

Limitação Natural em Fitopatologia

Eugénia Gouveia

*Instituto Politécnico de Bragança/ESAB, Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia
- Apartado 1172, 5301-854 BRAGANÇA egouveia@ipb.pt*

Resumo

Os factores naturais que limitam o desenvolvimento das doenças das plantas estão relacionados com o antagonismo microbiano e a indução, no hospedeiro, de mecanismos de resistência. O antagonismo microbiano implica interacção directa entre os microrganismos que partilham o mesmo nicho ecológico estando bem caracterizados em fitopatologia os mecanismos baseados no hiperparasitismo, antibiose e competição por nutrientes. Os mecanismos de resistência, regulados pelo sistema gene a gene e pelos sistemas, actualmente muito estudados, induzidos depois do ataque dos parasitas (Resistência Sistémica Adquirida - SAR) proporcionam um estado de "imunização" das plantas que as protege do ataque dos parasitas. O conhecimento dos mecanismos do antagonismo microbiano proporcionou o desenvolvimento de estratégias de luta baseadas na introdução de agentes microbiológicos e na implementação de práticas culturais que promovem esse mesmo antagonismo natural. Por outro lado, o conhecimento dos mecanismos de resistência das plantas permitiu obter variedades resistentes enquanto a compreensão dos mecanismos SAR possibilitou a indução da resistência pela aplicação directa de substâncias naturais produzidas ou extraídas de microrganismos plantas ou algas. A luta biológica com a utilização de antagonistas tem tido uma utilização limitada e com resultados práticos com alguma inconsistência. No entanto, as potencialidades e os princípios da limitação natural só poderão ser concretizados através do conhecimento aprofundado das condições ecológicas de aplicação para garantir que a luta biológica em fitopatologia possa ser uma alternativa viável à utilização dos fungicidas de síntese química.

43

Palavras-chave: Luta biológica, hiperparasitismo, antibiose, Resistência Sistémica Adquirida (SAR), fungicidas bioquímicos.

Abstract

Title: Natural biocontrol in the phytopathological context

Natural biocontrol of plant diseases involves pathogens-antagonists relationships as well as host-mediated resistance responses. Microbial antagonism implies direct interaction between microorganisms sharing the same ecological niche. Three main interactions types are well characterized in the phytopathological context: parasitism, antibiosis and competition. Host-mediated resistance, by the gene-for-gene concept or by the recently studied phenomenon of Systemic Acquired Resistance (SAR), also provides plant protection against pathogens. Better understanding of natural biocontrol, have developed control strategies based on microbial antagonists and environmental management which can stimulate natural occurrence of microorganisms. Knowledge of plant resistance mechanisms is the scientific stand to obtain resistant cultivars that has been a generally successful approach against plant pathogens. Actually, the SAR concept can be induced by application of natural substances produced by or extracted from microorganisms, plants or algae. Even though biocontrol is promising often fails to control disease in the field. However, biocontrol can be a powerful alternative to chemical fungicides if more knowledge on limiting environmental parameters and methodologies of application could improve its efficacy.

Key words: Biocontrol, hiperparasitism, antibiosis, systemic acquired resistance (SAR), biochemical fungicides

Introdução

Nos agroecossistemas, ecossistemas simplificados onde se realiza agricultura, os inimigos das culturas podem ocorrer por um conjunto de factores não relacionados entre si (Gurr et al., 1998). As estratégias de luta baseiam-se essencialmente na utilização de produtos químicos que actuam por acção tóxica nos organismos parasitas. As consequências desta estratégia de luta são bem conhecidas, sendo necessário encontrar métodos inovadores e sustentáveis para os problemas relacionados com a resistência dos inimigos das culturas às substâncias químicas o ambiente e a segurança alimentar dos produtos agrícolas.

A limitação natural, na sua definição clássica em protecção vegetal, "Limitação do desenvolvimento dos inimigos das culturas em consequência de factores naturais presentes no ecossistema", apresenta em fitopatologia um sentido mais global incluindo as interacções patógeno – planta – microorganismos e não apenas os factores que afectam o patógeno. Em fitopatologia as estratégias para combater os patógenos (organismos causadores da doença) são muito diferentes dos utilizados para combater as doenças (processo). As doenças resultam de interacções complexas entre a planta e o patógeno mas também com os microorganismos de um determinado microcosmos do ecossistema como a superfície

radicular, as folhas ou os frutos. A definição de Wilson (1998) "Limitação natural das doenças das plantas por processos biológicos ou por produtos de processos biológicos" que inclui para além das interacções das populações microbianas o processo de patogénese e os mecanismos de resistência das plantas é a definição de limitação natural mais consensual em fitopatologia (Wilson, 1998; Elad et al., 1999; Zehnder et al., 2001; Alabouvette et al., 2006; Kim et al., 2008).

A limitação natural, no contexto da limitação dos agentes patogénicos, baseia-se nos princípios do antagonismo microbiano envolvendo o hiperparasitismo a antibiose e a competição por nutrientes. Resultando da acção directa entre microrganismos as interacções apresentam elevada especificidade como acontece no hiperparasitismo em que a acção directa no patogénio conduz à redução do inóculo como no fungo *Ampelomyces quisqualis* parasita de *Erysiphales* (Angeli et al., 2007) e situações em que ocorre hipovirulência com redução na progressão da doença, como está bem caracterizado em *Cryphonetria parasitica* (Anagnostakis & Day, 1979; Bissenger et al., 1997; Milgroom & Cortesi, 2004).

Em geral, os antagonistas que actuam por antibiose, não possuem um único modo de acção e a multiplicidade dos mecanismos de acção é considerado um factor da maior importância por garantir um antagonismo continuado no tempo com garantias acrescidas de eficácia. A competição por nutrientes é considerada um mecanismo geral de regulação de populações em microbiologia e considerado frequente no solo. Sendo um mecanismo difícil de demonstrar no contexto geral dos ambientes onde ocorrem as infecções nas plantas, está bem caracterizada a competição por elementos mínimos em *Pseudomonas fluorescens* baseada na produção de sideróforos (Jourdan et al., 2007) sendo ainda considerado um mecanismo da maior utilidade em aplicações pós-colheita com a utilização das leveduras *Candida oleophila* e *Metschnikowia fruticola* (Wilson et al., 1999)

As estratégias para combater as doenças (processo) baseiam-se em fitopatologia na obtenção de plantas resistentes às doenças. O conceito gene a gene de Flor (1956) colocou em evidência a interacção planta-patogénio quando postulou que a expressão da resistência por parte do hospedeiro depende do genótipo do parasita e a virulência do parasita depende do genótipo do hospedeiro. A aplicação dos princípios da interacção génica constitui a base dos programas de melhoramento para a resistência, permitindo identificar as fontes de resistência (genes) e obter as variedades resistentes por gerações segregantes.

As plantas possuem ainda outros mecanismos sofisticados de defesa que lhes permite responder ao ataque dos parasitas e a condições de stress ambiental sendo designada por Resistência Sistémica Adquirida (SAR). O mecanismo é elicitado apenas depois do ataque do patogénio. Envolve a síntese de fitoalexinas que atingem concentrações elevadas junto do local de infecção, reacções de hipersensibilidade (HR), processo que conduz à rápida necrose da célula que impede a progressão do patogénio (Kombrink & Shmelzer, 2001) e activação de genes que codificam proteínas relacionadas

com a patogénese (PR) (Van Loon, 1999). SAR é induzida em resposta a genes de avirulência do patogénio sendo efectiva para infecções subsequentes de um alargado grupo de patogénios incluindo vírus, bactérias e fungos e mantém-se por muitas semanas ou mesmo meses (Shirasu et al., 1996; Kombrink & Shmelzer, 2001; Oostedrop et al., 2001)

A aplicação racional e dirigida dos princípios da limitação natural é uma abordagem de protecção com soluções inovadoras que poderá proporcionar alternativas à utilização dos fungicidas de síntese química e terá grande impacto em termos da qualidade dos produtos agrícolas e na protecção do ambiente.

A limitação natural em fitopatologia, sendo um tema tão vasto e interdisciplinar, será aqui abordada apenas no contexto dos fungos fitopatogénicos. Na primeira parte analisam-se os factores de limitação natural por acção do antagonismo microbiano. A secção seguinte abordará os mecanismos que desencadeiam a resistência sistémica adquirida assim como a sua aplicação na protecção das doenças das plantas. Por fim, apresentam-se algumas considerações relacionadas com as potencialidades e dificuldades de aplicação dos princípios da limitação natural em protecção vegetal.

46 Antagonismo microbiano e limitação natural dos agentes patogénicos das plantas

O antagonismo microbiano resulta da interacção directa entre microrganismos que partilham o mesmo nicho ecológico. As interacções microbianas, com efeito nefasto nos patogénios, incluem o hiperparasitismo, antibiose e competição.

O hiperparasitismo é um mecanismo de antagonismo microbiano frequente tanto no ambiente solo como na superfície das folhas e dos frutos. São interacções muito específicas que conduzem em muitas situações à morte do patogénio com a consequente redução de inoculo. *Ampelomyces quisqualis* é hiperparasita em muitas espécies dos géneros *Erysiphe*, *Leveillula*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera* e *Uncinula*, que provocam nas plantas as doenças vulgarmente designadas por oídios. Muito estudado e bem caracterizado este hiperparasita infecta os oídios, produzindo picnidios no interior das hifas, conidióforos e cleistotecas. Para que o hiperparasita se instale é necessário elevada humidade e temperaturas na ordem dos 20-30 °C. Desenvolvido como fungicida microbiológico, nome comercial AQ10, a sua eficácia é muito variável sendo necessário fazer aplicações repetidas. Em videira (Angeli et al., 2007) verificaram que as aplicações no início da estação vegetativa foram pouco eficientes e mesmo quando aplicado no final da estação não aumentava o parasitismo das cleistotecas. O parasitismo natural foi também muito reduzido não ultrapassando 1% das cleistotecas.

Coniothyrium minitans é outro fungicida microbiológico comercializado na Europa, com elevada especificidade em *Sclerotinia* sp. e *Sclerotium cepivorum*. Sendo um hiperparasita dos esclerotos a sua

aplicação ao solo mesmo com elevadas quantidades (500-3000 kg ha⁻¹) não é eficaz para reduzir as infecções primárias e apenas a aplicação imediatamente a seguir ao aparecimento dos primeiros sintomas conseguem impedir a sobrevivência dos esclerotos (Gerlagh et al., 2003).

Outros fungos, nomeadamente estirpes de *Trichoderma* sp. e *Rhizoctonia solani* estão bem caracterizados quanto à sua capacidade de parasitismo (Suárez et al., 2005). Geralmente envolve reconhecimento específico entre o antagonista e o patógeno com degradação da parede celular por um conjunto de enzimas que permitem ao micoparasita invadir as hifas do patógeno.

Outro mecanismo de hiperparasitismo, bem caracterizado em *Cryphonectria parasitica*, envolve a redução da virulência do parasita e conseqüente redução da doença fenómeno designado por hipovirulência. A hipovirulência em *C. parasitica* está associada à presença de segmentos de RNA de cadeia dupla (dsRNA) no citoplasma do fungo (Anagnostakis & Day, 1979).

A hipovirulência no sistema "*Castanea sativa* – *C. parasitica*" é considerada o modelo biológico na interação vírus-fungo e constitui um meio natural de luta biológica com capacidade para alterar as características de virulência ao nível da população de *C. parasitica* e diminuir a incidência do cancro do castanheiro. A hipovirulência dsRNA é transmitida horizontalmente através da anastomose das hifas em estirpes vegetativamente compatíveis e não se transmite verticalmente pelos ascósporos - os esporos de origem sexuada e com uma taxa muito variável através dos conídios.

A facilidade em reproduzir a hipovirulência em laboratório possibilitou a sua utilização em programas de luta biológica. A eficácia deste meio de luta biológico, em castanheiro, depende da capacidade de transmissão dos hypovirus e dos mecanismos biológicos que a determinam nomeadamente os relacionados com a capacidade de replicação e agressividade do vírus, o seu efeito no hospedeiro e a sua capacidade de conversão e transmissão, assim com a estrutura genética da população de *C. parasitica*, das condições ambientais em cada região concreta e ainda as características da população de *C. sativa* que em parte determina a epidemiologia do fungo parasita (Allemann et al., 1999; Bissenger et al., 1997; Milgroom & Cortesi, 2004).

Resistência sistémica adquirida (SAR) e limitação natural das doenças das plantas

As plantas reagem a factores de *stress* bióticos e abióticos elicitando reacções de defesa. Aspecto referenciado nas plantas desde os anos 50, só recentemente, foi extensivamente estudado com a utilização da tecnologia de transformação das plantas, como é referido por Kuc (2001), um dos investigadores pioneiros no estudo deste mecanismo de resistência das plantas. Os microrganismos patogénicos induzem nas plantas mecanismos de resistência que podem ter uma expressão localizada ou manifestarem-se de forma sistémica. A resistência sistémica designada inicialmente por

SIR é actualmente incluída nos mecanismos que integram o fenómeno geral da resistência Sistémica Adquirida SAR. Este mecanismo tem sido extensivamente estudado ao nível celular e molecular e está associada com a activação de genes que codificam proteínas relacionadas com a patogénese (PR). A resposta da planta ocorre em poucos minutos e os genes envolvidos são activados. O mecanismo inclui um rápido fluxo de iões inorgânicos através da membrana plásmica (Blee et al., 2004), acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Métraux, 2001) e alteração na fosforilação das proteínas (Dietrich et al., 1990). A elicitação das reacções envolve o reconhecimento inicial do tipo de agressor por parte da planta. Este reconhecimento molecular imediatamente inicia uma cascata de sinais moleculares e a transcrição de genes, muitas vezes, designados por SAR genes. Métraux (2001) e Lopéz et al. (2008) referem, citando outros autores, que alguns genes codificam proteínas como fenilamina amónia liase (PAL) e peroxidases que actuam no metabolismo dos fenóis. Outros genes codificam hidroxiprolinas e glicoproteínas relacionadas com o espessamento da parede celular e outros genes codificam ainda para proteínas relacionadas com a patogénese (PR) nomeadamente quitinases e β -1-3 glucanases relacionados com respostas de resistência sistémica. A indução de PRs é mediada quimicamente pela via do ácido salicílico (molécula sinal) e a sua expressão assim como o fenótipo resistente SAR pode ser induzido pela aplicação exógena de ácido salicílico ou seus análogos sintéticos como o ácido 2,6- dicloisonicotínico (INA) ou benzotiazole (BTH). Outras vias metabólicas e outras moléculas sinal como o ácido jasmónico e o etileno foram identificados como vias metabólicas activadas em sistemas não relacionados com organismos fitopatogénicos como acontece mas rizobactérias promotoras do crescimento (PGPR) (Kuc, 2001; Kombrink & Schmelzer, 2001; Lopéz, et al., 2008).

Muitos microrganismos, patogénicos ou não e, substâncias naturais ou inorgânicas têm evidenciado a capacidade de induzir SAR nas plantas. Muitos microrganismos como os incluídos no grupo das rizobactérias e algumas espécies ou estirpes de *Trichoderma* promovem o crescimento das plantas. Os mecanismos associados a este efeito foram anteriormente relacionados com o efeito antagonista directo através da produção de antibióticos e competição por nutrientes, mediado pelo sistema sideróforo, são actualmente explicados, com base em evidências experimentais pela activação dos sistemas de defesa da planta (Mercado-Blanco et al., 2004; Suárez et al., 2005; Heather & Benson, 2007; Jourdan et al., 2007).

As substâncias e os microrganismos que induzem a resistência não activam a síntese do mesmo tipo de proteínas PRs e a identificação da substância N-alkilato benzilamina (NADB), suporta em termos experimentais, que existirão diferentes determinantes e moléculas sinal de elicitação de resistência (Jourdan et al., 2007). Os lipopéptidos, surfactina e fengicina, referidos pelo mesmo autor, característicos em *Bacillus* sp. são também uma nova classe de produtos relacionadas com bactérias não patogénicas que são reconhecidas pelas plantas como sinais de indução de resistência.

Muitas substâncias naturais como extractos de plantas ou compostos inorgânicos de ferro, cobalto ou cobre induzem nas plantas mecanismos de defesa (Kuc, 2001) e tem sido utilizados e testados em situações de aplicação prática (Gottstein & Kuc, 1989; Kuc, 2001)

A compreensão dos mecanismos SAR tem proporcionado o desenvolvimento de substâncias activas que induzem os mecanismos de defesa das plantas. Silverman et al., (2005) refere o acibenzolar-s-metil o princípio activo do Actigard 50 WG e o Oryzemate cuja substancia activa é o probenazole que induz o mesmo mecanismo de defesa em arroz.

Além destas substâncias, que em termos de protecção vegetal são considerados produtos químicos, alguns produtos que actuam por estímulo das defesas das plantas são considerados nos EUA pesticidas bioquímicos por serem substâncias naturais que actuam nos inimigos das culturas por mecanismos não relacionados com a toxicidade directa (<http://www.epa.esa.gov/pesticides/biopesticides>). Na Europa, este tipo de substâncias são frequentemente comercializadas como bioestimulantes das plantas e não como produtos para a protecção das plantas não sendo assim regulados pela directiva 91/414/CEE

Potencialidades e limitações na aplicação dos princípios da limitação natural no contexto da fitopatologia

A limitação natural é, em termos gerais, efectiva e as doenças das plantas ocorrem quando os mecanismos de equilíbrio se alteram em favor do patogénio. Quando os antagonistas naturais não actuam ou não estão presentes é necessário fazer a sua introdução utilizando os mecanismos naturais que seriam eficazes no controlo da doença. Esta estratégia de luta tem em consideração o respeito pelos processos naturais o que aliado a uma elevada especificidade de acção constituiria uma base segura de aplicação tanto em termos práticos com ambientais.

Os resultados da aplicação prática em termos de eficácia apresentam, no entanto, alguma inconsistência (Alabouvette et al., 2001). Muitos factores, como refere o mesmo autor, podem estar associados a essa inconsistência de resultados e muitos deles estão relacionados com a passagem ao campo dos resultados do laboratório. Os microrganismos e os mecanismos de antagonismo, apesar de bem caracterizados em termos científicos, em aplicação prática torna-se difícil estabelecer as fronteiras entre antibiose e lise ou entre competição e parasitismo. Os antagonistas, sendo microrganismos e não produtos químicos com acção tóxica em todos os ambientes onde são aplicados, é necessário ter em consideração as condições e exigências biológicas e de interacção com os outros microrganismos do microcosmos onde são aplicados.

O tipo de formulação e de inoculo a aplicar assim como a dose e época de aplicação são determinantes para garantir o contacto e o estabelecimento das relações com elevada especificidade. Nas situações em que o modo de acção dominante é a antibiose, os metabolitos activos não são produzidos em grande quantidade e não atingem grandes distâncias, sendo necessário colocar o inoculo nos locais que garantam o contacto com o patogénio. Por exemplo, *Pseudomonas chlororaphis* (comercializado na Europa) é eficaz quando aplicado à semente pela coincidência espaço-temporal com o patogénio, uma vez que o antagonista produz 2,3-deseptoxi-2,3-didesidrorrizoxina, mas não coloniza a rizosfera. Quando a competição é o modo de acção dominante a população do antagonista tem que estar em concentração muito mais elevada para aumentar as hipóteses de contacto com o patogénio (Gerlagh et al., 2003).

A especificidade de acção, aspecto considerado da maior importância em estratégias de luta química, nem sempre resulta em termos práticos com a aplicação dos antagonistas apesar da especificidade ser um atributo do modo de acção de muitos deles. Na prática, a população de organismos patogénicos apresenta variabilidade e um único antagonista pode não ter a mesma eficácia para todos os patótipos presentes na população patogénica (Benson & Oslon 2007; Kim et al., 2008). Por outro lado, as condições ambientais que favorecem o patogénio podem não ser as que favorecem o estabelecimento do antagonista.

As estratégias para aumentar a eficácia dos produtos com base nos antagonistas passa pelo conhecimento aprofundado das condições de aplicação, aspecto muito menos estudado e conhecido, pela associação de diferentes modos de acção com expressão simultânea ou sucessiva, associação de diferentes antagonistas com diferentes modos de acção, ou associando diferentes antagonistas com exigências ambientais diferentes (Alabouvette et al., 2006, Szczech & Dyki, 2007)

Embora se conheçam muitos antagonistas e respectivos modos de acção, poucos antagonistas tiveram um desenvolvimento em aplicações práticas e menos ainda são utilizados à escala comercial. Na Europa, os produtos microbiológicos que podem ser utilizados no combate às doenças das plantas e incluídos na Lista Positiva Comunitária (LPC – Anexo I da Directiva 91/414/ CEE) são em número muito reduzido. Inclui apenas *Ampelomyces quisqualis* estirpe AQ10, *Coniothyrium minitans* estirpe COM/M/91, *Pseudomonas chlororaphis* embora outros estejam ainda em processo de autorização de venda (www.dgadr.pt). O número de fungicidas microbiológicos em comercialização na Europa é muito reduzido e alguns autores associam a esse facto a falta de eficácia e inconsistência dos resultados assim como a dificuldades de aplicação dos produtos mas também às exigências das entidades reguladoras, uma vez que os produtos microbiológicos são regulados pela mesma directiva que autoriza a comercialização dos produtos químicos com efeito tóxico.

A limitação natural mediada pelos mecanismos de resistência induzidos depois do processo de infecção (SAR) permitiu a aplicação de soluções inovadoras e de fácil utilização na protecção das plantas contra os patogénios.

A constatação de que muitos microrganismos, patogénicos e não patogénicos e um grande conjunto de produtos naturais e inorgânicos, induzem nas plantas mecanismos de defesa determinou a sua utilização em situações práticas. Produtos como os extractos de plantas, nomeadamente os extractos de *Azadirachta indica*, extractos de algas (laminarinas), produtos do metabolismo secundário de microrganismos como *harpin* e óleos essenciais como o mentol ou o genariol e outros produtos como o *chitosan* e a quitina tem sido experimentados em utilizações práticas na protecção das plantas (Alabouvette et al., 2006; Kuc, 2001). Alguns destes produtos têm uma utilização tradicional em determinadas regiões do globo, como os extractos das plantas, mas outros, como as laminarinas, são produtos relativamente recentes no mercado.

Os mecanismos básicos de indução da resistência quando induzidos por estas substâncias são semelhantes aos estudados nos microrganismos fitopatogénicos e sendo produtos naturais e frequentes na natureza e com uma utilização vantajosa em termos económicos têm a vantagem de poderem ser utilizados nos modos de produção biológica onde a utilização dos produtos de síntese química não é permitida.

Muitas destas substâncias são legalmente autorizadas nos EUA para protecção das plantas e classificados como fungicidas bioquímicos por não actuarem por acção tóxica directa nos parasitas. Na Europa, esta classificação não é adoptada e estas substâncias são muitas vezes comercializadas como bioestimulantes. Nesta circunstância o processo de autorização de venda não é regulado pela directiva 91/414 CEE e, apesar de não serem comercializadas como produtos para a protecção das plantas, constituem uma alternativa económica à utilização de fungicidas de síntese química.

A resistência SAR considerada um fenómeno frequente nas plantas e induzido por muitos microrganismos e produtos naturais ou inorgânicos pode ser desenvolvida no sentido de complementar outros meios de protecção e constituir assim um novo conceito de protecção contra as doenças das plantas, tanto em termos de modos de acção dos produtos como de estratégias de protecção contra os organismos fitopatogénicos.

Referências

- Alabouvette, C., Olivain, C. & Steinberg C. 2006. Biological control of plant diseases: The European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 329-341.
- Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U. & Rigling, D. 1999. Genetic of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology*, 8:843-845.

- Anagnostakis, S. & Day, P. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 69: 1226-1229.
- Angeli, D., Longa, C. & Perot I. 2007. Valuation of new biological control agents against grapevine powdery mildew under greenhouse conditions. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*. IOBC/ wprs, Bulletin, 30 (6) : 37-42.
- Apostoli, I., Heinstein, P. & Low, P. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology*, 90: 109-166.
- Bissenger, M., Rigling, D. & Heiniger, U. 1997. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology*, 87: 50-59.
- Blee, K., Yang, K. & Anderson, A. 2004. Activation of defense pathways. Synergism between reactive oxygen species and salicylic acid and consideration of field applicability. *European Journal of Plant Pathology*, 110 : 203-212.
- Dietrich, A., Mayer, J. & Hahlbrock, K. 1990. Fungal elicitor triggers transient, and specific proteinphosphorylation in parsley cell suspension cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 6360-6388.
- Elad, Y., Bélanger, R. & Kohl, J. 1999. Biological control of diseases in the phyllosphere. *Integrated Pest Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Gerlagh, M., Geijn, G., Hoogland A. & Vereijken P. 2003. Quantitative aspects of infection of *Sclerotinia sclerotia* by *Coniothyrium minutans* timing of application, concentration and quality of conidial suspension of the mycoparasite. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 489-502.
- Gorlach, J., Volrath, S., Beiter, G., Hrny, G., Beckhove, U., Kogel, K., Oostendrop, M., Saub, E., Kessman, H. & Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, 8: 629-643.
- Gottstein, H. & Kuc, J. 1989. The induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. *Phytopathology*, 79 : 271-275.
- Gurr, M.G., Emden, H. F. & Wratten, D. S. 1998. Habitat manipulation and natural enemy efficiency: implications for the control of pests. In *Conservation Biological Control*. Pedro Barbosa, Ed. Academic Press, USA.
- Heather, O. & Benson, D. 2007. Induced systemic resistance and role of binucleate *Rhizoctonia* and *Trichoderma hamatum* 382 in biocontrol of *Botrytis* blight in geranium. *Biological Control*, 42:233-241.
- Jourdan, E., Ongena, M., Adam, A. & Thonart P. 2007. PGPR-induced systemic resistance: activity of amphiphilic elicitors and structural analogues on different plant species. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*, IOBC/ wprs, Bulletin, 30 (6) : 123-126.
- Kim, Y., Jung, H., Kim, K. & Park K. 2008. An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitonolytic bacteria under different field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 373-382.
- Kombrink, E. & Schmelzer, E. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 69-78.
- Kuc, Joseph. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 7-12.
- López, A., Bannenberg, G. & Castresana, C. 2008. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Current Opinion in Plant Biology*, 11 : 420-427.
- Mátraux, J. P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 13-18.
- Mercado-Blanco, J., Rodriguez, D., Hervás, A. & Díaz, M. 2004. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, 30: 474-486.

- Milgroom, M. & Cortesi, P. 2004 – Biological Control of Chestnut Blight With Hypovirulence: A Critical Analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 311-38.
- Oostedrop, M., Kunz, W., Dietrich, B. & Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 19-28.
- Sharma, Y., León, J., Raskin, I. & Davis, K. 1996. Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings National Academy Sciences, USA*, 93: 5099-5104.
- Shirasu, K., Dixon, R. & Lamb, C. 1996. Signal transduction in plant immunity. *Current Opinion in Immunology*, 8 : 3-7.
- Silverman, F., Petracek, D., Heiman, D., Fledderman, C. & Warrior, P. 2005. Salicylate activity, 3. Structure relationship to systemic acquired resistance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 9775-9780.
- Suárez, B., Sanz, L., Chamorro, M., Rey, M., González, F., Llobell, A. & Monte, E. 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 924-934.
- Szczech, M. & Dyki, B. 2007. Combination of microbial biocontrol agents to control rhizoctonia damping-off and fusarium wilt of tomato. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. IOBC/ wprs, Bulletin*, 30 (6) :415-418.
- Van Loon, L. & Strien, E. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-I type proteins. *Physiology Molecular Plant Pathology*, 55: 716-724
- Wilson, L. C. 1998. Conservation epiphytic microorganisms on fruits and vegetables for biological control. In *Conservation Biological Control*. Pedro Barbosa, Ed. Academic Press, USA.
- Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E. & Kloepper, J. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 39-50.