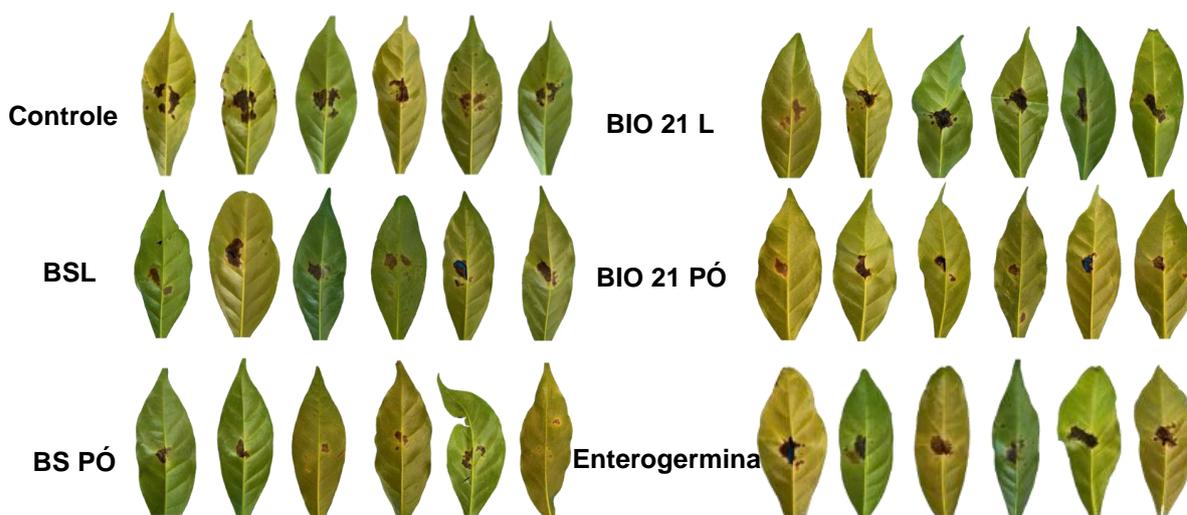
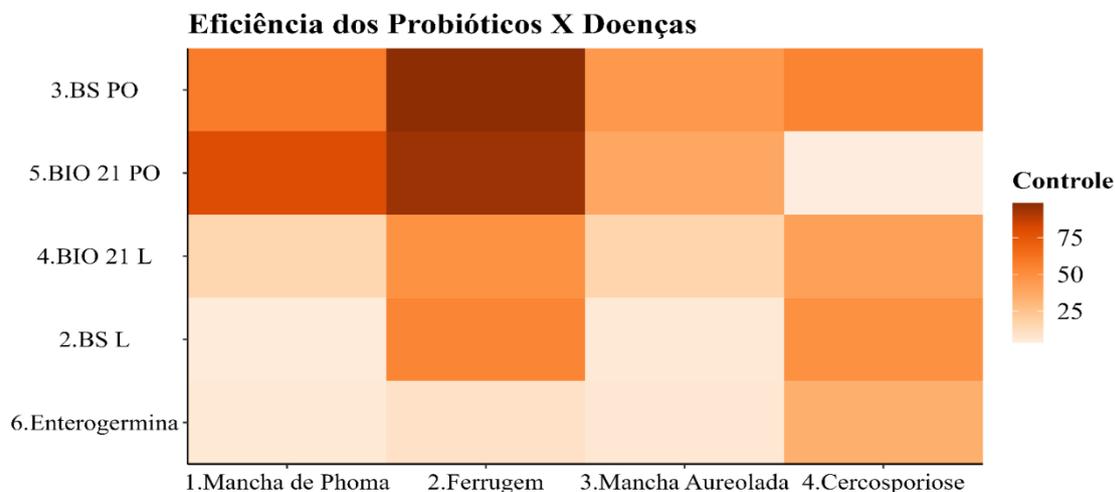


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

De forma geral, os probióticos BS e BIO 21 PÓ controlaram a maioria das doenças do café testadas como a ferrugem, mancha de Phoma e a mancha aureolada. A maior redução da severidade foi para a ferrugem do cafeeiro onde ambos os probióticos controlaram acima de 95% a doença. Para mancha de Phoma o controle foi de 79,5% para o probiótico BIO 21 PÓ e 58,6% para o BS PÓ. Para mancha aureolada, o controle foi de 56,6% para o BS PÓ e 38,5% para o BIO 21 PÓ (Figura 30).

Figura 30 – Heat map comparando o desempenho dos probióticos no controle das doenças do cafeeiro

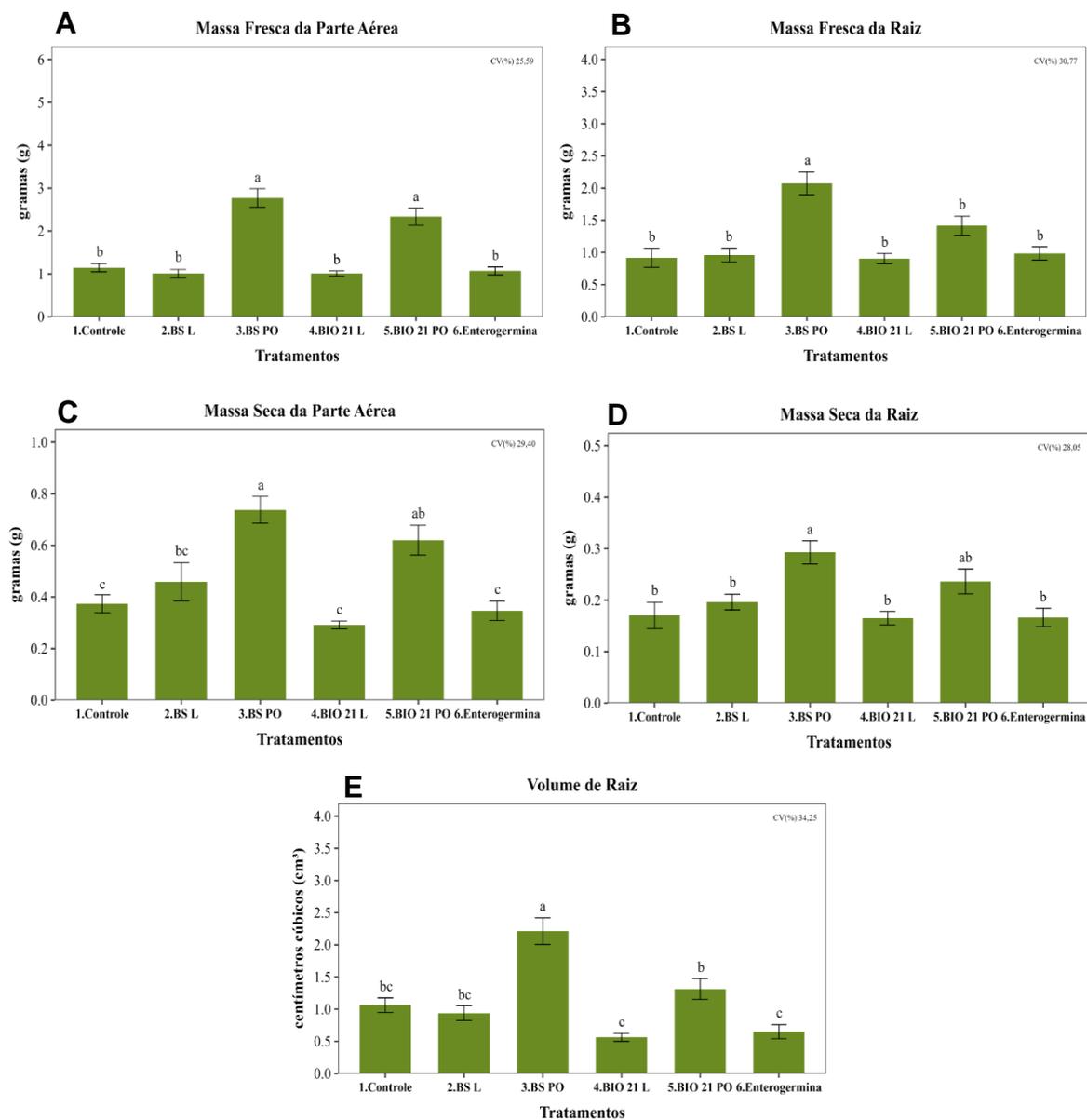


4.3 Promoção de crescimento

4.3.1 Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em bandejas

Os probióticos BS e BIO 21 PÓ apresentaram os maiores valores de massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, sendo que para esses parâmetros o BS PÓ foi superior ao BIO 21 PÓ. (Figuras 31 e 32). Para os demais probióticos testados os resultados foram semelhantes ao controle. Quando comparado com o controle observa-se incremento significativo para massa fresca da parte aérea de 142% para BS PÓ e de 114% para BIO 21 PÓ. Por outro lado, para a massa fresca do sistema radicular os incrementos foram de 127% e 54%, respectivamente para o BS e BIO 21 PÓ (Figura 31). Ambos os probióticos incrementaram a massa seca de parte aérea em 97% para o BS PÓ e 67,5% BIO 21 PÓ. Para massa seca do sistema radicular os incrementos observados foram de 70,5% e 35%, respectivamente, em relação ao controle. As mudas tratadas com o probiótico BS PÓ apresentaram os maiores volumes radiculares (Figura 31), com incremento de 108% em relação ao controle. O probiótico BIO 21 PÓ incrementou o volume radicular em 23,5% em comparação com o controle.

Figura 31 – Efeito de probióticos nos parâmetros de promoção de crescimento em mudas de cafeeiro. A. Massa fresca da parte aérea. B. Massa fresca da raiz. C. Massa seca da parte aérea. D. Massa seca da raiz. E. Volume radicular



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 32 – Efeito dos probióticos no crescimento das mudas de cafeeiro



Controle (Sem probiótico)

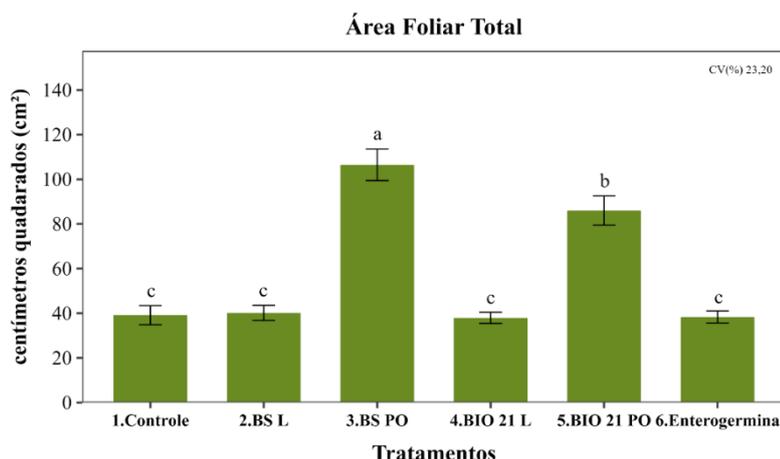
BS PÓ

BIO 21 PÓ

Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

Para a área foliar total, os probióticos BS e BIO 21 PÓ se destacaram em relação aos demais tratamentos obtendo os maiores valores (Figura 33). O BS PÓ foi estatisticamente superior ao BIO 21 PÓ, com aumento de 67,3 cm² na área foliar total enquanto o BIO 21 PÓ aumentou em 46,9 cm² em comparação com o controle. O incremento em área foliar proporcionado pelos probióticos pode ser visualizado conforme a Figura 34 abaixo. Os probióticos BS e BIO 21 PÓ também apresentaram os maiores valores de clorofila conforme o índice SPAD aos 90 dias após a instalação do ensaio (Figura 35). Os demais probióticos apresentaram os teores de clorofila estatisticamente iguais ao controle. As diferenças obtidas no índice de clorofila podem ser visualizadas na figura 36 aos 60 dias após a instalação do experimento.

Figura 33 – Efeito de probióticos na área foliar total das mudas do cafeeiro



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Valores obtidos através da análise de imagens utilizando o pacote Pliman do software R.

Figura 34 – Efeito de probióticos na área foliar das mudas de cafeeiro

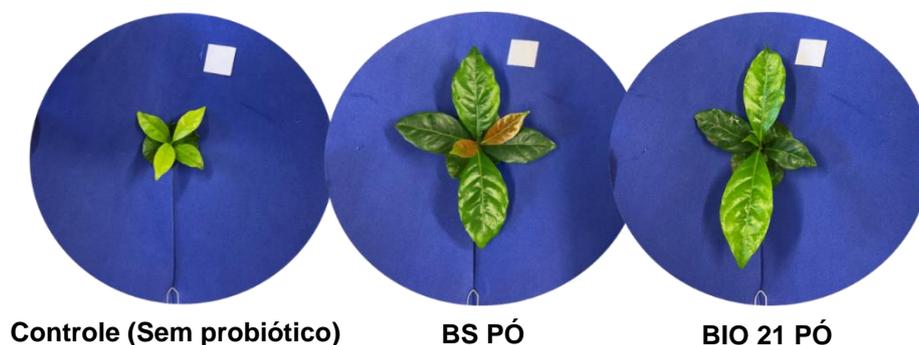
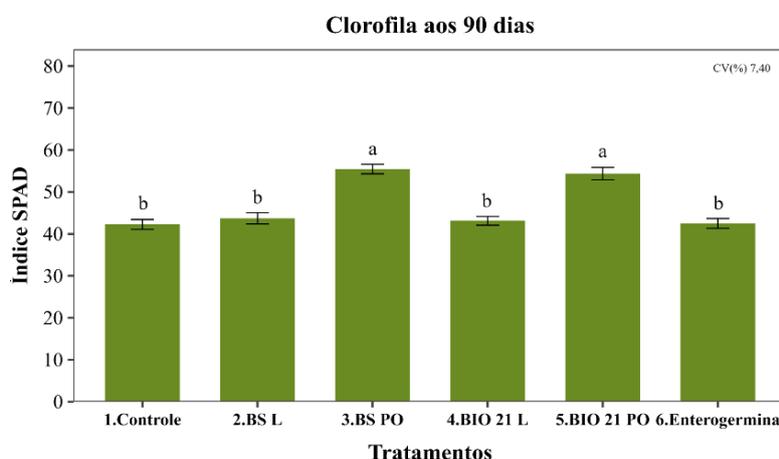


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

Figura 35 – Efeito de probióticos no teor de clorofila obtido aos 90 dias após a instalação do experimento conforme índice SPAD



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 36 – Efeito dos probióticos na diferença de coloração visual das folhas em mudas de cafeeiro

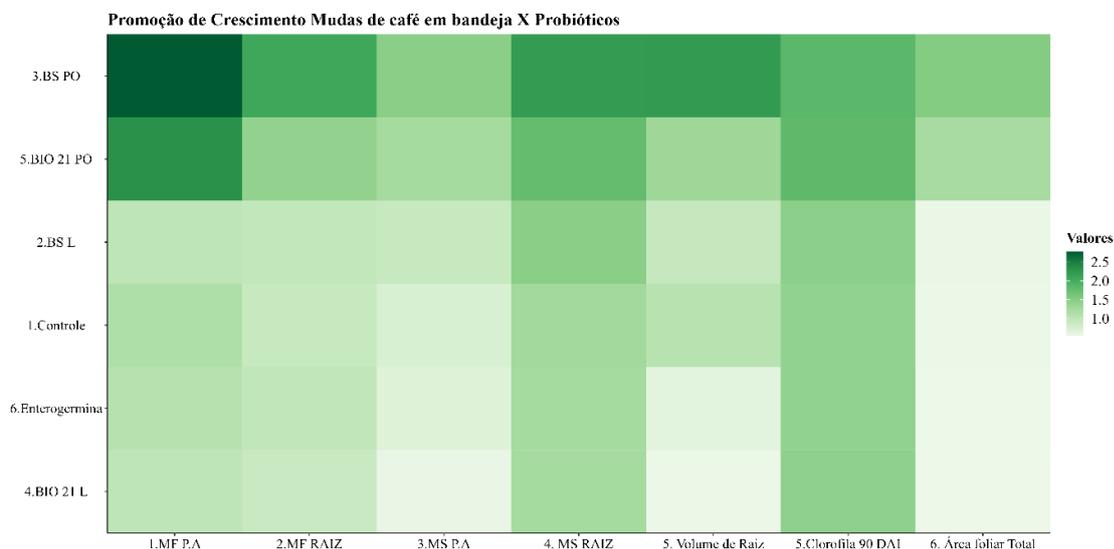


Figura: Guilherme Peixoto de Freitas - 2023

Os probióticos BS e BIO 21 PÓ foram os mais eficientes em incrementar o crescimento das mudas de café em bandejas. Na Figura 37 é possível ter um panorama geral do desempenho dos probióticos em todos os parâmetros de promoção crescimento avaliados. Ambos os probióticos obtiveram os maiores valores

de massa fresca da parte aérea e raiz (MF P.A e MF Raiz), de massa seca da parte aérea e raiz (MS P.A e MS Raiz), além do volume de raiz, clorofila e área foliar total.

Figura 37 – Heat map comparando o efeito de probióticos nos parâmetros de promoção de crescimento das mudas do cafeeiro em bandejas

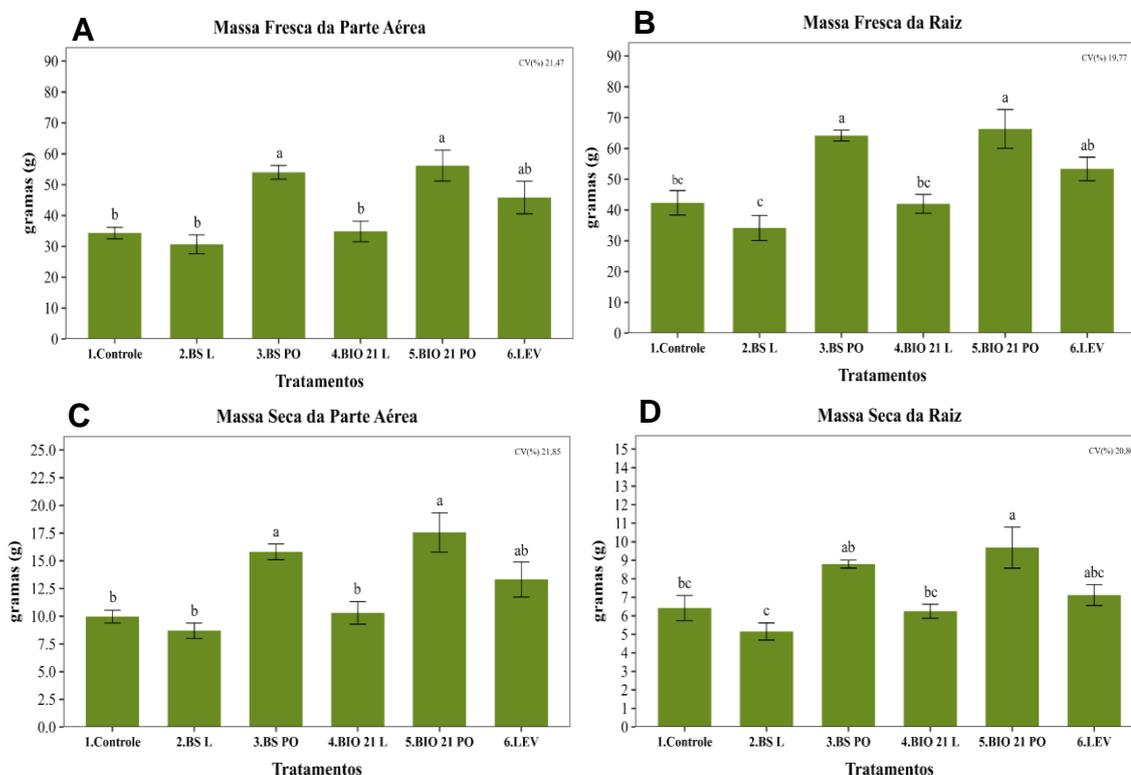


*Dados de MS P.A, MS Raiz, clorofila e área foliar total foram multiplicados por denominador comum para melhor visualização dos resultados e ajuste de escala.

4.3.2 Probióticos para a promoção de crescimento de mudas de cafeeiro em rizotrons

Os probióticos BS PÓ e BIO 21 PÓ foram os que proporcionaram os maiores incrementos das massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular (Figura 38). A levedura inativada também incrementou as massas frescas e secas da parte aérea e do sistema radicular em relação ao controle. As massas seca da parte aérea com os probióticos BIO 21 PÓ e BS PÓ foram incrementadas em 76,1% e 58,5%, respectivamente, quando comparado com o controle sem probióticos (Figura 38CD). O probiótico BIO 21 PÓ incrementou em 51% a massa da raiz das mudas de café, por outro lado o BS PÓ incrementou em 37%. A levedura inativada e o probiótico BIO 21 L apresentaram resultados similares ao controle.

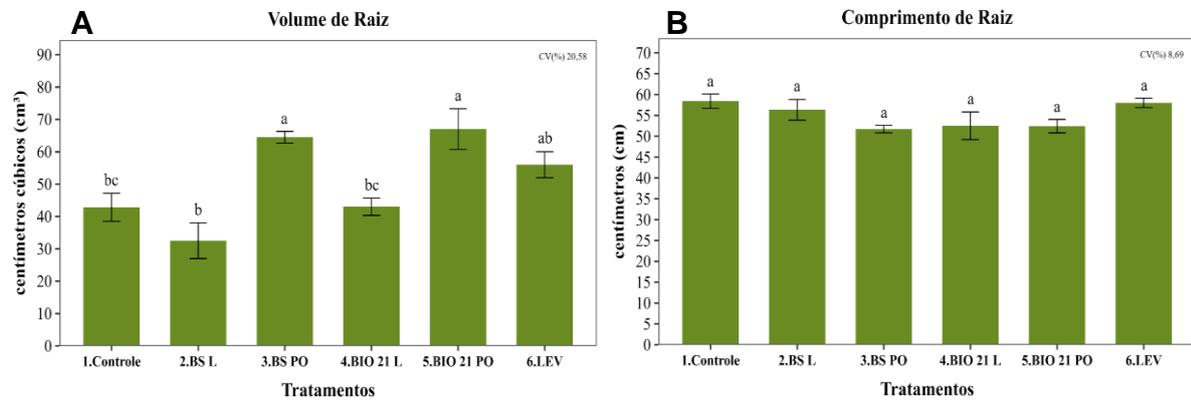
Figura 38 – Efeito de probióticos nos parâmetros de promoção de crescimento em mudas de cafeeiro em rizotrons. A. Massa fresca da parte aérea. B. Massa fresca da raiz. C. Massa seca da parte aérea. D. Massa seca da raiz



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o volume do sistema radicular, de acordo com a Figura 39, os probióticos BIO 21 PÓ e BS PÓ apresentaram a mesma tendência dos dados das massas frescas e secas da raiz, com incrementos de volume de raiz de 56 e 50,5% respectivamente, ao comparar com o controle. A levedura inativada proporcionou ganhos em volume do sistema radicular em 30,7% em relação ao controle. O comprimento radicular foi semelhante em todos os tratamentos (Figura 39B). A Figura 40 ilustra os efeitos dos probióticos. Resultados significativos também foram observados para número de folhas e clorofila nas mudas de café tratadas com os probióticos (Figura 41). No número de folhas, o probiótico BS PÓ foi o que obteve o maior número seguido do BIO 21 PÓ e o tratamento com levedura inativada. Para clorofila, os probióticos BIO 21 PÓ, BS PÓ e a levedura inativada apresentaram os maiores valores de SPAD.

Figura 39 – Efeito dos probióticos no volume (A) e no comprimento de raiz (B) das mudas do cafeeiro em rizotrons

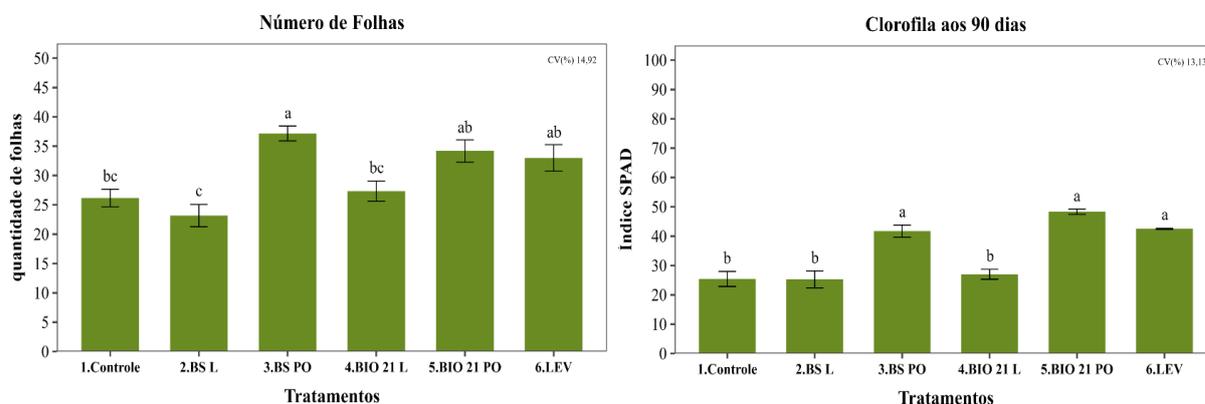


* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 40 – Efeito dos probióticos no crescimento das mudas do cafeeiro em rizotrons



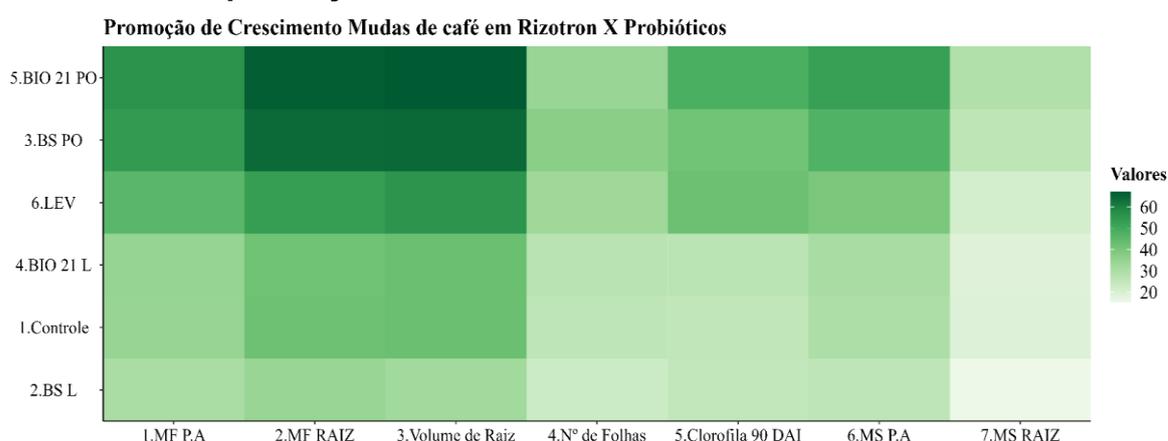
Figura 41 – Efeito de probióticos no número de folhas e teor de clorofila medido pelo índice SPAD nas mudas do cafeeiro em rizotrons



* Barras contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os probióticos BIO 21 e BS PÓ foram os que mais incrementaram os parâmetros de promoção de crescimento das mudas do cafeeiro em rizotrons. A Figura 42 mostra um panorama do desempenho dos probióticos, destacando os valores mais elevados de massa fresca da parte aérea e da raiz (MF P.A e MF RAIZ), volume de raiz, número de folhas, clorofila, além das massas secas da parte aérea e da raiz (MS P.A e MS RAIZ) obtidos pelos probióticos BIO 21 e BS PÓ. O tratamento utilizando levedura inativada foi melhor quando comparado aos demais probióticos testados (BIO 21 L e BS L).

Figura 42 – Heat map comparando o efeito de probióticos nos parâmetros de promoção de crescimento das mudas do cafeeiro em rizotron



*Dados de MS P.A e MS Raiz foram multiplicados por denominador comum para melhor visualização dos resultados e ajuste de escala.

5 DISCUSSÃO

Os probióticos avaliados no estudo, de forma geral, reduziram a severidade da ferrugem, da cercosporiose, da mancha de Phoma e a aureolada, bem como promoveram o crescimento das mudas de café.

Nas mudas de cafeeiro, os probióticos BS e BIO 21 PÓ foram efetivos na redução da severidade da ferrugem, da mancha de Phoma e da mancha aureolada. A maior redução da severidade foi observada para a ferrugem, com redução acima de 95% a doença. O probiótico BS PÓ possui em sua composição *Bacillus subtilis*, mas o BIO 21 PÓ, além de *Bacillus subtilis*, possui em sua composição bactérias do ácido láctico como *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, que podem atuar diretamente no controle dos patógenos. Segundo Sadiq *et al.* (2019), as bactérias do ácido láctico produzem compostos, tanto do metabolismo primário quanto do secundário, como ácidos acético, láctico e propiônico que são considerados determinantes na atividade antifúngica. Estes ácidos orgânicos afetam as células fúngicas interagindo com a membrana celular dos patógenos e quando entram no interior da célula que possui pH neutro, se dissociam em ânions, acidificam o citoplasma e assim, reduzem a atividade enzimática, funções metabólicas e levam a ruptura da membrana (Hirozawa *et al.*, 2023). Peptídeos antifúngicos também podem ser produzidos por essas bactérias (Wang *et al.*, 2015). Estes compostos irão interagir diretamente com a parede celular dos fungos, alterando a permeabilidade das membranas e induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio que acarretam a apoptose celular. Bacteriocinas produzidas ribossalmente também são as principais responsáveis pela atividade destes microrganismos frente a fitopatógenos bacterianos atuando por meio de diversos mecanismos, interferindo na parede celular e na membrana citoplasmática (Ahmad *et al.*, 2017; Sadiq *et al.*, 2019).

Os probióticos testados tiveram pouco efeito sobre a inibição da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*. Apenas o probiótico BIO 21 L inibiu 100% da germinação dos urediniósporos e na maior concentração. Embora todos os probióticos testados contêm *Bacillus subtilis* em sua composição, o qual, de acordo com alguns estudos, tem a capacidade de produzir compostos, como as iturinas, que possuem atividade antifúngica e podem inibir a germinação dos urediniósporos da ferrugem, atuando diretamente sobre suas membranas (Dunlap *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2006;

Jiang *et al.*, 2020), neste estudo tiveram pouco efeito sobre a germinação de urediniósporos. Considerando que os probióticos tiveram pouco efeito *in vitro* sobre a germinação dos urediniósporos, pode-se inferir que o efeito sobre a doença pode ser devido à colonização dos tecidos foliares com os microrganismos presentes nos probióticos, bem como um efeito de indução de resistência. Segundo Silva *et al.* (2012), a aplicação preventiva dos microrganismos possibilita a colonização da filosfera competindo por espaço e nutrientes nos sítios de infecção com os patógenos além de aumentarem a possibilidade de ocorrer indução de resistência sistêmica pela sensitivação dos tecidos. Cacefo *et al.* (2016) demonstraram que, aplicações de *Bacillus* desencadearam mecanismos de defesa nas plantas, contribuindo para a indução de resistência frente ao patógeno.

Diferente do observado neste estudo, Li *et al.* (2013) observaram que o uso de uma cepa de *Bacillus subtilis* promoveu a inibição da germinação dos urediniósporos da ferrugem do trigo, tanto quando utilizaram uma suspensão de células quanto apenas o caldo fermentado obtido do cultivo líquido, sem a presença de células. Isso evidencia o efeito inibitório dos metabólitos produzidos por esse microrganismo. Pode ser que os isolados de *Bacillus* utilizados nos probióticos não produzam quantidades significativas de compostos capazes de inibir a germinação dos urediniósporos de ferrugem.

Assim como observado neste estudo, o controle biológico da ferrugem do cafeeiro foi obtido com diversos microrganismos, como Daivasikamani (2009) que obteve um controle de 43% e 34%, com a aplicação de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens in vivo*, respectivamente. Cacefo *et al.* (2016), após a aplicações de *Bacillus subtilis* em plantas de café em condições de campo, observaram 24% de redução na severidade da ferrugem na cultivar Icatu e 16% na Mundo Novo.

Além da capacidade de produzir metabólitos, o controle das doenças também pode ser resultado da aplicação preventiva dos produtos anterior a exposição do patógeno e a sua capacidade de colonizarem a filosfera das plantas. Segundo Anne *et al.* (2021), após serem administrados nos hospedeiros, os probióticos competem e impedem a adesão dos patógenos, produzem compostos antimicrobianos e estimulam a proliferação da microflora benéfica, além de também atuarem através indução de resistência modulando o sistema imunológico do hospedeiro (Hirozawa *et al.*, 2023).

Esse efeito protetor da aplicação de bactérias foi observado ao aplicar endofíticos visando o controle da ferrugem do café em discos foliares e em mudas de café com

24 e 72 horas antecedendo a inoculação do patógeno (Silva *et al.*, 2012). Quando aplicado de forma preventiva, foi observada redução significativa da severidade da doença, porém, ao pulverizar as bactérias e inocular simultaneamente o patógeno, estas não foram eficientes. Foi observado que a maior redução da severidade da ferrugem foi observada quando as aplicações antecederam 72 horas a inoculação do patógeno, evidenciando a importância da aplicação de preventiva dos microrganismos como agentes protetores.

A aplicação dos antagonistas antes do patógeno garante uma vantagem adaptativa de colonização e de acordo com Canto e Herrera (2012), algumas características das bactérias do ácido láctico as tornam excelentes colonizadoras da filosfera, uma vez que, possuem preferência por glicose, frutose e sacarose como fontes de carbono para seu desenvolvimento, sendo essas substâncias encontradas na filosfera em concentrações que podem atingir até $12,5 \mu\text{g g}^{-1}$.

Assim, com o filoplano colonizado, ao ser inoculado os urediniósporos, discos de micélio ou a suspensão bacteriana dos patógenos teriam que lidar com a presença de prováveis substâncias antimicrobianas que foram secretadas e se superarem estas, ainda necessitariam competir por espaço e nutrientes nos sítios de infecção (Silva; Bettioli, 2009).

Haddad *et al.* (2014) também notaram um controle eficaz da ferrugem do café quando os antagonistas foram usados como bioprotetores, sendo pulverizados 48 horas antes da inoculação do patógeno. Antagonistas, como *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., conseguiram reduzir a severidade da doença, o número de pústulas e urediniósporos em mais de 70%. Além disso, esses antagonistas proporcionaram proteção às mudas de café por até 16 dias antes da inoculação do patógeno.

Em condições de campo, Haddad *et al.* (2009), testaram isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas*, no controle da ferrugem do café. Quando os isolados foram aplicados em condições de baixa severidade da doença, o controle foi observado, porém, quando pulverizado em pressões elevadas de severidade, os isolados não foram eficientes no controle da ferrugem.

Nesta premissa da capacidade de colonização, Darana *et al.* (2019) avaliou a sobrevivência de bactérias do ácido láctico como *Lactobacillus plantarum* em folhas de kiwi e morango após a pulverização em plantas sob condições de casa de vegetação. Houve uma redução da concentração de 1×10^8 para 1×10^4 UFC/mL após 10 dias

da pulverização, porém, ficou evidenciado a capacidade dos isolados em colonizar a fitosfera e proteger as plantas dos patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e *Xanthomonas fragariae*.

A capacidade de *Lactobacillus plantarum* colonizar ferimentos em frutos de morango foi observado por Chen *et al.* (2020). Após 144 horas da aplicação nos frutos lesionados, foi observado um aumento na concentração de *L. plantarum* e quando *Botrytis cinerea* foi inoculado, a capacidade de colonização e o aumento na concentração aplicada foram ainda mais evidenciados.

Para mancha de Phoma os probióticos BIO 21 e BS PÓ reduziram 79,5% e 58,6% da severidade da doença. Para mancha aureolada, o controle foi acima de 56% para o BS PÓ e 38% para o BIO 21 PÓ. Semelhante ao observado neste estudo, um produto à base de *Bacillus* foi testado em campo e reduziu a incidência da mancha de Phoma em 62% e da mancha aureolada em 82% (Fernandes, 2013). Júnio *et al.* (2019), conduziram testes com isolados de *Bacillus* para controlar a mancha aureolada em casa de vegetação e verificaram que todos os isolados testados reduziram a severidade da doença e produziram compostos como amônia, sideróforos e ácido cianídrico, que atuam diretamente sobre o patógeno.

O potencial das bactérias do ácido láctico no controle de outros fitopatógenos foi demonstrado por diversos autores (Chen *et al.*, 2020; Darana *et al.*, 2019; Manjarres *et al.*, 2021; Steglińska *et al.*, 2022).

No estudo de Darana *et al.* (2019), *Lactobacillus plantarum* e *L. mesenteroides* demonstraram eficácia no controle da mancha angular em morangos, com uma redução significativa de mais de 35%, e no controle do cancro bacteriano em kiwis, com uma redução superior a 84%, em condições de casa de vegetação. Chen *et al.* (2020), usaram *Lactobacillus plantarum* para controlar *Botrytis cinerea* em morangos e obtiveram redução de 75% da incidência e da severidade da doença. Manjarres *et al.* (2021), trataram frutos de tomate com uma suspensão de *Lactiplantibacillus plantarum* e conseguiram reduzir significativamente o diâmetro das lesões ao comparar quando os frutos foram inoculados somente com *Fusarium spp.*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*.

Steglińska *et al.* (2022), fizeram um screening de bactérias do ácido láctico frente a fitopatógenos da cultura da batata, incluindo *Pectobacterium carotovorum*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, uma redução da doença de 40-90% foi observada para todos os patógenos, com exceção de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium*

sambucinum, que não foram inibidos por *Lactiplantibacillus plantarum*. O controle foi atribuído a produção de ácidos orgânicos e etanol com atividade antimicrobiana.

Nos ensaios de promoção de crescimento das mudas de café, tanto em bandeja, quanto em rizotrons, os probióticos BS e BIO 21 PÓ também se destacaram. Em ambos os ensaios, estes tratamentos promoveram os maiores valores de massa fresca e seca da parte aérea, da raiz, volume radicular, número de folhas, clorofila e área foliar. Os resultados deste estudo de promoção de crescimento de mudas de café são de grande importância, pois podem aprimorar o manejo da produção de mudas em viveiros. Isso se torna especialmente relevante para viveiros que dependem exclusivamente de substratos inertes comerciais e areia, que muitas vezes carecem da presença de uma população benéfica de microrganismos, essenciais para o estímulo direto do crescimento e o estabelecimento inicial das plantas, tanto nas fases iniciais de cultivo no viveiro quanto na etapa subsequente em campo (Urgiles-Gómez *et al.*, 2021).

Conforme anteriormente mencionado, o probiótico BS PÓ é composto por *Bacillus subtilis*, enquanto BIO 21 PÓ, além de *B. subtilis*, possui bactérias do ácido láctico em sua composição que podem atuar diretamente na promoção do crescimento de plantas. Jaini *et al.* (2022) enfatizam que as bactérias do ácido láctico podem desempenhar um papel fundamental na promoção do crescimento das plantas, modulando a absorção de nutrientes importantes, como fósforo e potássio, além de também atuarem como fixadores de nitrogênio e produtores de fitohormônios e sideróforos. Porém, dados ainda são escassos sobre os mecanismos e a atuação destes microrganismos na promoção de crescimento de plantas (Raman *et al.*, 2022).

Segundo De Lacerda *et al.* (2016) e Lamont *et al.* (2017), algumas cepas das bactérias do ácido láctico conseguem melhorar a disponibilidade de nutrientes para plantas, incluindo fósforo e potássio, através da solubilização mediada pela acidificação do sistema através da produção de ácidos orgânicos. Strafella *et al.* (2020), por exemplo, observaram que bactérias do ácido láctico como *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* e *Enterococcus faecium* isoladas da rizosfera de plantas de trigo foram capazes de produzir ácido indol-acético, além de solubilizar fosfato e potássio *in vitro*. Algumas cepas também possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, fornecendo um importante recurso às plantas reforçando o potencial dessas bactérias na promoção do crescimento e na melhoria da nutrição das plantas (Giassl *et al.*, 2016). No trabalho de Limanska *et al.* (2013), sementes de tomate foram

tratadas com suspensões de diferentes isolados de *Lactobacillus plantarum*, sendo observados incrementos na germinação e vigor, além de ganhos em comprimento da parte aérea e da raiz, e maior presença de pelos radiculares nas raízes das plântulas tratadas. Também Kang *et al.* (2015) verificaram que bactérias do ácido láctico, como *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*, promoveram o crescimento de mudas de pepino. Houve incrementos no comprimento das raízes e da parte aérea, na massa fresca e seca, tanto das raízes quanto da parte aérea, além de aumento no índice de clorofila SPAD nas mudas tratadas. Os autores sugeriram que a promoção de crescimento poderia estar relacionada indiretamente à produção de ácidos orgânicos, como o láctico e o acético, além de aumentos significativos na diversidade de aminoácidos e nutrientes minerais, detectados nas mudas tratadas.

É relevante também destacar que na rizosfera, as plantas liberam exsudatos contendo substâncias químicas, como carboidratos e ácidos orgânicos, que podem atrair as bactérias do ácido láctico para colonizar suas raízes (Canarini *et al.*, 2019). Estas bactérias, uma vez estabelecidas, podem secretar fitohormônios, como giberelinas e auxinas, além de outros compostos, como a acetoina e o 2,3-butanodiol, que contribuem para o desenvolvimento das plantas, conforme indicado por Lamont *et al.* (2017) e Sharifi e Ryu (2018).

Grande parte do êxito da promoção de crescimento pelas bactérias, depende da sua habilidade de colonizar eficazmente a rizosfera, permitindo-lhes aproveitar os benefícios desse ambiente para desempenhar seu papel (Zhou *et al.*, 2016).

Bacillus subtilis, é uma das espécies de bactérias promotoras de crescimento mais estudadas e abundantemente encontradas na rizosfera das plantas, especialmente devido à capacidade de alguns isolados de colonizar as raízes, promovendo a fixação biológica de nitrogênio, solubilizando fósforo e potássio, produzindo fitohormônios, sideróforos e atuando na mitigação de estresses abióticos (Blake *et al.*, 2021; Hashem *et al.*, 2019; Tahir *et al.*, 2017).

Nesse contexto, os incrementos obtidos neste trabalho também podem ser resultantes da atuação direta desses mecanismos na promoção do crescimento das mudas de cafeeiro. Semelhante ao observado neste estudo, Cisneros *et al.* (2017), verificaram aumentos significativos no desenvolvimento de mudas de cafeeiro e na disponibilidade de fósforo no solo promovidos por isolados de *Bacillus subtilis* e outras bactérias. Nesse mesmo contexto, Chagas Junior *et al.* (2022) também observaram efeito promotor de crescimento por diferentes isolados de *Bacillus subtilis* na cultura

da soja. Todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfato, bem como produzir ácido indol-acético. Alguns desses isolados ainda apresentaram melhorias nos parâmetros vegetativos, como maior massa seca da parte aérea e raiz, em comparação com o controle sem a inoculação das bactérias.

Nunes *et al.* (2023) também conduziu um estudo em rizotrons, com *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*, tanto em combinação quanto individualmente, para promover o crescimento de plantas de tomate. As mudas foram tratadas com uma suspensão das bactérias, imediatamente após o transplante, e novamente 10 e 20 dias após. Tanto a aplicação combinada das duas bactérias quanto a aplicação individual foram capazes de aumentar significativamente a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, bem como o volume radicular.

Assim como observado neste estudo, com a aplicação de um probiótico contendo 21 diferentes microrganismos, Asyiah *et al.* (2020) observaram incrementos na altura das plantas, no número de folhas e na área foliar de mudas de café tratadas com uma suspensão contendo $1,0 \times 10^9$ UFC/mL de um consórcio contendo diferentes isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas*.

A utilização de consórcios microbianos, como o presente no BIO 21 PÓ, que inclui não apenas *Bacillus subtilis*, mas também outras 20 espécies de bactérias do ácido láctico, revela-se particularmente interessante para a promoção do crescimento das plantas de café. Isso ocorre porque a combinação de microrganismos compatíveis permite obter resultados benéficos de forma aditiva e sinérgica (Santoyo *et al.*, 2021). Em situações nas quais um dos microrganismos pode não estar ativo ou não desempenhar seu papel, o outro pode compensar e manter a eficácia do consórcio, contribuindo para o desenvolvimento das plantas (Louca *et al.*, 2018).

Esse enfoque de consórcio microbiano pode ser uma estratégia eficaz para maximizar os benefícios da inoculação de bactérias na agricultura, pois atuarão diretamente na estimulação dos mecanismos de promoção de crescimento das plantas (Santoyo *et al.*, 2021). Ao combinar diferentes microrganismos, cada um desempenhando funções específicas, sendo possível otimizar a sinergia entre eles, ampliando a gama de ações benéficas para as plantas (Woo; Pepe, 2018).

Dessa forma, os consórcios microbianos presentes nos probióticos representam uma abordagem promissora para promover o crescimento de mudas de cafeeiro, especialmente do ponto de vista dos viveiros. A utilização desses consórcios pode melhorar a saúde e a vitalidade das mudas de café desde as fases iniciais do cultivo,

preparando-as para um crescimento mais vigoroso e sustentável quando transplantadas para o campo. Essa estratégia pode contribuir significativamente para o aumento da produtividade e a qualidade da produção de café.

Os resultados indicam o potencial dos probióticos para serem considerados como ferramentas estratégicas para o controle de doenças do cafeeiro, especialmente para a ferrugem, mancha de Phoma e mancha aureolada, haja visto que um bom agente de controle biológico deve possuir atividade frente a diversos patógenos. Porém, há necessidade de posicioná-los como agentes bioprotetores, ou seja, aplicando-os no período que antecede a entrada/infecção do patógeno na cultura para maior assertividade e efetividade de controle (KOUTOULEAS *et al.*, 2023). Vale ressaltar também que o uso das bactérias do ácido láctico, assim como *Bacillus subtilis*, presentes nos probióticos são reconhecidas como seguras conforme estabelecido pela *Food and Drug administration - US* e *European Food Safety Authority* (Bhogoju; Nahashon, 2022), portanto, em termos registro podem ter maior agilidade para serem utilizados no segmento agrícola ao comparar com outras espécies de microrganismos ainda não estudadas. Nesse contexto, os probióticos BS e BIO 21 PÓ testados no presente trabalho, são considerados promissores bioprotetores para o controle das doenças de extrema importância para a cultura do café, sugerindo-se que sejam realizadas investigações em condições de campo para integrar esses benefícios ao manejo fitossanitário da cultura.

Estes resultados sugerem que o uso desses probióticos pode ser uma estratégia valiosa para serem utilizados como ferramentas no manejo integrado das doenças da cultura e ainda contribuir com ganhos no crescimento e desenvolvimento das plantas de café, contribuindo assim para um manejo mais eficiente e sustentável da cultura.

6 CONCLUSÃO

- Os probióticos tiveram pouco efeito sobre a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*. Apenas o produto BIO 21 L inibiu 100% da germinação dos urediniósporos na maior concentração testada (1×10^7 UFC/mL) nos dois experimentos.
- Em mudas de cafeeiro, os probióticos BS e BIO 21 PÓ reduziram 98,4 e 95% a severidade da ferrugem no primeiro experimento e 77,2 e 78,8% no segundo.
- Os probióticos BS e BIO 21 PÓ reduziram em 66,3 e 48,8% e 64,0 e 49,0% o crescimento micelial de *C. coffeicola* no primeiro e segundo experimento, respectivamente.
- O probiótico BS PÓ reduziu em 36,7% e 21,1% o crescimento micelial de *B. exigua* nos dois experimentos realizados, respectivamente.
- A severidade da mancha de Phoma foi reduzida pelos probióticos BIO 21 PÓ e BS PÓ em 79,5 e 58,6% no primeiro experimento e no segundo 88,6 e 73,3%, respectivamente.
- A severidade da mancha aureolada foi reduzida somente no primeiro experimento em 56,6 e 38,5% pelo BS e BIO 21 PÓ.
- Os probióticos BS e BIO 21 PÓ promoveram o aumento da massa fresca e seca da parte aérea, do volume radicular, da área foliar e do conteúdo de clorofila das mudas de cafeeiro cultivadas em bandejas e em rizotrons.
- Os probióticos BS L, BIO 21 L e Enterogermina tiveram pouco efeito no controle das doenças e na promoção do crescimento das mudas de cafeeiro.
- Os probióticos BS PÓ e BIO 21 PÓ se destacaram como eficazes para o controle de doenças e a promoção do crescimento de mudas de cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. 2021. Acesso em: 01 fev. 2023.
- AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIY, M. A.; AL KARAawi, M. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 49, p. 1–11, 2017.
- ALEGRE, I.; VIÑAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 59-66, 2011.
- ANDRADE, C. C.; DE RESENDE, M. L. V.; MOREIRA, S. I.; MATHIONI, S. M.; BOTELHO, D. M.; COSTA, J. R.; ANDRADE, A. C. M.; ALVES, E. Infection process and defense response of two distinct symptoms of *Cercospora* leaf spot in coffee leaves. **Phytoparasitica**, v. 49, p. 727-737, 2021.
- ANEE, I. J.; ALAM, S.; BEGUM, R. A.; SHAHJAHAN, R. M.; KHANDAKER, A. M. The role of probiotics on animal health and nutrition. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 82, n. 1, p. 1-16, 2021.
- ASYIAH, I. N.; MUDAKIR, I.; HOESAIN, M.; PRADANA, A. P.; DJUNAIDY, A.; SARI, R. F. Consortium of endophytic bacteria and rhizobacteria effectively suppresses the population of *Pratylenchus coffeae* and promotes the growth of *Robusta coffee*. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, n. 10, 2020.
- AVESKAMP, M. M.; DE GRUYTER, J.; WOUDEBERG, J.H.C.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W. Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, v.65, n.1, p.1-60, 2010.
- BADEL, J. L.; ZAMBOLIM, L. Coffee bacterial diseases: a plethora of scientific opportunities. **Plant Pathology**, v. 68, n. 3, p. 411-425, 2019.
- BAI, S. P.; WU, A. M.; DING, X. M.; LEI, Y.; BAI, J.; ZHANG, K. Y.; CHIO, J. S. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 663-670, 2013.
- BAKER, R. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 6, n. 1, p. 263-294, 1968.
- BAKER, B. P.; GREEN, T. A. LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 104095, 2020.
- BEN KHEDHER, S.; BOUKEDI, H.; LAARIF, A.; TOUNSI, S. Biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* V26: a potential biological control approach for sustainable agriculture development. **Organic Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 117-124, 2020.
- BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

- BETTIOL, W. Componentes do Controle Biológico de Doenças de Plantas. *IN: BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991. cap.1, p. 1-3.
- BHOGOJU, S.; NAHASHON, S. Recent advances in probiotic application in animal health and nutrition: A review. **Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 304, 2022.
- BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOVÁCS, Á. T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2021.
- BORRIS, R.; *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. *IN: LUGTENBERG, B. Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture*. Leiden: Springer, 2015. cap. 40, p. 379-389.
- BOTELHO, D. M. S.; POZZA, E. A.; ALVES, E.; BOTELHO, C. E.; POZZA, A. A. A.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; DE SOUZA, P. E. Efeito do silício na intensidade da cercosporiose e nutrição mineral de mudas de cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 23-29, 2011.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. New York. **John Wiley & Sons**, 1990. 655 p.
- CANTO, A.; HERRERA, C. M. Micro-organisms behind the pollination scenes: microbial imprint on floral nectar sugar variation in a tropical plant community. **Annals of Botany**, v.110, n.6, p-1173-1183, 2012.
- CABI. **Climate Change and Biodiversity**. Helping farmers adapt to climate change. Disponível em: <https://www.cabi.org/about-cabi/climate-change/>. Acesso em: 23 ago. de 2022.
- CACEFO, V.; ARAÚJO, F. F. D.; PACHECO, A. C. Biological control of *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome with *Bacillus subtilis* Cohn and biochemical changes in the coffee. **Coffee Science**, v.11, n. 4, p.567-574, 2016.
- CANARINI, A.; KAISER, C.; MERCHANT, A.; RICHTER, A.; WANEK, W. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 157, 2019.
- CAO, H.; HE, S.; WEI, R.; DIONG, M.; LU, L. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: a potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-6, 2011.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; JUNIOR, G. M. B. J. B.; LIMA, C. A. L.; MARTINS, A. L. L. M.; SOUZA, M. C. S.; CHAGAS, L. F. B. C. *Bacillus subtilis* como inoculante promotor de crescimento vegetal em soja. **Diversitas Journal**, n. 1, v. 7, p. 1-16, 2022.
- CHANDRASHEKARA, K. N.; MANIVANNAN, S.; CHANDRASHEKARA, C.; CHAKRAVARTHI, M. Biological control of plant disease. *IN: SINGH, V. K.; SINGH, A. Ecofriendly Innovative Approaches in Plant Disease Management*, International Book Distributors, 2012. cap. 10, p. 148-162.

- CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research**, v. 160, n. 1, p. 75-81, 2005.
- CISNEROS, C. A.; FRANCO, J.; REALPE-FERNÁNDEZ, M. A. R. C. E. L. A.; FUENMAYOR, J. C. Influencia de microorganismos en la disponibilidad de fósforo en plántulas de café (*Coffea arabica*). **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, n. 1, v. 15, p. 19-26, 2017.
- CLARK, M.; SPRINGMANN, M.; RAYNER, M.; SCARBOROUGH, P.; HILL, J.; TILMAN, D.; HARRINGTON, R. A. Estimating the environmental impacts of 57,000 food products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 33, 2022.
- COLOMBO, C.; PALUMBO, G.; HE, J. Z.; PINTON, R.; CESCO, S. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. **Journal of Soils and Sediments**, n. 14, p. 538-548, 2014.
- CUI, L.; HANIKA, K.; VISSER, R. G.; BAI, Y. Improving pathogen resistance by exploiting plant susceptibility genes in coffee (*Coffea* spp.). **Agronomy**, v. 10, n. 12, p.1928, 2020.
- DAIVASIKAMANI, S. Biological control of coffee leaf rust pathogen, *Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Biopesticides**, v.2, n. 1, p. 94-98, 2009.
- DARANAS, N.; ROSELLÓ, G.; CABREFIGA, J.; DONATI, I.; FRANCÉS, J., BADOSA, E.; BONATERRA, A. Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. **Annals of Applied Biology**, v. 174, n. 1, p. 92-105, 2019.
- DE LACERDA, J. R. M.; DA SILVA, T. F.; VOLLÚ, R. E.; MARQUES, J. M.; AND SELDIN, L. Generally recognized as safe (GRAS) *Lactococcus lactis* strains associated with lippia sidoides cham. are able to solubilize/mineralize phosphate. **Springerplus**, v. 5, p. 1–7, 2016.
- DI CAGNO, R.; CODA, R.; DE ANGELIS, M.; AND GOBBETTI, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, 33, p.1–10, 2013.
- DI CANITO, A.; MATEO-VARGAS, M. A.; MAZZIERI, M.; CANTORAL, J.; FOSCHINO, R.; CORDERO-BUESO, G.; VIGENTINI, I. The role of yeasts as biocontrol agents for pathogenic fungi on postharvest grapes: A review. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1650, 2021.
- DONG, C. J.; WANG, L. L.; LI, Q.; SHANG, Q. M. Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. **PloS One**, v. 14, n. 11, 2019.
- DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; ROONEY, A. P. Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group—important antifungals for plant disease biocontrol applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1794, 2019.

EL-SAADONY, M. T.; ALAGAWANY, M.; PATRA, A. K.; KAR, I.; TIWARI, R.; DAWOOD, M. A.; ABDEL-LATIF, H. M. The functionality of probiotics in aquaculture: an overview. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 117, p. 36-52, 2021.

FERNANDES, A. L. T.; SANTINATO, F.; FERREIRA, R. T.; SANTINATO, R. Reduction of mineral fertilization of arabic coffee using coffee straw. **Coffee Science**, v.8, n.3, p. 324-336, 2013.

FERRÃO, R. G.; DE MUNER, L. H.; DA FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G. Café Conilon. **INCAPER**, 2017.

FHOULA, I.; NAJJARI, A.; TURKI, Y.; JABALLAH, S.; BOUDABOUS, A.; OUZARI, H. Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. **BioMed Research International**, n. 14, p. 1–14, 2013.

FONSECA, L. M.; DOMINGUES, J. P.; DIMA, A. M. Mapping the sustainable development goals relationships. **Sustainability**, v. 12, n. 8, p. 3359, 2020.

FREIMOSER, F. M.; RUEDA-MEJIA, M. P.; TILOCCA, B.; MIGHELI, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 1-19, 2019.

FULBRIGHT, D. W.; PAUL, C. P.; GARROD, S. W. Hypovirulence: a natural control of chestnut blight. *IN: MUKERJI, K.G.; GARG, K. L. Biocontrol of Plant Diseases*, p. 121-139, 1988.

GANGULY, N. K; BHATTACHARYA, S. K; SESIKERAN, B.; NAIR, G. B; RAMAKRISHNA, B. S; SACHDEV, H. P. S; HEMALATHA, R. ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. 1, p. 22, 2011.

GHASEMIAN, A.; ESLAMI, M.; SHAFIEI, M.; NAJAFIPOUR, S.; RAJABI, A. Probiotics and their increasing importance in human health and infection control. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 153-158, 2018.

GIASSI, V.; KIRITANI, C.; KUPPER, K. C. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. **Microbiological Research**, n. 190, p. 46–54, 2016.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 15 p., 2012.

GONG, M.; WANG, J. D.; ZHANG, J.; YANG, H.; LU, X. F.; PEI, Y.; CHENG, J. Q. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 in vitro and identification of its antifungal substance (iturin A). **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 4, n. 38, p. 233-240, 2006.

HADDAD, F.; SARAIVA, R. M.; MIZUBUTI, E. S. G.; ROMEIRO, R. S.; MAFFIA, L. A. Isolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonists. **European journal of plant pathology**, v.139, p. 763-772, 2014.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD_ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n.6, p. 1291-1297, 2019.

- HASSANI, M.; DURÁN, P.; HACQUARD, S. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**, n. 1, v. 6, p. 1-17, 2018.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, n. 60, p. 579-598, 2010.
- HIROZAWA, M. T.; ONO, M. A.; SUGUIURA, I. M. D. S.; BORDINI, J. G.; ONO, E. Y. S. Lactic acid bacteria and *Bacillus spp.* as fungal biological control agents. **Journal of Applied Microbiology**, v.134, n. 2, 2023.
- IBRAHIM, S. A.; GYAWALI, R.; AWAISHEH, S. S.; AYIVI, R. D.; SILVA, R. C.; SUBEDI, K.; KRASTANOV, A. Fermented foods and probiotics: An approach to lactose intolerance. **Journal of Dairy Research**, v. 88, n. 3, p. 357-365, 2021.
- JAFFAR, N. S.; JAWAN, R.; CHONG, K. P. The potential of lactic acid bacteria in mediating the control of plant diseases and plant growth stimulation in crop production-A mini review. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.
- JAINI, M. F. M.; ROSLAN, N. F.; YUSOF, M. T.; SAIDI, N. B.; RAMLI, N.; ZAINUDIN, N. A. I. M. Investigating the potential of endophytic lactic acid bacteria isolated from papaya seeds as plant growth promoter and antifungal agent. **Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 45, p. 207–233, 2022.
- JÚNIO, F.; VIEIRA, B. S.; SIQUIEROLI, A. C. S. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee crop with *Bacillus spp.* isolates. **Científica**, v.47, n. 4, p. 364-370, 2019.
- KANG, S. M.; RADHAKRISHNAN, R.; YOU, Y. H.; KHAN, A. L.; PARK, J. M.; LEE, S. M.; LEE, I. J. Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth-promoting microorganisms. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, v. 65, n.1, p. 36-44, 2015.
- KHANEGHAH, A. M.; ABHARI, K., EŞ, I.; SOARES, M. B.; OLIVEIRA, R. B.; HOSSEINI, H.; SANT'ANA, A. S. Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 205-218, 2020.
- KHOCHAMIT, N.; SIRIPORNADULSIL, S.; SUKON, P.; SIRIPORNADULSIL, W. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. **Microbiological Research**, v. 170, p. 36-50, 2015.
- KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, p. 845, 2019.
- KUMAR, A.; SINGH, S.; GAURAV, A. K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, J. P. Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p.1216, 2020.
- LAMONT, J. R.; WILKINS, O.; BYWATER-EKEGÄRD, M.; SMITH, D. L. From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 111, p. 1–9, 2017.

LI, H.; ZHAO, J.; FENG, H.; HUANG, L.; KANG, Z. Biological control of wheat stripe rust by an endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-j in greenhouse and field trials.

Crop Protection, v. 43, p. 201-206, 2013.

LIAO, S. F.; NYACHOTI, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 331-343, 2017.

LIMA, L. M. D.; POZZA, E. A.; TORRES, H. N.; POZZA, A. A.; SALGADO, M.; PFENNING, L. H. Relationship between nitrogen/potassium with Phoma spot and nutrition of coffee seedlings cultivated in nutrient solution. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 223-228, 2010.

LIMANSKA, N.; IVANYTSIA, T.; BASIUL, O.; KRYLOVA, K.; BISCOLA, V.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on germination and growth of tomato seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1587-1595, 2013.

LIU, W.; PANG, H.; ZHANG, H.; CAI, Y. Biodiversity of lactic acid bacteria. *IN*: ZHANG, H.; CAI, Y. Lactic acid bacteria: Fundamentals and Practice, **Springer**, p. 103-203, 2014.

LIU, H., BRETTELL, L. E.; QIU, Z.; SINGH, B. K. Microbiome-mediated stress resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 8, p. 733-743, 2020.

LOUCA, S.; POLZ, M. F.; MAZEL, F.; ALBRIGHT, M. B. N.; HUBER, J. A.; O'CONNOR, M. I.; ACKERMANN, M.; HAHN, A. S.; SRIVASTAVA, D. S.; CROWE, S. A. Function and functional redundancy in microbial systems. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 6, p. 936-943, 2018.

LU, L.; TIBPROMMA, S.; KARUNARATHNA, S. C.; JAYAWARDENA, R. S.; LUMYONG, S.; XU, J.; HYDE, K. D. Comprehensive review of fungi on coffee. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 411, 2022.

JIANG, C.; LI, Z.; SHI, Y.; GUO, D.; PANG, B.; CHEN, X.; SHI, J. *Bacillus subtilis* inhibits *Aspergillus carbonarius* by producing iturin A, which disturbs the transport, energy metabolism, and osmotic pressure of fungal cells as revealed by transcriptomics analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, p. 108783, 2020.

MANJARRES MELO, J. J.; ÁLVAREZ, A.; RAMIREZ, C.; BOLIVAR, G. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against phytopathogenic fungi isolated from cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). **Current Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1399-1408, 2021.

MARIUCCI JUNIOR, V.; FEDATO JUNIOR, M. A. C.; PEREIRA, N. A. N.; SILVA, A. G. D.; COSTA, C. O.; SOUZA, L. S. N. D.; SERA, G. H. Resistência simultânea à ferrugem alaranjada e mancha aureolada em linhagens de café arábica. *IN*: X SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2019, Vitória. **Anais X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Brasília, DF: Embrapa Café, 2019. p.4.

MEIRA, C. A. A.; RODRIGUES, L. H. A.; MORAES, S. A. D. Modelos de alerta para o controle da ferrugem-do-cafeeiro em lavouras com alta carga pendente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 233-242, 2009.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. Trichoderma e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. *In*: MEYER, M.C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. **Trichoderma: Uso na Agricultura. Brasília, DF: Embrapa**, p. 181-199, 2019.

MORELLI, L; CAPURSO, L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, p. S1-S2, 2012.

NAGÓRSKA, K.; BIKOWSKI, M.; OBUCHOWSKI, M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 3 p. 495-508, 2007.

NAZARETH, T. D. M.; LUZ, C.; TORRIJOS, R.; QUILES, J. M.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; MECA, G. Potential application of lactic acid bacteria to reduce aflatoxin B1 and fumonisin B1 occurrence on corn kernels and corn ears. **Toxins**, v. 12, p. 21., 2019.

NELSON, S. C. Cercospora leaf spot and berry blotch of coffee. University of Hawai'i at Manoa. **College of Tropical Agriculture and Human Resources**, Cooperative Extension Service, 2008.

NUNES, P. S.O; DE MEDEIROS, F. H.V; DE OLIVEIRA, T. S.; DE ALMEIDA ZAGO, J. R.; BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* promote tomato growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 397-406, 2023.

NYSANTH, N. S.; SIVAPRIYA, S. L.; NATARAJAN, C.; ANITH, K. N. Novel in vitro methods for simultaneous screening of two antagonistic bacteria against multiple fungal phytopathogens in a single agar plate. **3 Biotech**, v. 12, n. 6, p. 140, 2022.

O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293-304, 2017.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 33, p. 1-16, 2017.

OLIVOTO, T. Lights, camera, pliman! An R package for plant image analysis. **Methods in Ecology and Evolution**, v.13, n.4, p.789-798, 2022.

PARRA-ARROYO, L.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R. B.; CASTILLO-ZACARÍAS, C.; MARTÍNEZ, E. M. M.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; BILAL, M.; PARRA-SALDÍVAR, R. Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 151879, 2022.

PATHANIA, P.; RAJTA, A.; SINGH, P. C.; BHATIA, R. Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 30, p. 101842, 2020.

PATRICIO, F. R. A.; BRAGHINI, M. T. Efeito de fungicidas triazóis sobre o controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 241–249, 2011.

PATRICIO, F. R. A.; OLIVEIRA, E. G. Desafios do manejo no controle de doenças do café. **Visão Agrícola**, v. 12, p. 51-54, 2013.

PATRICIO, F. R. A.; BERIAM, L. O. S.; DOS SANTOS, J. M. F.; DE MORAES, A.; ROSSI, A.; REIS, J. C. S.; DE ALMEIDA, I. M. G. Management of bacterial halo blight and other coffee crop diseases. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 27, p. 154-173, 2021.

PERARO, M.; PERARO, M.; POZZA, E.; KORIAMA, R.; KAJIHARA, L.; MEGDA, F.; CALIARI, G.; SALOMÃO, A. Mancozeb em mistura com Tebuconazol e Azoxistrobina no controle da mancha de Phoma (*Phoma tarda*) do cafeeiro (*Coffea arabica*) visando manejo de resistência e uniformidade na florada. *IN: 44º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS*, 2018, Franca. **Anais 44º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, Brasília, DF: Embrapa Café, 2018. 2 p.

PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F. J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 1, p. S49-S66, 2019.

PLIEGO, C.; RAMOS, C.; DE VICENTE, A.; CAZORLA, F. M. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. **Plant and Soil**, v. 340, p. 505-520, 2011.

PIRARAT, N.; KOBAYASHI, T.; KATAGIRI, T.; MAITA, M.; ENDO, M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 3-4, p. 339-347, 2006.

POZZA, A. A. A.; PRIETO MARTINEZ, H. E.; CAIXETA, S. L.; CARDOSO, A. A.; ZAMBOLIM, L.; POZZA, E. A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 53-60, 2001.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1, p. 537-547, 2002.

RAMAN, J.; KIM, J. S.; CHOI, K. R.; EUN, H.; YANG, D.; KO, Y. J.; KIM, S. J. Application of lactic acid bacteria (LAB) in sustainable agriculture: Advantages and limitations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23 n. 14, p. 7784, 2022.

RAM, R. M.; KESWANI, C.; BISEN, K.; TRIPATHI, R.; SINGH, S. P.; SINGH, H. B. Biocontrol technology: eco-friendly approaches for sustainable agriculture. *In: TANVEER T.; SHAHEEN K., PARVEEN S.; MISBAH Z.T.; BABAR M.M.; GUL A. Omics Technologies and Bio-Engineering*. Academic Press, p. 177-190, 2018.

REDWEIK, G. A.; STROMBERG, Z. R.; VAN GOOR, A.; MELLATA, M. Protection against avian pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella Kentucky* exhibited in chickens given both probiotics and live *Salmonella* vaccine. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 752-762, 2020.

RODRIGUES, L. M. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; ALMEIDA, I. M. G. D.; BERIAM, L. O. S.; BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO, O. Multiple resistance to bacterial halo blight and bacterial leaf spot in *Coffea spp.* **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019.

- RODRIGUES, L. M. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; BERIAM, L. O. S.; FERREIRO-TONIN, M.; BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO FILHO, O. Ethiopian coffee germplasm is a valuable resistance gene pool to brazilian *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and *tabaci*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, 2021.
- SADIQ, F. A.; YAN, B.; TIAN, F.; ZHAO, J.; ZHANG, H., CHEN, W. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, p. 1403-1436, 2019.
- SANTOYO, G.; GUZMÁN-GUZMÁN, P.; PARRA-COTA, F. I.; SANTOS-VILLALOBOS, S. D. L.; OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; GLICK, B. R. Plant growth stimulation by microbial consortia. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 219, 2021.
- SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; AVILÉS, M.; TRILLAS, I. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 1, p. 141-149, 2010.
- SERA, G. H.; DE CARVALHO, C. H. S.; DE REZENDE ABRAHÃO, J. C.; POZZA, E. A.; MATIELLO, J. B.; DE ALMEIDA, S. R.; BARTELEGA, L.; DOS SANTOS BOTELHO, D. M. Coffee leaf rust in Brazil: Historical events, current situation, and control measures. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 496, 2022.
- SHARIFI, R.; RYU, C. M. Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to Arabidopsis seedlings for eliciting induced resistance, or both? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 196, 2016.
- SHARIFI, R.; RYU, C. M. Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. **Annals of Botany**. n.122, p.349–358, 2018.
- SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H. M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v.2, n.587, p. 2-14, 2013.
- 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. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Fundag & Embrapa, Cap. 18. p. 277-288, 2009.
- SILVA, L. F.; ZAMBOLIM, L.; VIDIGAL, A. E.; RUBINGER, M. M. Potencial dos fungicidas do grupo dos ditiocarbimatos do controle da ferrugem do cafeeiro. *IN: X SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2019, Vitória. Anais X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Brasília, DF: Embrapa Café, 2019. p.4.*
- SILVA, H. S.; TOZZI, J. P.; TERRASAN, C. R.; BETTIOL, W. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, v. 63, n. 1, p. 62-67, 2012.
- SILVA, M. D. C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; AZINHEIRA, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; NICOLE, M.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICHOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 119-147, 2006.

- SILVA, M. G. D.; POZZA, E. A.; LIMA, C. V. R. V. D.; FERNANDES, T. J. Temperature and light intensity interaction on *Cercospora coffeicola* sporulation and conidia germination. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, p. 198-204, 2016.
- SILVA, J. F. M. D.; PELUZIO, J.M.; PRADO, G., MADEIRA, J. E. G. C.; SILVA, M. O.; DE MORAIS, P. B.; NICOLI, JR. Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.
- SINDHU, S. S.; SEHRAWAT, A.; SHARMA, R.; DAHIYA, A. Biopesticides: use of rhizosphere bacteria for biological control of plant pathogens. **Defence Life Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 135-148, 2016.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, n. 3, v. 4, p. 001438, 2011.
- SOUZA, A. G.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 10, p. 540-546, 2012.
- STEGLIŃSKA, A.; KOŁTUNIAK, A.; MOTYL, I.; BERŁOWSKA, J.; CZYŻOWSKA, A.; CIECIURA-WŁOCH, W. Lactic acid bacteria as biocontrol agents against potato (*Solanum tuberosum* L.) pathogens. **Applied Sciences**, v.12, p.7763, 2022.
- STRAFELLA, S.; SIMPSON, D. J.; YAGHOUBI KHANGHAHI, M.; DE ANGELIS, M.; GÄNZLE, M.; MINERVINI, F.; CRECCHIO, C. Comparative genomics and in vitro plant growth promotion and biocontrol traits of lactic acid bacteria from the wheat rhizosphere. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 78, 2020.
- TAHIR, H. A.; GU, Q.; WU, H.; RAZA, W.; HANIF, A.; WU, L.; GAO, X. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 171, 2017.
- TALHINHAS, P.; BATISTA, D.; DINIZ, I.; VIEIRA, A.; SILVA, D. N.; LOUREIRO, A.; TAVARES, S.; PEREIRA, A. P.; AZINHEIRA, H. G.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; VÁRZEA, V.; DO CÉU SILVA, M. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039, 2017.
- UNDP**. United nations development programme, precision agriculture for smallholder farmers (UNDP global centre for technology, innovation and sustainable development (Singapore: UNDP Global Centre for Technology, Innovation and Sustainable Development), 2021.
- UN DESA. **The Sustainable Development Goals Report 2023: Special Edition - July 2023**. New York, USA: UN DESA. © UN DESA., 2023. Disponível em: <https://sdgs.un.org/gsdrgsd2023>. Acesso em: 10 set. 2023.
- URGILES-GÓMEZ, N.; AVILA-SALEM, M. E.; LOJÁN, P.; ENCALADA, M.; HURTADO, L.; ARAUJO, S.; CORNEJO, P. Plant growth-promoting microorganisms in coffee production: from isolation to field application. **Agronomy**, v. 11, n. 8, p. 1531, 2021.
- VALE, P. A. S.; DE RESENDE, M. L. V.; DOS SANTOS BOTELHO, D. M.; DE ANDRADE, C. C. L.; ALVES, E.; OGOSHI, C.; GUIMARÃES, S. S. C.; PFENNING, L. H. Epitypification of *Cercospora coffeicola* and its involvement with two different

symptoms on coffee leaves in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 2, p. 399-408, 2021.

VANDEPLAS, S.; DAUPHIN, R. D.; BECKERS, Y.; THONART, P.; THEWIS, A. Salmonella in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 4, p. 774-785, 2010.

VANDENPLAS, Y; HUYS, G; DAUBE, G. Probióticos: informações atualizadas. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 06-21, 2015.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability: a review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

WANG, K.; DANG, W.; XIE, J.; ZHU, R.; SUN, M., JIA, F.; WANG, R. Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2365-2373, 2015.

WANG, X. Managing land carrying capacity: key to achieving sustainable production systems for food security. **Land**, v. 11, n. 4, p. 484, 2022.

WILLIAMS, N. T. Probiotics. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 67, n. 6, p. 449-458, 2010.

WOO, S. L.; PEPE, O. Microbial consortia: promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, n. 9, p. 1801, 2018.

YU, X.; LI, B.; FU, Y.; JIANG, D.; GHABRIAL, S.A.; LI, G.; YI, X. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 18, p. 8387-8392, 2010.

ZAMBOLIM, L. Doenças do Cafeeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2 – Doenças de plantas cultivadas. 5ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 193-213, 2016.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2016.

ZANARDO, E.; GONZAGA, R. P.; REIS, J. C. S.; J JUNIOR, W. Manejo de mancha de Phoma na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica*) com a utilização de diferentes produtos e épocas de aplicação. *IN: 40º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIIRAS*, 2014, Serra Negra. **Anais 40º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, Brasília, DF: Embrapa Café, 2014, p.3.

ZHOU, D.; HUANG, X. F.; CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M.; GUO, J. Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. **Plant and Soil**, v. 401, p. 259-272, 2016.