

FERNANDO HADDAD

CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

FERNANDO HADDAD

CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM DO CAFEEIRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 12 de março de 2008.

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Co-Orientador)

Prof. Acelino Couto Alfenas

Pesq. Hudson Teixeira

Pesq. Antônio Alves Pereira

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

A minha esposa Lydice, que esteve ao meu lado em todos os momentos

Ao meu filho Arthur, que dedico não só minha vida acadêmica,

mas sim tudo que tenho de melhor

Aos meus pais Farid e Aid, que nas horas de alegria e tristeza

sempre estiveram do meu lado

Ao meu Irmão Marcelo e meus sobrinhos

Gabriel e Manuela

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Lydice, pelo companheirismo e apoio durante todo o doutorado.

A chegada do meu filho Arthur, que junto com minha esposa são fontes inspiradoras para minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

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

Ao Prof. Luiz Antonio Maffia, pela dedicação e ensinamentos.

Ao Prof. Eduardo S. G. Mizubuti, que esteve sempre à disposição para sugestões e críticas durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Reginaldo S. Romeiro e Acelino Couto Alfenas pelas sugestões e críticas.

Aos Pesq. Hudson Teixeira e Antônio Alves Pereira pelas sugestões e críticas.

Aos demais professores do departamento de fitopatologia, que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários do DFP, especialmente a Marco Rogério, Camilo, Jésus, Délio, Rita, Mário, Geraldo e Brás, pela amizade e colaboração.

A todos os colegas da turma e laboratório pelos momentos descontraídos e de estudos passados juntos, especialmente os amigos Luciano, Valdir, Rodrigo, Julio e Paulo.

Aos meus pais que me deram uma formação muito além da acadêmica.

A José Lydio e Nice, pais de minha esposa, que me acolheram como parte da família.

A família de minha esposa, pelo apoio e momentos de lazer.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDO HADDAD, filho de Farid Haddad e Aid Haddad, nascido em Andradina, Estado de São Paulo, no dia 15 de setembro de 1973.

Em 1996, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde graduou-se em março de 2001.

Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Aperfeiçoamento em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (MG), com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

Em abril de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (MG), com obtenção do título em 2004.

Em março de 2004, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (MG), com obtenção do título em 2008.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS.....	3
ARTIGO 1	
Biological control of coffee rust by antagonist bacteria in field conditions	8
Abstract	9
1. Introduction.....	10
2. Material and methods.....	12
3. Results	14
4. Discussion.....	15
References.....	18
Tables and Figure.....	23
ARTIGO 2	
Mecanismo de ação de bactérias antagonistas a <i>Hemileia vastatrix</i>	26
Resumo.....	27
Abstract	28
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	31
3. Resultados	37
4. Discussão.....	39
Referências.....	43
Tabelas e Figuras.....	49
ARTIGO 3	
Sobrevivência de <i>Bacillus</i> sp., antagonista a <i>Hemileia vastatrix</i> , no filoplano de cafeeiros.....	53
Resumo	54
Abstract	55
1. Introdução.....	56
2. Material e Métodos.....	57
3. Resultados.....	61
4. Discussão	63
Referências.....	66
Tabela e Figuras.....	70
CONCLUSÕES GERAIS.....	74

RESUMO

HADDAD, Fernando, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2008.
Controle biológico da ferrugem do cafeeiro. Orientador: Luiz Antonio Maffia.
Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Reginaldo da Silva Romeiro.

Este trabalho integra um programa de controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*, Hv) em cafezais orgânicos. Em duas lavouras, durante 3 anos, compararam-se isolados bacterianos. O B157 (*Bacillus* sp.) e o P286 (*Pseudomonas* sp.) reduziram a intensidade da doença em relação à testemunha; a eficiência do B157 foi similar à de hidróxido de cobre. Para definir mecanismo(s) de antagonismo, após cultivar cada isolado em meio líquido 523 de Kado & Heskett, compararam-se os tratamentos: i-caldo do cultivo; ii-sobrenadante da centrifugação; iii-células centrifugadas ressuspensas em solução salina; iv-células inativadas por radiação ultravioleta; v-meio 523; e vi-solução salina. A germinação de urediniósporos e a severidade da ferrugem decresceram nos tratamentos i a iii. Aplicou-se cada isolado em diferentes concentrações e intervalos de tempo antes de inocular Hv em folhas. A eficiência de controle reduziu-se nas concentrações menores e nos intervalos maiores. Os isolados não protegeram mudas de infecções por *Cercospora coffeicola*. Houve proteção a Hv com aplicação dos isolados e inoculação de Hv nas mesmas folhas, mas não com aplicação e inoculação separadas espacialmente. Estudou-se a sobrevivência de B157 no filoplano de cafeeiros, em casa de vegetação e campo. Pulverizou-se suspensão, semanalmente amostraram-se folhas e determinou-se o número de unidades formadoras de colônia em meio seletivo. A população decresceu já na primeira semana pós-aplicação, mais abruptamente no campo, mas recuperaram-se colônias até 30 dias após aplicação. Para avaliar o efeito de fungicidas cúpricos na sobrevivência, pulverizou-se hidróxido de cobre em mudas em casa de vegetação e sulfato de cobre em cafeeiros adultos no campo. Após 30 dias, pulverizaram-se células de B157. Nos dois locais, ambos os fungicidas reduziram a

população de B157 ao longo do tempo. Como conclusão, o isolado B157 de *Bacillus* sp. exerce antibiose a Hv e pode controlar a ferrugem em cultivos orgânicos de cafeeiro. Não se deve alternar pulverizações do isolado e de fungicidas cúpricos, a não ser que, em calendários de pulverizações, inicialmente aplique-se a bactéria.

ABSTRACT

HADDAD, Fernando, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2008. **Biological control of coffee rust.** Adviser: Luiz Antonio Maffia. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Reginaldo da Silva Romeiro.

This thesis is part of a research program aiming to biocontrol coffee rust (*Hemileia vastatrix*, Hv) in organically-grown coffee. Efficiency of bacterial isolates was compared in two plantations, during 3 years. Isolates B157 (*Bacillus* sp.) and P286 (*Pseudomonas* sp.) reduced disease intensity relative to the control; B157 was as efficient as copper hydroxide. To define mechanism(s) of antagonism, each isolate was grown in liquid 523 Kado & Heskett medium, and six treatments were compared: i-growth broth; ii-supernatant of centrifugation; iii-centrifuged cells resuspended in saline solution; iv-cells inactivated by ultraviolet radiation; v-523 medium; and vi-saline solution. Urediniospores germination and rust severity decreased in treatments i to iii. Each isolate was applied in leaves at different concentrations and time intervals before inoculating Hv. Control efficiency decreased at the smallest concentrations and largest intervals. The isolates did not protect plants from infection by *Cercospora coffeicola*. Leaves were protected against Hv by applying the isolates on the same leaves Hv was inoculated; there was no protection when application and inoculation were spatially apart. B157 survival on the phylloplane was studied under greenhouse and field conditions. Bacterial suspension was spread, leaves were weekly sampled, and the number of colony forming units was assessed in a selective medium. Bacterial population decreased after 7 days of application at both conditions, steeper in the field, although colonies were recovered up to 30 days after application. Plants were sprayed with copper hydroxide (greenhouse) or copper sulphate (field), and, after 30 days, with B157 cells. Both fungicides reduced B157 population throughout time. In conclusion, *Bacillus* sp. B157 isolate has antibiosis to Hv and is a biocontrol agent to rust in coffee

organic systems. Alternating sprays of cupric fungicides and B157 is not feasible, unless the bacterium is firstly applied in a calendar spray schedule.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (Mapa, 2007). Na safra 2006/2007, o país produziu 42,5 milhões de sacas de 60 kg, sendo metade da produção concentrada no Estado Minas Gerais (Mapa, 2007). Em 2007, as exportações foram de 28 milhões de sacas, que renderam ao país 3,9 bilhões de dólares (Mapa, 2007). Há uma demanda crescente, principalmente pelo Japão e países europeus e norte-americanos, pelos denominados “cafés especiais”, inclusive o produzido organicamente, que tem alto valor agregado e pode atingir preço duas vezes superior ao dos cafés tradicionais (Caixeta, 2002). Segundo a Associação de Cafeicultura Orgânica do Brasil (ACOB), a taxa de crescimento anual da produção de café orgânico é de 50%, estando concentrada em Minas Gerais.

A cafeicultura orgânica tem normas oficiais de produção (Brasil, 1999), como a proibição de uso de pesticidas e de organismos geneticamente modificados no controle de doenças, o que pode aumentar sua intensidade. A principal doença do cafeeiro é a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), que pode causar perdas na produção superiores a 50% (Zambolim et al., 1997). Na cafeicultura orgânica, pode-se manejar a ferrugem com cultivares resistentes e produtos à base de cobre, se autorizado pela entidade certificadora (Carvalho et al., 2002). O controle da ferrugem por meio de variedades resistentes é promissor (Zambolim et al., 1997), porém, a variabilidade fisiológica do patógeno compromete a durabilidade da resistência (Van der Vossen, 2005). Em vista da dificuldade de obter resistência duradoura, de a maioria das áreas serem plantada com cultivares suscetíveis e do aumento nas restrições para aos produtos à base de cobre (Carvalho et al., 2002), há necessidade de alternativas para manejo da ferrugem. O controle biológico é uma alternativa viável, pois o cultivo orgânico é um sistema apropriado para desenvolvimento e comercialização de produtos biológicos

(Harman, 2000), inclusive daquelas com potencial de uso no controle biológico de doenças (Pedine, 2000).

Controle biológico pode ser definido “como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem” (Cook e Baker, 1983). No controle biológico, comumente utilizam-se antagonistas, definidos como microorganismos não patogênicos que interferem na sobrevivência ou atividades determinantes de doenças causadas por patógenos (Cook e Baker, 1983). Há escassez de produtos contendo agentes de biocontrole, principalmente pela dificuldade de obter um antagonista efetivo em condições de campo (Guetsky et al., 2001). Como as bactérias têm crescimento rápido, utilizam diversas fontes de nutrientes e sobrevivem em ampla faixa de condições, espera-se que sejam potenciais agentes de biocontrole (Cook e Baker, 1983). Haddad (2004) selecionou sete isolados bacterianos eficientes no biocontrole da ferrugem do cafeeiro em casa de vegetação. Esses isolados foram provisoriamente identificados, pela análise do perfil de ácidos graxos, como sendo espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* (Haddad, 2004).

Espécies de *Pseudomonas* e de *Bacillus* são eficazes no biocontrole de várias doenças (Saravanan et al., 2004; Radjacommare et al., 2004; Bolwerk et al., 2003; Raaijmakers et al., 1999; Chin-A-Woeng et al., 1998; Flaishman et al., 1996), inclusive da ferrugem do cafeeiro (Costa et al., 2007; Shiomi et al., 2006; Bettiol et al., 1994; Bettiol e Várzea, 1992; Porras, 1999). Para espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus*, é relatada a produção de compostos com ação antimicrobiana (Romero et al., 2007; Raaijmakers et al., 1999; Duffy e Défago, 1999; Chin-A-Woeng et al., 1998; Flaishman et al., 1996; Bettiol et al., 1994; Bettiol e Várzea, 1992) e indução de resistência sistêmica – ISR (Ongena et al., 2007; Teixeira et al., 2005; Silva et al., 2004; Saravanan

et al., 2004; Radjacommare et al., 2004; Bolwerk et al., 2003; Porras, 1999) entre outros mecanismos de ação. Outro aspecto importante é que, para ser eficiente, um agente de biocontrole não depende apenas de sua ação antagonista, mas também da sua capacidade de se manter na superfície da planta hospedeira, ou seja, de competir com a microflora já existente, multiplicá-la e persistir sob condições adversas (Fokkema, 1990).

Apesar dos vários trabalhos realizados para controle biológico da ferrugem do cafeeiro, os antagonistas utilizados não são específicos para cultivos orgânicos e não foram feitos em nível de campo. Com isto, o primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar se as bactérias selecionadas são eficientes no controle da ferrugem do cafeeiro em condições de campo. Posteriormente, o(s) melhor(e)s isolado(s) foram avaliados quanto ao mecanismo de ação e em que fase do ciclo de vida de *H. vastatrix* esse(s) antagonista(s) estão atuando em acordo com sua dinâmica populacional no filoplano do cafeeiro.

REFERÊNCIAS:

- Bettioli, W., Saito, M. L., Brandão, M. S. B., 1994. Control of coffee leaf rust with products based on *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica* 20, 119-122.
- Bettioli, W., Várzea, V. M. P., 1992. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. *Fitopatologia Brasileira*. 17, 91-95.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Chin-A-Woeng, T. F. C., Lugtenberg, B. J. J., Bloemberg, G. V., 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 983-993.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa, nº 7, de 17 de maio de 1999. Dispõe sobre a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. LEX – coletânea de Legislação e Jurisprudência: legislação federal e marginália, São Paulo, ano 63, t.5, p.2465-2476, maio 1999.
- Caixeta, G. Z. T., Pedini, S., 2002. Comercialização de café orgânico. Informe Agropecuário 23, 149-152.
- Carvalho, V. L., Cunha, R. L., Chalfoun, S. M., 2002. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. Informe Agropecuário 23, 101-114.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., van der Bij, A. J., van der Drift, K. M. G. M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R. J., Keel, C., Bakker, P. A. H. M., Tichy, H. V., de Bruijn, F. J., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Molecular Plant-Microbe Interactions 11, 1069-1077.
- Cook, R. J., Baker, K. F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society, St Paul, USA.
- Costa, M. J. N., Zambolim L., Rodrigues F. A., 2007. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 32, 150-155.
- Duffy, B. K., Défago, G., 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied and Environmental Microbiology 65, 2429–2438.
- Flaishman, M. A., Eyal Z., Zilberstein A., Voisard C., Haas D., 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. Molecular Plant-Microbe Interactions 9, 642-645.

- Fokkema, N. J. E., 1990. Biological control of aerial plant surfaces. In: Komada, H., Kiritani, K., Bay-Petersen, J. (Eds.), The biological control of plant diseases. Food & Fertilizer Thecnology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan, pp. 41-48.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinoor A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91, 621-627.
- Haddad, F., 2004. Isolamento e seleção de antagonistas a *Hemileia vastatrix*. UFV, MSc Thesis, Viçosa.
- Harman, E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84, 377-393.
- MAPA, 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. www.agricultura.gov.br.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny J. L., Thonart P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* 9, 1084–1090.
- Pedini, S., 2000. Produção e certificação de café orgânico. In: Zambolim, L. (Ed.), *Café: Produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Editora Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp. 333-360.
- Porras, N. C., Leguizamon, C. J. E., Martinez, M. M., 1999. Induccion de resistencia por *Pseudomonas* spp., em plantulas de café contra la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. *Ascolfi-Infoma* 25, 12-14.
- Raaijmakers, J. M., Bonsall, R. F., Weller, D. M., 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 89, 470-475.

- Radjacommare, R., Kandan, A., Nandakumar, R., Samiyappan., 2004. Association of the hydrolytic enzyme chitinase against *Rhizoctonia solani* in rhizobacteria-treated rice plants. *Journal of Phytopathology* 152, 365-370.
- Romero, D., Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour S. E., Veening, J. W., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 430–440.
- Saravanan, T., Bhaskaran, R., Muthusamy, M., 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt disease. *Plant Pathology Journal* 3, 72-80.
- Shiomi, H. F., Silva, H. S. A., Melo, I. S., Nunes, F. V., Bettiol W., 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* 63, 32-39.
- Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Macagnan, D., Vieira, B. A. H., Pereira, M. C. B., Munteer, A., 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control* 29, 288-295.
- Teixeira, D. A., Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Maffia, L. A., Ferreira, E. M., 2005. Evidências de indução de resistência sistêmica a ferrugem do Eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira* 30, 350 – 356.
- Van der Vossen, H. A. M., 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M., Várzea, V. M. P. (Eds.), *Durable resistance to coffee leaf rust*. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp. 1-29.

Zambolim, L., Vale, F. X. R., Pereira, A. A., Chaves, G. M., 1997. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: Vale, F. X. R., Zambolim, L. (Eds.), Controle de doenças de plantas: grandes culturas, Vol. 1. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp.83-140.

Biological control of coffee rust by antagonist bacteria under field conditions

Fernando Haddad¹, Luiz A. Maffia^{1,2}, Eduardo S. G. Mizubuti¹, Hudson Teixeira¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil

² Contacts: Fax: +55 31 3899-1091. E-mail: lamaffia@ufv.br

Abstract

Organic coffee production has been on the increase in Brazil, especially in Minas Gerais state (MG). Rust (*Hemileia vastatrix*) is the most important coffee disease regardless of crop system. Rust control is based on chemicals. Because of the characteristics of the organic crop system, alternatives are required for disease control, and a program to obtain agents for rust biocontrol was established. Seven bacterial isolates, previously selected in greenhouse tests, were evaluated under commercial organic crop conditions in Machado, MG, in 2005 (E1) and 2006 (E2). Ten treatments (the bacteria isolates, copper hydroxide, calcium silicate and water) were applied as three (Exp1) or four (Exp2) monthly pulverizations. Rust severity and incidence were evaluated monthly. In Exp1, the pulverizations started in January 2005, and no treatment reduced rust progress. In November 2005, the incidence reached nearly 7.5% and sprays for Exp2 began. There were differences between treatments ($P < 0.0001$) regarding maximum incidence and severity (assessed in June 2006), rate of increase of the incidence between November 2005 and June 2006 and on the area under disease progress curve for both incidence and severity. Lower values for the three variables were obtained in the plots treated with copper hydroxide or a *Bacillus* sp. isolate (B157) and intermediate values with a *Pseudomonas* sp. isolate (P286). In a third experiment set in Ervália, MG, in 2007, isolates B157 and B286 were also evaluated. Isolate B157 reduced rust intensity as efficiently as copper hydroxide, and is a potential biocontrol agent of coffee rust for organic crop systems.

Key words: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, biocontrol, disease management.

1. Introduction

Brazil is the biggest coffee producer and exporter worldwide: in 2006/2007, 42.5 million bags were produced and, in 2007, Brazil exported 28 million bags, earning 3.9 billion dollars (Mapa, 2007). There is increasing demand, especially from Japan and the European and North American countries, for the so-called “special coffees”, including organic coffee, which has a high added value and can attain a price twice that of traditional coffee (Caixeta & Pedini???, 2002). According to the Brazilian Organic Coffee Association (ACOB), the annual growth rate for organic coffee production is 50%, concentrated in Minas Gerais, the major coffee producing state in Brazil.

The organic coffee crop system has an official standard, which prohibits the use of pesticides and the use of genetically modified organisms to control diseases. Even the use of copper-based products, which are normally allowed in organic systems, are being restricted (Carvalho et al., 2002). Organic crop systems favor human health and the environment, but intensity of diseases is expected to be higher in these systems because of the restrictions on pesticide usage. Leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br) is the main coffee disease and can cause yield losses up to 50% (Zambolim et al., 1997). When organic and conventional growing systems were compared regarding progress of diseases, higher coffee rust intensity was recorded in the organic system (Botelho, 2006).

Rust control by resistant varieties is promising, but physiological variability of the pathogen hinders durability of resistance (Van der Vossen, 2005). Considering that most coffee areas are planted with susceptible cultivars and the fact that restrictions on copper-based products have grown tighter, new alternatives for rust management are necessary. Biological control is a viable alternative, as organic crop is a feasible system for the development and commercialization of biological products (Fravel, 2005;

Harman, 2000; Pedine, 2000). In this paper, we will emphasize biological control by means of antagonists, non-pathogenic microorganisms that interfere in pathogen survival or in determinant activities of the disease (Cook & Baker, 1983).

Considering the lack of products to manage coffee rust in organic systems, we started a research program in 2003 aiming to find agents for disease biocontrol. A total of 393 microorganisms (154 bacteria and 239 fungi) were isolated from leaves, leaf residues and soil of organic coffee crop systems in three Minas Gerais localities. Seventeen isolates reduced the *H. vastatrix* infection frequency and sporulation in leaves of 6-month old 'Catuaí' plants by more than 70% (Haddad et al., 2004a). These isolates were sprayed on coffee plants up to 16 days before *H. vastatrix* inoculation; seven bacterial isolates reduced rust severity as efficiently as copper sulphate (Haddad et al., 2004b). Through fatty acids profile, six isolates were identified as *Bacillus* spp. and one as *Pseudomonas* sp.

Although rust biocontrol has been investigated (Shiomi et al., 2006; Bettiol et al., 1994; Bettiol & Várzea, 1992), no study was specifically addressed to the organic system and none was conducted under field conditions. Therefore, we aimed to determine if the seven selected bacteria are efficient biocontrol agents of coffee rust under field conditions. Partial results were previously presented at a meeting on biological control of fungal and bacterial plant pathogens (Haddad et al., 2007).

2. Material and Methods

The experiments were conducted for three years in two commercial coffee plantings that follow organic rules in two localities in the Minas Gerais state: Machado (876m altitude, 21°36'09''S and 45°48'15''W), containing 20-year-old plants of 'Novo Mundo'; and Ervália (839 m altitude, 20°54'56''S and 42°37'20''W), with 20-year-old plants of 'Catuaí'. Machado experiments (E) were conducted from January to November 2005 (E1) and from November 2005 to September 2006 (E2), whereas Ervália experiment was from January to November 2007 (E3).

Ten treatments were compared in E1 and E2: treatments 1 to 7 consisted each of seven bacterial isolates (B10; B25; B157; B175; B205; B281; and P286, where B or P stand for *Bacillus* or *Pseudomonas*, respectively); treatment 8 was copper hydroxide (0.88g/plant); treatment 9 was calcium silicate (0.14g Si/plant); and treatment 10 was water (control). Considering the results obtained in E1 and E2, sprays of four treatments were compared in E3: isolate P286 (*Pseudomonas* sp.), isolate B157 (*Bacillus* sp.), copper hydroxide (0.88g/plant) and water. All treatments were diluted in saline solution (0.85%) with Tween 20 (0.05%). Calcium silicate was included in E1 and E2 because it was commonly sprayed by the organic grower who wanted to find out whether it was effective in controlling rust. All treatments were applied (400mL of each per plant) using a backpack sprayer with a hollow cone-type nozzle (600 and 800 L/ha in Machado and Ervália, respectively). Sprays were on a monthly basis, according to the growers' spray schedule. The treatments were sprayed three times in E1 (beginning in January 2005, when incidence was above 23.8%), four times in E2 (beginning in November 2005, when incidence averaged 7.6%), and four times in E3 (beginning in January, when incidence averaged 5%). The bacterial isolates were preserved at 4°C on medium 523 (Kado & Heskett, 1970) in tubes. To prepare bacterial suspensions, each

isolate was seeded in medium 523 in plates, and incubated at 30°C in the dark. At the application time, normally one day after seeding, bacterial cells were washed from the culture medium using saline solution (0.85%) + Tween 20 (0.05%). The concentrated bacterial suspensions were transported to the field in thermo-boxes with ice and a final dilution (to $O.D._{540nm}=0.2$) was done before application.

The experiments were set in a randomized complete block design, with four replications (one experimental unit was constituted by eight or six plants, in Machado or Ervália experiments, respectively). Each block followed a planting row (planted at 4.5 x 1.5 m in Machado and 2.5 x 2 m in Ervália). One planting row was used as border between blocks and one border plant was left at each end of the plots in a block.

Monthly, 60-leaf samples (10 leaves/plant, 5 from each side) in E1 and E2 and 40-leaf samples in E3 (10 leaves/plant, 5 from each side) were collected from branches from the middle third of plants in each plot. In the laboratory, both disease incidence (Inc), as the percentage of diseased leaves, and severity (Sev) were evaluated. To evaluate Sev, images of the leaves were digitalized and the percentage of area diseased was estimated with a grading scale (Kushalappa & Chaves, 1978).

For each experiment, we calculated the area under disease progress curve for both Inc (AUDPCInc) and Sev (AUDPCSev). We also estimated the values of initial (y_0Inc and y_0Sev), maximum ($y_{max}Inc$ and $y_{max}Sev$) and increment (ΔInc and ΔSev) for Inc and Sev, respectively. The increments were calculated as $y_{max} - y_0$. All variables were subjected to analysis of variance, using SAS System v. 9.1. Treatment means for E1 and E2 were compared through Scott-Knott test ($\alpha = 0.01$), using the SAEG system, and for E3 through Tukey test ($\alpha = 0.01$), using SAS.

3. Results

Experiment 1- Progress curves of Inc and Sev followed the same trend: both rose from January to April (harvest time), when y_{\max} was achieved, and dropped from April to November (Figure 1). The treatments did not differ regarding $y_0\text{Inc}$, $y_0\text{Sev}$, $y_{\max}\text{Sev}$, ΔInc , ΔSev and AUDPCSev . Values of $y_{\max}\text{Inc}$ were lower with copper hydroxide and isolates P286, B281, B205, B157, B175, and B10 than calcium silicate, isolate B25, and the control (Table 1). Values of AUDPCInc were lower with isolates P286, B281, B205, B175, B157 and B10 than copper hydroxide, calcium silicate, isolate B25, and the control (Table 1).

Experiment 2- Progress curves of Inc and Sev followed a trend similar to E1: they increased from November 2005 to June 2006 (harvest time), when the maximum was achieved, and dropped from June to September (Figure 1). The treatments did not differ regarding $y_0\text{Inc}$ and $y_0\text{Sev}$, but differed ($P < 0.0001$) regarding $y_{\max}\text{Inc}$, $y_{\max}\text{Sev}$, ΔInc , ΔSev , AUDPCInc , and AUFPCSev (Table 1). Considering the last six variables, lowest values were always attained with copper hydroxide and B157. These two treatments did not differ from P286 for $y_{\max}\text{Sev}$ and Δmax . Isolate P286 effect was intermediate between the two best treatments above and the group formed by B25, B10, B281, B175, B205, calcium silicate, and the control that generated the largest values, especially of $y_{\max}\text{Inc}$, $y_{\max}\text{Sev}$, ΔInc and ΔSev (Table 1).

Experiment 3- Progress curves for Inc increased from January to June (harvest time), when the maximum was achieved, and dropped from June to November; for Sev the increase was from January to May or July, depending on the treatment, and dropped until November (Figure 1). The treatments did not differ regarding $y_0\text{Inc}$ and $y_0\text{Sev}$, but differed ($P < 0.0001$) regarding the other variables. As in E2 lowest values of those

variables were attained with copper hydroxide and B157. P286 values were intermediate, and highest values were with the control treatment (Table 2).

4. Discussion

The biocontrol agents selected were efficient in reducing the intensity of leaf rust under field conditions. Disease incidence was greatly reduced. Rust progress has been thoroughly studied in Brazilian conditions, and the disease can be assessed either by severity or incidence. Severity assessments through grading scales are difficult to accomplish and can be influenced by the skill of the evaluator (Madden et al., 2007). Incidence is easier to estimate, is related to severity (Silva-Acuña et al., 1999), is less influenced by subjectivities, and its use can speed up evaluations. Thus rust intensity in coffee experiments is commonly assessed by incidence, and this discussion will be mostly based on incidence values.

In general, the trends of disease progress curves of both incidence and severity were similar in the three experimental years, and were also similar to the trends found elsewhere (Costa et al., 2006; Pinto et al., 2002). Differences in the time of maximum intensity and curve shapes were found, which could be attributed to changes in environmental conditions, such as temperature, relative humidity, and rain intensity, as well as differences in coffee yield between years (Costa et al., 2006; Pinto et al., 2002).

In the first experiment, no treatment reduced rust intensity. Although some isolates reduced disease intensity when compared to the control, all values of maximum incidence were above 20%, which is unacceptable for successful disease control (Garçon et al., 2004; Zambolim et al., 1997). When the sprays started in January 2005, incidence was 23.8%, above the limit to start the sprays, which is 5% for protectant fungicides (Carvalho et al., 2002; Zambolim et al., 1997). The isolates exerted a

protectant effect against *H. vastatrix* (Haddad, et al., 2004b) by reducing urediniospores germination (unpublished data). Considering the regular threshold that “triggers” sprays of protectant fungicides, the treatments should have been applied earlier. Therefore, the low efficacy of treatments including the bacterial isolates was related to the delay in starting the sprays. In the second and third experiments, treatment sprays started when disease incidence ranged from 5 to 8%. Therefore, the B157 *Bacillus* sp. isolate was as efficient as the cupric fungicide in controlling rust. It seems that the epidemiological effect of this isolate on rust control is similar to the effect of fungicides. For polycyclic diseases, such as coffee rust, the reduction of progress rate has the most remarkable epidemiological effect on management (Zadoks & Schein, 1979). This effect is clear in the third experiment, in which rust progress curves in plots sprayed with either B157 or copper hydroxide were similar.

Reduction in rust intensity was expected to be achieved with all bacterial isolates, since they protected coffee plants against *H. vastatrix* for at least 16 days under greenhouse conditions (Haddad et al., 2004). Probably the inefficiency of the six isolates was due to a lack of adaptability to unfavorable conditions. Besides the antagonistic effect, an efficient biocontrol agent must survive on the phylloplane, competing with phylloplane residents, and must reproduce and survive under unfavorable conditions (Fokkema, 1990). Four *Bacillus* isolates efficient in controlling pumpkin powdery mildew (*Podosphaera fusca*) remained viable on the phylloplane for at least 16 days (Romero et al., 2004), whereas the population of a *B. subtilis* antagonist to *Cercospora beticola* declined sharply in the first 4 days of application, which reduced its efficiency (Collins et al., 2003). Therefore studies related to the dynamics of leaf populations of microorganisms as well as ecological studies of presumed biocontrol

agents are essential to direct strategies of diseases that affect the aerial plant parts (Kinkel, 1997). These studies are being pursued.

Pseudomonas and *Bacillus* species are effective in the biocontrol of several rusts (Teixeira et al., 2005; Flaishman et al., 1996), including coffee rust (Shiomi et al., 2006; Bettiol et al., 1994; Bettiol & Várzea, 1992; Porras, 1999). In the greenhouse, *B. subtilis* suspensions, sterilized or not, sprayed 24h before inoculating *H. vastatrix* reduced rust severity on coffee plants (Bettiol & Várzea, 1992). Metabolite extracts produced by *B. subtilis* in growth medium reduced rust severity by almost 100% when sprayed 24h before inoculating the pathogen (Bettiol et al., 1994). However, there is a lack of products containing biocontrol agents, especially because of the difficulties to obtain an effective antagonist under field conditions (Guetsky et al., 2001). As bacteria grow fast, use several nutritional sources and survive at a large range of temperatures, they are expected to be good biocontrol agents in the field (Cook & Baker, 1983). Moreover, *Bacillus* spp. produce endospores resistant to unfavorable conditions, such as ultraviolet radiation, drying, high temperatures and organic solvents, helping the antagonist's survival in the phylloplane (Driks, 2004; Raaijmakers et al., 2002; Emmert & Handelsman, 1999). Additionally, endospore formation facilitates the preparation of commercial formulations, increasing the *Bacillus* spp. potential of use (Fravel, 2005; Raaijmakers et al., 2002). Some *Bacillus* species are formulated as biofungicides and are successfully commercialized in the USA (Fravel, 2005).

Coffee rust control is strongly based on fungicides. Under organic systems, only cupric fungicides are allowed, which may lead to an accumulation of copper in the soils (Chaignon, 2003) and may be detrimental to human health and the environment (Flemmeng & Trevors, 1989). As a result, the use of biological control with the B157 isolate of *Bacillus* sp. may become a viable alternative to coffee rust management.

Bacillus spp. are used to control insects and diseases, including rust, in several crops. The isolate B157 was isolated and tested for five years under greenhouse and field conditions, and was successful in controlling coffee rust. Further studies, including toxicological ones, are required to define strategies for coffee rust management with this isolate. It is foreseen that the results gained will not be restricted to organic coffee production and may be used in general coffee crop systems, to support a more sustainable and ecologically correct crop production.

Acknowledgements

This research has been sponsored by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References

- Bettiol, W., Saito, M. L., Brandão, M. S. B., 1994. Control of coffee leaf rust with products based on *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica* 20, 119-122.
- Bettiol, W., Várzea, V. M. P., 1992. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. *Fitopatologia Brasileira* 17, 91-95.
- Botelho, A. O., 2006. Estudo do progresso e manejo de doenças foliares (*Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*) em cafeeiros durante a transição do sistema de cultivo convencional para o orgânico. UFLA, MSc Thesis, Lavras.
- Caixeta, G. Z. T., Pedini, S., 2002. Comercialização de café orgânico. *Informe Agropecuário* 23, 149-152.

- Carvalho, V. L., Cunha, R. L., Chalfoun, S. M., 2002. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. Informe Agropecuário 23, 101-114.
- Chaignon, V., Sanches-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B., Hinsinger, P., 2003. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. Environmental Pollution 123, 229-238.
- Collins, D. P., Jacobsen, B. J. Maxwell B., 2003. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. Biological Control 26, 224-232.
- Cook, R. J., Baker, K. F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society, St Paul, USA.
- Costa, M. J. N., Zambolim L., Rodrigues F. A., 2006. Efeito de níveis de desbaste de frutos do cafeeiro na incidência da ferrugem, no teor de nutrientes, carboidratos e açúcares redutores. Fitopatologia Brasileira 31, 564-571.
- Driks, A., 2004. The *Bacillus* spore coat. Phytopathology 94, 1249-1251.
- Emmert, E.A.B., Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiology Letters 171, 1-9.
- Flaishman, M. A., Eyal Z., Zilberstein A., Voisard C., Haas D., 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. Molecular Plant-Microbe Interactions 9, 642-645.
- Flemmeng, C. A., Trevors, J. T., 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. Water, Air, and Soil Pollution 44, 143-158.
- Fokkema, N. J. E., 1990. Biological control of aerial plant surfaces. In: Komada, H., Kiritani, K., Bay-Petersen, J. (Eds.), The biological control of plant diseases. Food & Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan, pp. 41-48.

- Fravel, D. R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43, 337-359.
- Garçon, C.L.P., Zambolim, L., Mizubuti, E.S.G., Vale, F.X.R., Costa, H., 2004. Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. Fitopatologia Brasileira 29, 486-491. 2004.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinoor A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91, 621-627.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Romeiro, R. S., 2004a. Isolating and screening antagonists to *Hemileia vastatrix*. In: Annual Meeting of the American Phytopathological Society, 2004, Anaheim, Ca. Phytopathology 94, S37.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Romeiro, R. S., 2004b. Biocontrol of coffee leaf rust with antagonists isolated from organic crops. In: Annual Meeting of the American Phytopathological Society, 2004, Anaheim, Ca. Phytopathology 94, S37.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Teixeira, H., 2007. Biocontrol as an alternative for leaf rust management in organically-grown coffee. IOBC/WPRS Bulletin 30, 93-96.
- Harman, E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84, 377-393.
- Kado, C. I., Heskett, M. G., 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60, 965-975.
- Kinkel, L. L., 1997. Microbial population dynamics on leaves. Annual Review of Phytopathology 35, 327-347.

- Kushalappa, A. C., Chaves, G. M., 1978. Escala para avaliar a percentagem de área foliar com ferrugem do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 3, 119.
- Madden, L. V., Hughes, G., van den Bosch, F., 2007. The study of plant disease epidemics. The American Phytopathological Society, St Paul, USA.
- MAPA, 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. www.agricultura.gov.br.
- Pedini, S., 2000. Produção e certificação de café orgânico. In: Zambolim, L. (Ed.), *Café: Produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Editora Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp. 333-360.
- Pinto, A. C. S., Pozza, E. A., Souza, P. E., Pozza, A. A. A., Talamini, V., Boldini, J. M., Santos, F.S., 2002. Descrição da epidemia da ferrugem do cafeeiro com redes neuronais. *Fitopatologia Brasileira* 27, 517-524.
- Porrás, N. C., Leguizamón, C. J. E., Martínez, M. M., 1999. Inducción de resistencia por *Pseudomonas* spp., em plantulas de cafe contra la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. *Ascolfi-Informa* 25, 12-14.
- Raaijmakers, J. M., Vlami M., Souza J. T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537–547.
- Romero, D., Pérez-García, A., Rivera, M. E., Cazorla, F. M., de Vicente, A., 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Applied Microbiology Biotechnology* 64, 263–269.
- Shiomi, H. F., Silva, H. S. A., Melo, I. S., Nunes, F. V., Bettiol W., 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* 63: 32-39.

- Silva-Acuña, R., Maffia, L. A., Zambolim, L., Berger, R. D., 1999. Incidence-severity relationships in the pathosystem *Coffea arabica*–*Hemileia vastatrix*. *Plant Disease* 83,186-188.
- Teixeira, D. A., Alfenas, A. C., Maffia, R. G., Maffia, L. A., Ferreira, E. M., 2005. Evidências de indução de resistência sistêmica a ferrugem do Eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira* 30, 350 – 356.
- Van der Vossen, H. A. M., 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M., Várzea, V. M. P. (Eds.), *Durable resistance to coffee leaf rust*. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp. 1-29.
- Zadoks, J. C., Schein, R. D., 1979. *Epidemiology and plant disease management*. Oxford University Press, New York, USA.
- Zambolim, L., Vale, F. X. R., Pereira, A. A., Chaves, G. M., 1997. *Café (Coffea arabica L.)*, controle de doenças. In: Vale, F. X. R., Zambolim, L. (Eds.), *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*, Vol. 1. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp.83-140.

Table 1 Coffee leaf rust incidence (Inc) and severity (Sev) values: initial (y_0), maximum (y_{max}), increment (Δ) and area under disease progress curve (AUDPC). Experiments conducted in an organic coffee plantation in Machado, MG, from January to November 2005 (E1) and from November 2005 to September 2006 (E2).

Treatment	January to November 2005								November 2005 to September 2006							
	y_0 (%)		y_{max} (%)		Δ (%)		AUDPC (% . days)		y_0 (%)		y_{max} (%)		Δ (%)		AUDPC (% . days)	
	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev
CuH ¹	19a ²	0.48a	46b	1.50a	27a	1.02a	7323a	205a	7.50a ²	0.14a	21c	0.78b	14c	0.64b	4135d	121d
B157 ³	24a	0.52a	48b	1.44a	24a	0.92a	6791b	187a	6.67a	0.15a	28c	1.25b	21c	1.10b	4830d	158d
P286	27a	0.63a	37b	1.38a	10a	0.74a	6210b	189a	8.33a	0.20a	39b	1.64b	31b	1.45b	6154c	217c
B25	26a	0.54a	52a	1.92a	26a	1.38a	7591a	222a	7.50a	0.16a	57a	3.19a	49a	3.03a	8567a	359a
B10	28a	0.63a	46b	1.71a	18a	1.08a	7146b	205a	7.50a	0.17a	50a	2.50a	42a	2.33a	7622b	296b
B281	22a	0.57a	38b	1.40a	16a	0.82a	6275b	189a	8.33a	0.12a	53a	2.87a	45a	2.75a	8116b	326b
B175	31a	0.64a	41b	1.60a	10a	0.96a	6634b	191a	7.50a	0.16a	50a	2.83a	43a	2.67a	7979b	327b
B205	24a	0.59a	40b	1.71a	16a	1.12a	6293b	200a	6.67a	0.19a	54a	2.92a	48a	2.73a	7936b	320b
SiCa ⁴	17a	0.43a	57a	2.22a	40a	1.79a	8120a	237a	7.92a	0.15a	53a	2.93a	45a	2.79a	8895a	363a
Control	20 ^a	0.44a	65a	2.65a	44a	2.21a	8624a	255a	7.92a	0.15a	53a	3.02a	45a	2.87a	9042a	385a

¹Copper hydroxide; ²means with the same letter/column are not different (Scott-Knott test, $\alpha=0.01$); ³ B or P= isolates of *Bacillus* or *Pseudomonas*, respectively; ⁴ Calcium silicate.

Table 2 Coffee leaf rust incidence (Inc) and severity (Sev) values: initial (y_0), maximum (y_{max}), increment (Δ) and area under disease progress curve (AUDPC). Experiment conducted in an organic coffee plantation in Ervália, MG, from January to November 2007.

Treat	y_0 (%)		y_{max} (%)		Δ (%)		AUDPC (% . days)	
	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev	Inc	Sev
Cu(OH) ₂ ¹	4.38a ²	0.08a	23c	0.60c	18c	0.52c	3564c	88c
B157 ³	3.75a	0.05a	25c	0.60c	21c	0.55c	3350c	74c
P286	5.00a	0.05a	34b	1.01b	29b	0.96b	4886b	156b
Control	5.00a	0.05a	50a	1.80a	45a	1.75a	7114a	259a

¹Copper hydroxide; ²means with the same letter/column are not different (Tukey test, $\alpha=0.01$); ³B or P= isolates of *Bacillus* or *Pseudomonas*, respectively.

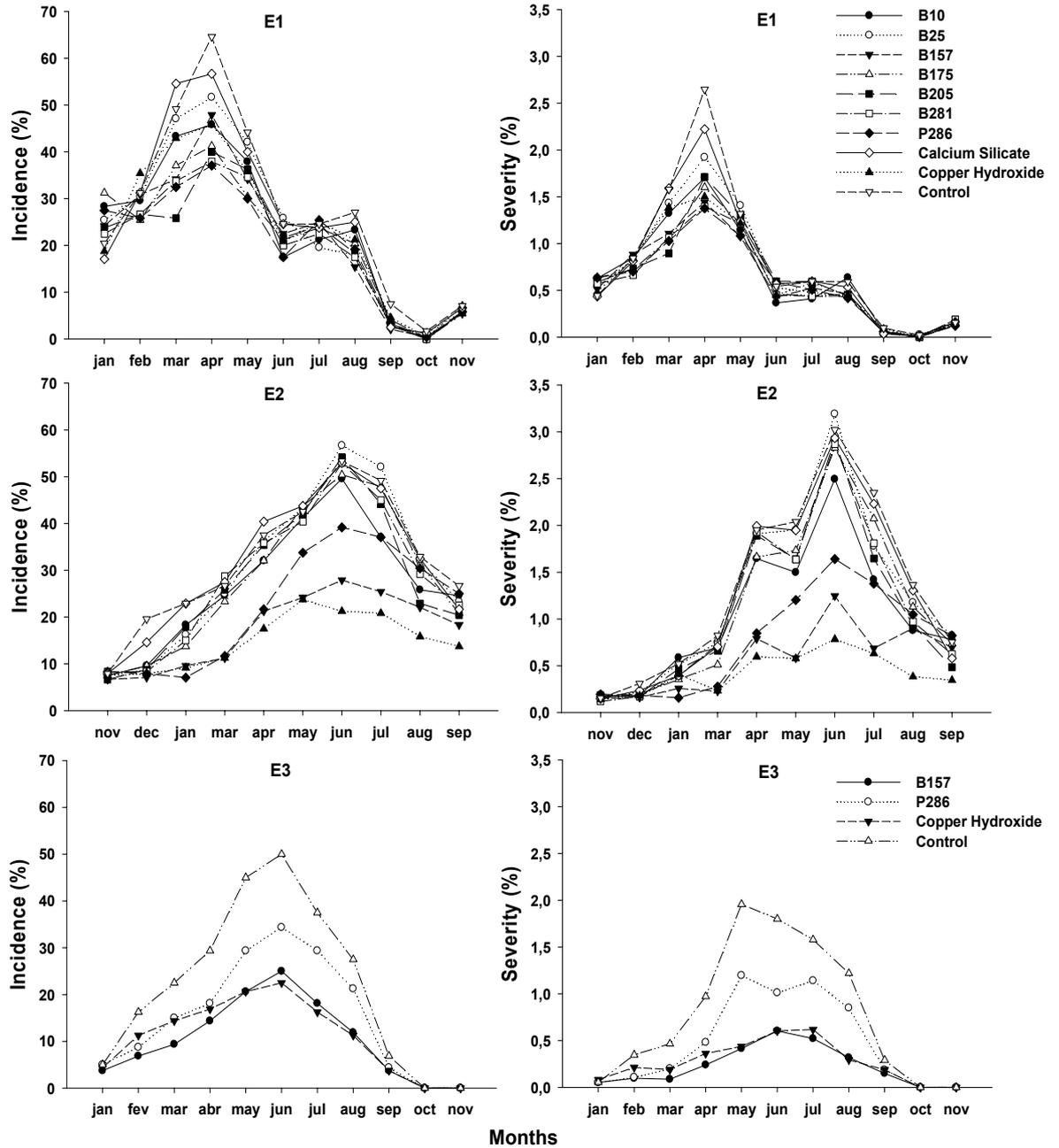


Figure 1 Leaf rust progress in organically grown coffee plants, in experiments conducted in Machado, MG, from January to November 2005 (Exp1) and from November 2005 to September 2006 (Exp2) and in Ervália, MG, from January to November 2007 (Exp3). B or P = *Bacillus* or *Pseudomonas*.

Mecanismo de ação de bactérias antagonistas a *Hemileia vastatrix*

Fernando Haddad¹, Luiz A. Maffia^{1,2}, Eduardo S. G. Mizubuti¹, Reginaldo S. Romeiro¹

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitopatologia 36570-000
Viçosa, MG, Brasil

² Contacts: Fax: +55 31 3899-2240. E-mail: lamaffia@ufv.br

Resumo

Dois isolados bacterianos (Ib), um de *Pseudomonas* sp. e um de *Bacillus* sp., foram eficientes no biocontrole da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em casa de vegetação e cultivos orgânicos de cafeeiro. Efetuaram-se testes *in vitro* e em mudas de cafeeiro para entender o(s) mecanismo(s) de ação desses isolados. Após cultivar cada isolado em meio líquido 523 de Kado & Heskett, avaliaram-se a germinação de uredinósporos e a severidade da doença com seis tratamentos: i-caldo fermentado do cultivo; ii-sobrenadante da centrifugação; iii-ressuspensão de células bacterianas centrifugadas em solução salina; iv-células inativadas por radiação ultravioleta; v-meio 523; e vi-solução salina (v e vi foram considerados como testemunhas). A germinação e a severidade reduziram-se significativamente nos tratamentos i a iii em relação às testemunhas. Aplicou-se cada Ib em diferentes concentrações e intervalos antes de inocular *H. vastatrix*. A eficiência dos Ib no controle da doença reduziu nas menores concentrações e nos maiores intervalos. Os Ib não protegeram cafeeiros de infecções por *Cercospora coffeicola*. Em experimentos de separação espacial entre cada Ib e *H. vastatrix*, não houve proteção sistêmica de mudas de cafeeiro. Houve proteção somente com a aplicação dos Ib no mesmo local da inoculação do patógeno. Considerando os efeitos obtidos, acredita-se que os Ib atuem produzindo composto(s) com ação antifúngica.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, cafeeiro, ferrugem, controle biológico, *Pseudomonas*, *Bacillus*.

Abstract

Two bacterial isolates (BI), a *Pseudomonas* sp. and a *Bacillus* sp., controlled efficiently coffee rust (*Hemileia vastatrix*) under greenhouse and commercial organic crop systems. Experiments *in vitro* and with coffee plants were conducted to define the mechanism(s) of action of both isolates. Each BI was grown in liquid Kado & Heskett 523 medium, and urediniospores germination and disease severity were evaluated following six treatments: i-growth broth; ii-supernatant from centrifugation; iii-bacterial cells centrifuged and resuspended in saline solution; iv-bacterial cells inactivated through ultraviolet radiation; v-523 medium; and vi-saline solution (treatments v and vi were considered as controls). Spore germination and disease severity were reduced significantly with treatments i to iii relative to the controls. Each BI was applied in varying concentrations and time intervals before *H. vastatrix* inoculation. The efficiency in controlling rust was reduced at the lowest concentrations and largest intervals. The BI did not protect coffee plants from *Cercospora coffeicola* infections. In experiments of spatial separation between each BI and *H. vastatrix*, no systemic protection was achieved in coffee plants. Protection was achieved only when each BI was applied in same place where *H. vastatrix* was inoculated in the leaf. In view of the findings, it is believed that the mechanism of antagonism of both BI is through the production of antifungal compounds against *H. vastatrix*.

Keywords: *Coffea arabica*, coffee, rust, biocontrol, *Pseudomonas*, *Bacillus*.

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (Mapa, 2007). Há uma demanda crescente pelos denominados “cafés especiais”, dentre eles o produzido organicamente, o qual, além do alto valor agregado, contribui para reduzir o impacto ambiental causado pelo uso de pesticidas (Caixeta, 2002). Dentre as várias doenças que reduzem a produtividade do cafeeiro, a principal é a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br). Para essa ferrugem, a fase uredinial é que é a importante para a ocorrência de epidemias no campo.

Na cafeicultura orgânica, pode-se manejar a ferrugem com cultivares resistentes e produtos à base de cobre (Carvalho et al., 2002). Contudo, é difícil obter resistência duradoura à *H. vastatrix* em vista da variabilidade do patógeno (Van der Vossen, 2005) e da dificuldade de associar resistência às características agronômicas desejáveis. Outro fator complicador é o aumento nas restrições de uso de produtos à base de cobre em cultivos orgânicos (Carvalho et al., 2002). Por essas razões, o controle biológico é alternativa viável no manejo racional de doenças em sistemas orgânicos de cultivo (Harman, 2000), como a ferrugem .

Isolados de *Pseudomonas* sp. (P286) e *Bacillus* sp. (B157) foram eficientes no controle da ferrugem do cafeeiro em condições de casa de vegetação e campo (Haddad et al., 2004; Haddad et al., 2007). Espécies de ambos os gêneros são eficientes no biocontrole de várias doenças (Han et al., 2006; Han et al., 2005; Kim et al., 2004; Cho et al., 2003).

Os mecanismos mais frequentemente associados a espécies de *Bacillus* e de *Pseudomonas* são a produção de compostos com ação antimicrobiana (Tendulkar et al. 2007; De La Fuente et al., 2006; Shiomi et al., 2006; Raaijmakers et al., 1999; Duffy e Défago, 1999; Bettiol et al., 1994) e a indução de resistência sistêmica – IRS (Ongena et

al., 2007; Teixeira et al., 2005; Romeiro et al., 2005; Saravanan et al., 2004; Radjacommare et al., 2004; Bolwerk et al., 2003). O lipopeptídeo surfactina, secretado por *B. licheniformis*, inibiu a germinação e o crescimento micelial de *Magnaporthe grisea*, agente causal da brusone do arroz (Tendulkar et al. 2007). Para *Pseudomonas* sp., identificou-se o antibiótico 2,4-diacetil foroglucinol como o composto responsável pela supressividade natural dos solos (Raaijmakers et al., 1999). Outros compostos produzidos por *Pseudomonas* spp., como pioluteorin (Duffy & Défago, 1999) e pirrolnitrin (Cui & Harling, 2006; Duffy & Défago, 1999), também são importantes no controle de doenças de plantas.

Considerou-se a IRS como o provável mecanismo de ação de duas espécies de *Pseudomonas* a *Puccinia psidii*, agente da ferrugem do eucalipto (Teixeira et al., 2005). Outras espécies de *Pseudomonas* foram relatadas como indutoras de resistência no cafeeiro a *H. vastatrix* (Porrás, 1999). *Bacillus* spp. podem, também, ativar a ISR. *Bacillus mycoides*, isolado de folha de beterraba, reduziu a severidade da cercosporiose da beterraba açucareira em condições controladas e de campo, e o efeito foi atribuído à ISR (Bargabus et al., 2002). A germinação de uredinósporos de *H. vastatrix* reduziu-se com a aplicação de produto comercial à base de *B. thuringiensis*, e obteve-se efeito protetor da bactéria em discos de folha inoculados com o patógeno, que durou até 16 dias (Cristancho, 1995). Para o autor, houve indução de resistência do cafeeiro à ferrugem, apesar de os resultados não terem sido conclusivos.

Para auxiliar a definir estratégias de manejo da ferrugem do cafeeiro com os isolados de *Bacillus* sp. e de *Pseudomonas* sp. eficientes no controle da ferrugem (Haddad et al., 2004; Haddad et al., 2007), é necessário compreender o mecanismo de antagonismos de ambos. Assim, esse trabalho objetivou determinar o(s) mecanismo(s) de ação dessas bactérias antagonistas e avaliar se alguns dos critérios propostos por

Steiner e Schömbeck (1995) para confirmar a ISR são eficientes para determinar o mecanismo de ação de ambas as bactérias.

2. Material e Métodos

2.1. Procedimentos gerais

Para definir o(s) mecanismo(s) de antagonismo de cada isolado bacteriano (Ib), avaliaram-se os critérios: i) ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno; ii) não relação entre a magnitude da resistência e quantidades crescentes do indutor aplicado; iii) necessidade de intervalo de tempo entre a exposição da planta ao agente indutor e a expressão da resistência; iv) padrão de resposta da resistência, se local ou sistêmica (Steiner e Schömbeck, 1995).

De mudas de cafeeiro ‘Catuai’ cultivadas em casa de vegetação, retiraram-se folhas com pústulas esporulantes de ferrugem e, com pincel, coletaram-se urediniósporos, que foram peneirados, ajustando-se a concentração para 1 mg de urediniósporos/mL de água destilada esterilizada (ADE). Agitou-se a suspensão foi agitada por 40 min, em agitador magnético. Executavam-se os procedimentos da coleta à agitação toda vez que se inoculava *H. vastatrix*.

Usaram-se dois isolados: B157 de *Bacillus* sp. e P286 de *Pseudomonas* sp. Os Ib eram mantidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA) em tubos de cultura armazenados a 5°C. Para a aplicação, repicava-se cada isolado para meio líquido 523 (Kado e Heskett, 1970) em erlenmeyers, agitando-se em agitador orbital a 150 rpm, a 30 °C, por 24 h.

Nos experimentos, usaram-se mudas de café ‘Catuai’ com seis meses de idade, cultivadas em sacos plásticos com solo esterilizado, condições de telado. Nessas mudas, inoculou-se *H. vastatrix* e/ou aplicaram-se os tratamentos dos Ib, por atomização, até o ponto de escorrimento.

2.2. Germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* em presença de células bacterianas e de possíveis metabólitos produzidos pelas células

Para cada Ib, conduziu-se um experimento com os tratamentos: i) caldo do cultivo (resultante do crescimento bacteriano em meio 523 líquido); ii) sobrenadante (resultante da centrifugação a 14.000 rpm, por 20 min, do caldo de cultivo); iii) células bacterianas resultantes de centrifugação efetuada no tratamento ii e ressuspensas em solução salina; iv) células bacterianas do tratamento iii, inativadas pela exposição à radiação ultravioleta por 30 min.

Em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo ágar-água 1,5 %, depositaram-se 10 µL de cada tratamento + 10µL de suspensão de urediniósporos. Incluíram-se três tratamentos-testemunha: 1- 10µL de solução salina + 10µL da suspensão de urediniósporos; 2- 10µL de hidróxido de cobre (2,2 g i.a./L) + 10 µL da suspensão de urediniósporos; e 3- 10µL de meio 523 + 10µL da suspensão de urediniósporos. As placas foram mantidas a 22 °C, no escuro. Após 16 h, adicionaram-se 5µL de lactofenol em cada gota para interromper a germinação dos urediniósporos. Em campos de microscópio quantificou-se a germinação de 100 urediniósporos. Um urediniósporo foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo era aproximadamente igual ou superior ao seu comprimento. Avaliou-se a eficiência de cada tratamento na redução da germinação relativa ao tratamento-testemunha correspondente. Os tratamentos iii e iv foram comparados à testemunha solução salina + urediniósporos, enquanto os tratamentos i e ii, à testemunha meio 523 + urediniósporos.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições (uma placa de Petri = uma unidade experimental).

2.3. Severidade da ferrugem na presença de células bacterianas e de possíveis metabólitos produzidos pelas antagonistas

Na face abaxial do segundo e terceiro pares de folhas de mudas, aplicou-se cada tratamento usado no ensaio anterior. As mudas permaneceram em câmara de nevoeiro a 25 °C, no escuro e, após 48 h, foram inoculadas com *H. vastatrix*, no mesmo local de aplicação. Após 48 h em câmara de nevoeiro a 25 °C, no escuro, as mudas foram levadas para casa de vegetação. Incluíram-se três tratamentos-testemunha: 1- aplicação de solução salina e inoculação do patógeno; 2- aplicação de hidróxido de cobre e inoculação do patógeno; e 3- aplicação de meio 523 e inoculação do patógeno. Após 40 dias da inoculação, coletaram-se as folhas inoculadas, e suas imagens foram digitalizadas e analisadas quanto à severidade da ferrugem, com o programa Quant (Vale et al., 2003).

Avaliou-se a eficiência de cada tratamento na redução da severidade da ferrugem relativa ao tratamento-testemunha correspondente: os tratamentos iii e iv foram comparados à testemunha solução salina + Hv, enquanto os tratamentos i e ii, à testemunha meio 523 + Hv.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições (uma planta = uma unidade experimental).

2.4. Germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* na presença das bactérias antagonistas, em mudas de cafeeiro

No momento da aplicação de cada Ib, ajustou-se a concentração de células bacterianas, em solução salina (0,85 %) + Tween 20 (0,05%), para $D.O_{540nm}=0,2$, em espectrofotômetro. Na face abaxial do segundo par de folhas, aplicou-se cada antagonista e, imediatamente após, inoculou-se *H. vastatrix*, no mesmo local. As plantas

permaneceram em câmara de nevoeiro a 25°C, no escuro. O tratamento-testemunha consistiu da aplicação de meio 523 + solução salina (0,85 %) + Tween 20 (0,05%), seguida da inoculação do patógeno.

Com microscopia de luz, avaliou-se a germinação, preparando-se cada amostra segundo Silva et al. (1999). Partes das folhas onde se aplicou cada tratamento foram cobertas com esmalte incolor após 0, 3, 6, 12, 18 e 24h da inoculação. Após a secagem, removeu-se o esmalte, e montou-se a película formada em lâminas, com uma gota de azul de lactofenol. Em seis campos de observação, cada um com 100 urediniósporos, determinou-se o número de esporos germinados. Avaliou-se a eficiência de cada isolado na redução da germinação relativa à testemunha.

Para o isolado B157, a partir dos resultados do ensaio anterior, após 12h da inoculação, analisaram-se amostras das folhas em microscopia eletrônica de varredura. Transferiram-se fragmentos de folhas para solução fixativa (glutaraldeído 25% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2), a 5 °C. Após 24h, no mínimo, efetuaram-se três lavagens sucessivas de 15min em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), desidrataram-se os fragmentos em uma série etanólica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%, duas vezes em 100%), durante 10min. Os discos foram secos ao ponto crítico, em aparelho Balzers modelo TEC-030, e montados com a face abaxial para cima em topos do alumínio, para posterior revestimento com ouro, em equipamento Balzers modelo FDU-010. Em microscópio eletrônico de varredura LEO VP1430, visualizaram-se as amostras e registraram-se digitalmente suas imagens. Observou-se a distribuição dos antagonistas e de urediniósporos no filoplano e comparou-se a germinação de urediniósporos na folhas tratadas com o isolado B157 à do tratamento-testemunha.

2.5. Relação dose - resposta

Para cada isolado, definiu-se a relação entre a concentração da suspensão das células bacterianas e a intensidade de redução da ferrugem, em três intervalos de aplicação do isolado e inoculação de Hv. No momento da aplicação, ajustou-se a concentrações em solução salina (0,85 %) + Tween 20 (0,05%) para D.O._{540nm} de 0 (sem o isolado); 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; e 1,0, em espectrofotômetro. No segundo e terceiro pares de folhas de mudas, atomizou-se cada tratamento. Inoculou-se Hv nos tempos 0 (imediatamente após), 15 ou 30 dias após a aplicação de cada tratamento. Após 40 dias, coletaram-se as folha e avaliou-se a severidade da ferrugem, como já descrito. Obteve-se a eficiência de cada isolado em reduzir a severidade da ferrugem em relação ao tratamento-testemunha.

Para cada isolado, efetuou-se um ensaio em esquema fatorial (concentração x intervalo de aplicação) e em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições (uma planta = uma unidade experimental).

2.6. Separação espaço - temporal dos antagonistas e *Hemileia vastatrix*

Definiu-se a relação entre a separação espaço/temporal de cada Ib e *H. vastatrix* na intensidade de redução da ferrugem. No momento da aplicação, ajustou-se a concentração usando solução salina (0,85%) + Tween 20 (0,05%) para D.O._{540nm} = 0,2, em espectrofotômetro. Para cada Ib, conduziu-se um ensaio, com os tratamentos: i) aplicação do Ib na face abaxial do segundo par de folhas já formadas a partir do ápice e inoculação de *H. vastatrix* no terceiro par; ii) aplicação na face abaxial do terceiro par de folhas e inoculação no segundo par; iii) aplicação na face abaxial do segundo e terceiro pares de folhas do lado direito da planta e inoculação no segundo e terceiro pares de folhas no lado esquerdo da planta; iv) aplicação no solo (30mL/muda) e

inoculação no segundo e terceiro pares de folhas; v) aplicação e inoculação no segundo e terceiro pares de folhas; vi) pulverização de hidróxido de cobre (2,2 g i.a./L) e inoculação no segundo e terceiro pares de folhas; e vii) atomização de meio 523 + solução salina e inoculação no segundo e terceiro pares de folhas. Recobriram-se as folhas sem aplicação do antagonista ou sem inoculação de *H. vastatrix* com filme plástico.

Inoculou-se *H. vastatrix* nos tempos 0 (imediatamente após), 3, 6, 9 ou 12 dias após aplicar cada tratamento. As mudas tratadas permaneceram em câmara de nevoeiro a 25°C, no escuro. Após 48h, foram transferidas para câmara de crescimento a 22°C, fotoperíodo de 12h.

Aos 40 dias da inoculação, coletaram-se as folhas onde se inoculou *H. vastatrix*, suas imagens foram digitalizadas e analisadas quanto à severidade da ferrugem, com o programa Quant (Vale et al., 2003). Comparou-se a eficiência de cada tratamento em reduzir a severidade da ferrugem ao tratamento vii (apenas com inoculação de *H. vastatrix*).

O experimento foi em esquema fatorial (tempo de inoculação x local de aplicação), em delineamento inteiramente casualizado com três repetições (uma muda = uma unidade experimental).

2.6 Análise dos dados

Excetuando-se a análise por microscopia eletrônica de varredura, todos os experimentos foram executados por duas vezes. Avaliou-se a homogeneidade de variâncias (teste de Levene) das duas execuções e, quando houve homogeneidade, analisaram-se os resultados em conjunto. Compararam-se os tratamentos quanto à eficiência em reduzir a germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* e a severidade da

ferrugem, procedendo-se à análise de variância. Quando adequado, compararam-se as médias dos tratamentos com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Para todas as análises, usou-se o programa SAS System v. 9.1.

3. Resultados

Houve homogeneidade de variâncias entre as duas execuções de todos os experimentos, e os resultados de ambas foram agrupadas para a análise estatística.

3.1. Germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* em presença de células bacterianas e de possíveis metabólitos produzidos pelas células

O uso de meio de cultura como testemunha não interferiu na germinação de urediniósporos de Hv e na intensidade da ferrugem em relação ao uso de solução salina (dados não mostrados). Os os tratamentos foram eficientes em reduzir a germinação de urediniósporos de Hv, exceto quando células bacterianas dos isolados foram inativadas (Tabela 1). Para B157, o sobrenadante e o caldo fermentado de cultivo reduziram mais a germinação que células bacterianas, enquanto para P286, os três tratamentos não diferiram entre si (Tabela 1).

3.2. Severidade da ferrugem na presença de células bacterianas e de possíveis metabólitos produzidos pelas antagonistas

O uso de meio de cultura como testemunha não afetou a intensidade da ferrugem em relação ao uso de solução salina (dados não mostrados). Para os dois isolados, o sobrenadante, caldo do cultivo e as células bacterianas reduziram significativamente a severidade da doença (Tabela 1).

3.3. Germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* na presença das bactérias antagonistas, em mudas de cafeeiro

Os dois isolados bacterianos reduziram em 100% a germinação de urediniósporos (na testemunha, a germinação média foi de 32%; dados não apresentados). O isolado B157 afetou a formação de tubos germinativos e inibiu a germinação de urediniósporos (Figura 1).

3.4. Relação dose - resposta

Para ambos os isolados, houve interação significativa da concentração e intervalo de tempo entre a aplicação do isolado e a inoculação do patógeno. Para ambos, a eficiência tendeu a aumentar com o aumento da concentração e tendeu a reduzir com o aumento do intervalo de aplicação (Figura 2).

3.5. Separação espaço - temporal dos antagonistas e *Hemileia vastatrix*

Para os dois isolados, houve efeito significativo do fator tratamento ($P < 0,0001$), mas não de intervalo de aplicação e nem da interação tratamento x intervalo de aplicação. Nenhum tratamento em que houve separação espacial entre os isolados e Hv reduziu a severidade da ferrugem. Os isolados foram tão eficientes quanto o hidróxido de cobre em reduzir a severidade da ferrugem apenas quando aplicados no mesmo local da inoculação (Tabela 2).

4. Discussão

Credita-se a inibição da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* e a redução na severidade da ferrugem à produção de substância com ação antifúngica pelas bactérias antagonistas. Esta conclusão baseia-se no fato de o sobrenadante, livre de células bacterianas, ser tão eficiente quanto o caldo do cultivo *in vitro* e *in vivo*. Quando se usaram células inativadas, ou seja, incapazes de produzir compostos com ação antifúngica, não houve redução na germinação e na intensidade da doença. Há relatos de espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus*, cujo mecanismo de antagonismo seja a produção de compostos com ação antifúngica (Raaijmakers et al., 2002). Para *B. subtilis*, caracterizou-se o antibiótico, itaurina, responsável pelo antagonismo a *Gloeosporium gloeosporioides* (Cho et al., 2003). Apenas com base no resultado obtido no presente trabalho não se pode afirmar que as antagonistas atuem somente por antibiose direta, pois substâncias com ação antifúngica também são relatadas como indutoras de resistência sistêmica em plantas. O antibiótico de amplo espectro 2,4-diacetil foroglucinol, produzido por *Pseudomonas sp.*, é responsável pela supressividade natural de solos, com efeito direto sobre patógenos (Raaijmakers et al., 1999). Este composto produzido por *P. fluorescens* induziu resistência em plantas de *Arabidopsis thaliana* a *Peronospora parasitica* (Lavicoli et al., 2003). A substância surfactina, produzida por *B. licheniformis*, tem efeito direto sobre a germinação e o crescimento micelial de *Magnaporthe grisea* (Tendulkar et al. 2007). Este mesmo composto, quando produzido por *B. subtilis*, induziu resistência em feijoeiro a *Botrytis cinerea* (Ongena et al., 2007). Portanto, um composto com ação antifúngica também pode atuar como indutor de resistência de plantas.

Em menores concentrações de células das antagonistas, houve queda na eficiência do controle da doença, provavelmente por haver queda na concentração do

composto de ação antifúngica. Provavelmente haja degradação desse composto com o tempo, pois a eficiência decresceu ao longo do tempo, principalmente nas concentrações menores. Em condições de campo, os isolados aplicados com D.O._{540 nm} de 0,2 reduziram significativamente a incidência e a severidade da ferrugem (Haddad et al., 2007). Esta diferença de resultados entre experimentos talvez esteja relacionada à qualidade e à concentração do inóculo de *H. vastatrix*, pois a concentração do inóculo e a germinabilidade de urediniósporos usados em casa de vegetação são maiores que aquelas normalmente encontradas no campo (dados não apresentados). Ademais, nos experimentos em casa de vegetação inocula-se apenas uma vez e com alta concentração de inóculo, enquanto no campo o inóculo é depositado gradualmente ao longo do tempo e em menor concentração. Para um isolado de *Fusarium* sp., antagonista a *F. oxysporum*, quando se aumentou a concentração de inóculo do patógeno, o controle da murcha do tomateiro reduziu-se, mesmo quando a concentração do antagonista foi maior (Larkin e Fravel, 1999). Efetuar-se-ão novos testes, em que se aumente a concentração de células das antagonistas e o intervalo de aplicação, para melhor entendimento da relação entre concentração e intervalo de aplicação.

È necessário estabelecer se o efeito da concentração no controle poderia afetar a ocorrência de IRS (Steiner e Schömbeck, 1995). Quando se usaram diferentes concentrações do composto 2R, 3R butanodiol, produzido por *P. chlororaphis*, responsável pela indução de resistência de plantas de fumo a *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, houve efeito da concentração do agente indutor sobre o controle da doença (Han et al., 2006). Já quantidades crescentes da população de *Lyzobacter enzymogenes* não se correlacionaram ao aumento da inibição da germinação de esporos de *Bipolaris sorokiniana* (Kilic-Ekici & Yuen, 2003). Tanto a ISR quanto a antibiose direta podem

dependem da concentração usada do agente de biocontrole. Neste trabalho, a concentração do antagonista afetou a sua eficiência no controle da doença.

Os dois isolados não protegeram o cafeeiro de infecções por *C. coffeicola* (dados não mostrados). Outros patógenos desafiantes deverão ser testados frente a antagonistas, para ampliar o teste de espectro de proteção. Porém, questiona-se a validade do espectro de proteção como um critério válido para separar IRS do antagonismo direto. O composto 2,4-diacetil foroglucinol, que protege plantas contra diversos patógenos, tem ação direta sobre nematóides (Cronin et al., 1997a), bactérias (Cronin et al., 1997b), oomicetos (Souza et al., 2003) e fungos (De La Fuente et al., 2006), mas também induz resistência. O composto 2R-3R butanodiol, produzido por *P. chlororaphis*, que induz resistência de plantas de fumo a *E. carotovora* subsp. *carotovora*, não protegeu estas mesmas plantas contra *P. syringae* pv. *tabaci* (Han et al., 2006), havendo assim especificidade de proteção. A produção de uma macromolécula por *B. cereus* induziu resistência sistêmica em tomateiro contra todos os patógenos foliares testados, incluindo a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e dois fungos *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola* (Romeiro et al., 2005). Portanto, a inespecificidade de proteção pode depender do patossistema em estudo e não do mecanismo de ação.

Na maioria dos trabalhos em que ISR é o mecanismo de ação do antagonista, este é aplicado espacialmente separado do patógeno. Com isto, espera-se haver um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao agente indutor e a expressão da resistência. Porém, quando o antagonista é aplicado no mesmo local da inoculação, a resposta pode ser imediata. Quando a antagonista *L. enzymogenes* foi aplicada no mesmo local da inoculação do patógeno, a resposta de resistência foi imediata, e, com separação espacial, este efeito foi retardado em 2 dias (Kilic-Ekici & Yuen, 2003). A sistemicidade de resposta é critério essencial para determinação de ISR, pois não

havendo proteção sistêmica, não ocorrerá ISR. No presente trabalho, como os isolados não protegeram sistemicamente os cafeeiros e houve produção de compostos com ação antifúngica tanto *in vitro* quanto *in vivo*, conclui-se que eles não atuam por ISR.

Em vista dos resultados obtidos, propõe-se que, se determinado antagonista protege sistemicamente uma planta contra um patógeno e não tem efeito tóxico direto sobre ele, provavelmente o mecanismo de ação seja IRS. Esta conclusão vai nortear futuros experimentos para comprovação da provável IRS, focando principalmente o genótipo da planta e o composto indutor. Propõe-se, ainda, que, se o antagonista não protege sistemicamente a planta e tem efeito direto sobre o patógeno, como no presente trabalho, deve-se procurar identificar o composto com ação antifúngica, ou seja, devem-se focar os trabalhos na interação entre o antagonista e o patógeno. Se o antagonista protege sistemicamente a planta e tem efeito direto sobre o patógeno, deve-se verificar se genes de resistência da planta estão sendo induzidos e se não está havendo translocação do composto que tem ação direta sobre o patógeno.

O uso de bactérias que produzam substâncias antifúngicas deletérias à germinação e à formação de tubos germinativos é estratégia eficiente para biocontrole da ferrugem do cafeeiro. Um ponto fundamental para o sucesso do controle biológico é aplicar o antagonista na fase mais vulnerável do patógeno (Fravel, 2005). Para alguns autores, a eficiência do agente de controle biológico está diretamente ligada à interferência nas primeiras etapas do estabelecimento da doença (Guetsky et al. 2001; Yoshida et al., 2001). Esta etapa é afetada principalmente por microrganismos produtores de compostos antimicrobianos. A próxima etapa do trabalho é identificar e caracterizar a(s) substância(s) produzidas por B157 e P286, para assim confirmar o mecanismo de ação das antagonistas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

Referências:

- Bargabus, R. L. Zidack, N. K. Sherwood J. E., Jacobsen B. J., 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, 289-298.
- Bettiol, W., Saito, M. L., Brandão, M. S. B., 1994. Control of coffee leaf rust with products based on *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica* 20, 119-122.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijffjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Chin-A-Woeng, T. F. C., Lugtenberg, B. J. J., Bloemberg, G. V. 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 983-993.
- Caixeta, G. Z. T., Pedini, S. 2002. Comercialização de café orgânico. *Informe Agropecuário* 23, 149-152.
- Carvalho, V. L., Cunha, R. L., Chalfoun, S. M. 2002. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. *Informe Agropecuário* 23, 101-114.
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H., Shin., K. S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin a from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters* 223, 47-51

- Cronin, D., Moënne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D. N., O’Gara, F., 1997a. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interaction of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1357-1361.
- Cronin, D., Moënne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D. N., O’Gara, F., 1997b. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Letters* 23, 95-106.
- Cristancho, A. M. A., 1995. Efecto protector de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en plantas de café contra el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berk. *Y Br. Cenicafé (Colombia)* 46, 140-151.
- Cui, X., Harling, R., 2006. Evaluation of bacterial antagonists for biological control of broccoli head rot caused by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 96, 408-416.
- De La Fuente, L., Landa, B. B., Weller, D. M. 2006. Host crop affects rhizosphere colonization and competitiveness of 2,4-diacetylphloroglucinol- producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 96, 751-762.
- Duffy, B. K., Défago, G., 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2429–2438.
- Fravel, D. R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337-359.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinoor A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91, 621-627.

- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Romeiro, R. S., 2004. Biocontrol of coffee leaf rust with antagonists isolated from organic crops. In: Annual Meeting of the American Phytopathological Society, 2004, Anaheim, Ca. *Phytopathology* 94, S37.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Teixeira, H. 2007. Biocontrol as an alternative for leaf rust management in organically-grow coffee. *IOBC/WPRS Bulletin* 30, 93-96.
- Han, J. S., Cheng, J. H., Yoon, T. M., Song, J., Rajkarnikar, A., Kim, W. G., Yoo, I. D., Yang, Y. Y., Suh, J. W. 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. *Journal of Applied Microbiology* 99, 213–221.
- Han, S. H., Lee, S. J., Moon, J. H., Park, K. H., Yang, K. Y., Cho, B. H., Kim, K. Y., Kim, Y. W., Lee, M. C., Anderson, A. J., Kim, Y. C., 2006. GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 924 – 930.
- Harman, E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84, 377-393.
- Kado, C. I., Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60, 965-975.
- Kilic-Ekici, O., Yuen, G. Y. 2003. Induced resistance as a mechanism of biological control by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. *Phytopathology* 93, 1103-1110.

- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park R., Chi, Y.-T. 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology* 97, 942–949.
- Larkin, R. P., Fravel, D. R. 1999. Mechanisms of action and doseresponse relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89, 1152-1161.
- Lavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux J. P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 851–858.
- MAPA, 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. www.agricultura.gov.br.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny J. L., Thonart P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* 9, 1084–1090.
- Porras, N. C., Leguizamon, C. J. E., Martinez, M. M., 1999. Induccion de resistencia por *Pseudomonas* spp., em plantulas de cafe contra la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. *Y Br. Ascolfi-Inforna* 25, 12-14.
- Raaijmakers, J. M., Bonsall, R. F., Weller, D. M., 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 89, 470-475.
- Raaijmakers, J. M., Vlami M., Souza J. T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537–547.

- Radjacommare, R., Kandan, A., Nandakumar, R., Samiyappan., 2004. Association of the hydrolytic enzyme chitinase against *Rhizoctonia solani* in rhizobacteria-treated rice plants. *Journal of Phytopathology* 152, 365-370.
- Romeiro, R. S., Lanna Filho, Vieira Junior, J. R., Silva, H. S. A., Baracat-Pereira, M. C., Carvalho M. G., 2005. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal Pathogens. *Journal of Phytopathology* 153, 120-123.
- Saravanan, T., Bhaskaran, R., Muthusamy, M., 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt disease. *Plant Pathology Journal* 3, 72-80
- Shiomi, H. F., Silva, H. S. A., Melo, I. S., Nunes, F. V., Bettiol W., 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* 63, 32-39.
- Silva, M. C., Nicole, M., Rijo, L., Geiger, J. P., Rodrigues Jr., C. J., 1999. Cytochemical aspects of the plant-rust fungus interface during the compatible interection *Coffea arabica*. *International Journal of Plant Sciences* 160, 79-91.
- Souza, J. T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi- Pearson, V., and Raaijmakers, J. M., 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: Cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* 93, 966-975.
- Steiner,U., Schömbeck, F., 1995. Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmit, R. & Kuc, J. (1995). *Induced resistance to disease in plants (Developments in Plant Pathology, v.4)*. Kluwer Academic Pub., Dordrech. pp.86-110.

- Teixeira, D. A., Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Maffia, L. A., Ferreira, E. M., 2005. Evidências de indução de resistência sistêmica a ferrugem do Eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. *Fitopatologia brasileira* 30, 350 – 356.
- Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V. Raghotama, S. Munshi, T. K., Balaram, P., Chattoo, B. B., 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2331–2339.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A., 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91, 181-187.
- Vale, F.X.R., Fernandes Filho, E.I., Liberato, J.R., 2003. Quant. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, p.105.
- Van der Vossen, H. A. M., 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M., Várzea, V. M. P. (Eds.) *Durable resistance to coffee leaf rust*. Suprema Gráfica e Editora. pp. 1-29.

Tabela 1

Eficiência de diferentes tratamentos em relação ao tratamento testemunha (%) na redução da germinação de uredinósporos (EficGerm) de *Hemileia vastatrix* e redução da severidade da ferrugem (EficSev) em mudas de cafeeiro.

Tratamento	EficGerm	EficSev	EficGerm	EficSev
	<i>Bacillus</i> sp. (B157)		<i>Pseudomonas</i> sp.(P286)	
Células bacterianas	78.61b	94.65a	76.11a	95.03a
Sobrenadante	93.02a	99.24a	73.74a	95.29a
Caldo do cultivo	95.53a	99.71a	76.53a	98.25a
Células bacterianas inativadas	0.83c	-6.21b	-0.55b	6.18b

Em cada coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (teste Tukey, $\alpha=0,05$). Hidróxido de cobre: redução de 94,41% na germinação e de 98,66% na severidade.

Tabela 2

Eficiência de diferentes tratamentos em relação à testemunha (%), na redução da severidade da ferrugem (EficSev) em mudas de cafeeiro, com e sem separação espacial entre a aplicação dos isolados bacterianos (Ib) e a inoculação de *Hemileia vastatrix* (Hv).

Tratamento	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
Ib e Hv no 2° e 3° pares de folhas, no mesmo local	99.16a	99.35a
Ib no 3° par e Hv no 2°	3.75b	3.70b
Ib no solo e Hv no 2° e 3° pares	0.86b	2.30b
Ib no 2° par e Hv no 3°	-6.79b	-4.62b
Ib no lado direito da planta e Hv no esquerdo, ambos no 2° e 3° pares	-19.64b	-5.01b

Em cada coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (teste Tukey, $\alpha=0,05$); Hidróxido de cobre: redução de 98,88%

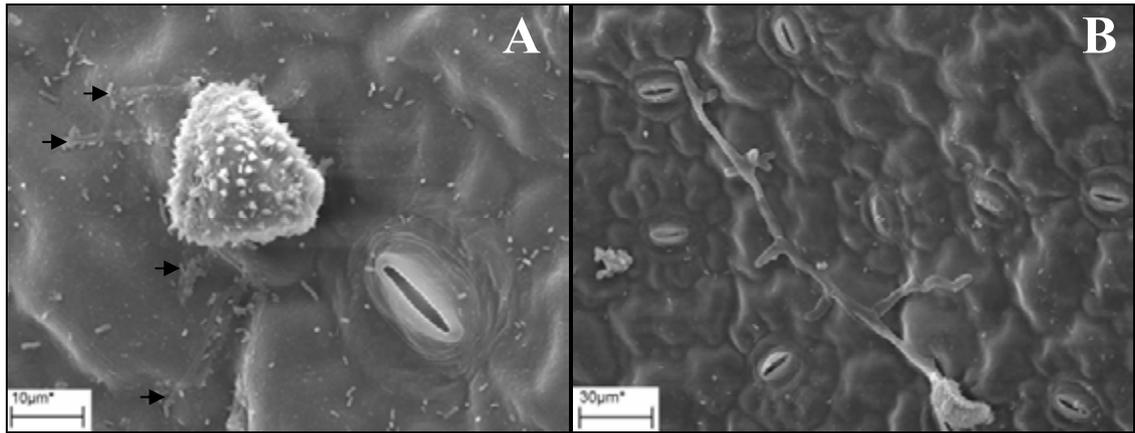


Figura 1. (A). Redução na germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* em presença de células bacterianas e de possíveis metabólitos produzidos por *Bacillus* sp. As setas indicam a concentração de células bacterianas próximas a tubos germinativos de *H. vastatrix*. (B). Germinação de urediniósporo sem a presença da antagonista.

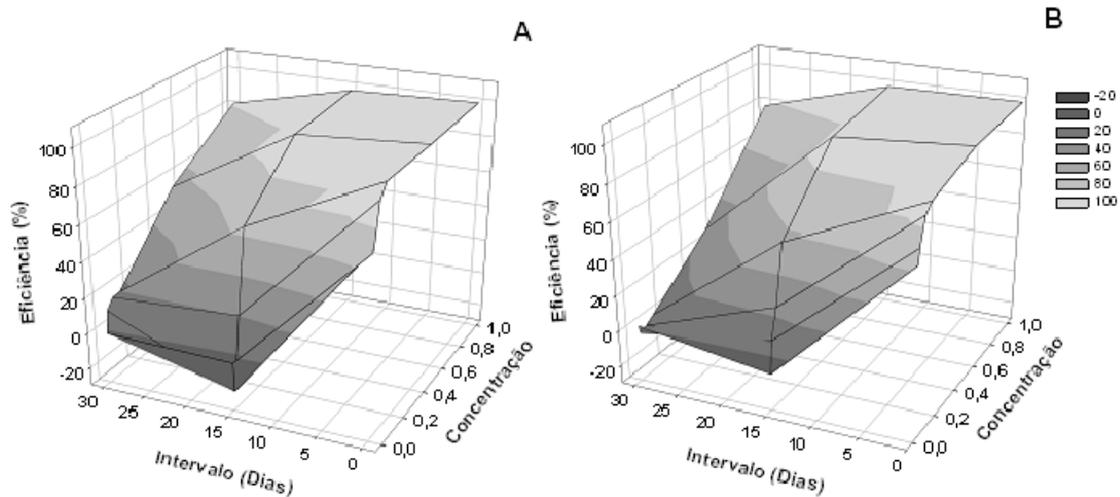


Figura 2. Eficiência de controle da ferrugem do cafeeiro em diferentes combinações de concentração de células bacterianas e intervalo de tempo entre a aplicação das células e a inoculação de *Hemileia vastatrix*. (A). *Bacillus* sp. (B). *Pseudomonas* sp.

Sobrevivência de *Bacillus* sp., antagonista a *Hemileia vastatrix*, no filoplano de cafeeiros

Fernando Haddad¹, Luiz A. Maffia^{1,2}, Eduardo S. G. Mizubuti¹, Reginaldo S. Romeiro¹

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitopatologia 36570-000
Viçosa, MG, Brasil

² Contacts: Fax: +55 31 3899-2240. E-mail: lamaffia@ufv.br

Resumo

O isolado B157 de *Bacillus* sp. foi eficiente no biocontrole da ferrugem do cafeeiro em casa de vegetação e em cultivos orgânicos no campo. Para definir estratégias de uso do biocontrole no campo, estudaram-se a dinâmica de sobrevivência do isolado B157 no filoplano de cafeeiro e o efeito de fungicidas cúpricos na sobrevivência do isolado. Em casa de vegetação, pulverizou-se o isolado (concentração de D.O._{540 nm}=0,2) em folhas de cafeeiro e, semanalmente, amostraram-se folhas e quantificaram-se as unidades formadoras de colônia em meio seletivo. A população da bactéria decresceu em aproximadamente 18% na primeira semana pós-aplicação, mas foi recuperada até 30 dias pós-aplicação. Em condições de campo, a queda na população foi mais acentuada, apesar de se recuperar a bactéria até 21 e 30 dias após aplicada, no primeiro e segundo mês, respectivamente. Para verificar o efeito de fungicidas cúpricos na sobrevivência de B157, pulverizou-se hidróxido de cobre em mudas ou sulfato de cobre em cafeeiros adultos, em casa de vegetação ou campo, respectivamente. Após 30 dias, pulverizou-se o isolado B157 (D.O._{540nm}=0,2). Em ambas as condições experimentais, a aplicação de fungicida, independente do princípio ativo, reduziu a população da bactéria ao longo do tempo e o período de sobrevivência de B157. Em casa de vegetação, na primeira semana, a população de B157 reduziu-se, em média, 10 e 52% nas parcelas sem e com fungicida, respectivamente. A pulverização dos fungicidas reduziu o tempo de sobrevivência da bactéria, em casa de vegetação e no campo. Para controle da ferrugem no campo, poder-se-iam adotar duas estratégias: i.pulverizar apenas o isolado B157 ou ii. aplicar o isolado nas primeiras pulverizações e fungicidas cúpricos, posteriormente.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, ferrugem do cafeeiro, controle biológico, manejo integrado.

Abstract

Isolate B157 of *Bacillus* sp. was efficient in the control of coffee leaf rust in greenhouse and organic crop systems. To help setting strategies for rust biocontrol in the field, we studied the dynamics of survival of B157 isolate on coffee phylloplane under greenhouse and field conditions and the effect of cupric fungicides on survival. At the greenhouse, the isolate was sprayed (concentration of O.D._{540 nm}=0.2) in coffee leaves, leaves were sampled weekly, and the amount of colonies forming units was counted in a selective medium in Petri dishes. Bacterial population decreased about 18% after the first week, although cells were recovered up to 30 days after application. Under field conditions, the population dropped more sharply, although bacterial cells were recovered 21 and 30 days after application, at the first and second months, respectively. To evaluate the effect of cupric fungicides on survival, we sprayed copper hydroxide on young plants in the greenhouse or copper sulphate on adult plants in the field. After 30 days, B157 was sprayed (O.D._{540 nm}=0.2) on the same leaves. At both experimental conditions, fungicide application, regardless of active ingredient, reduced the population throughout time and the survival time of B157. At the first week in the greenhouse, average reductions in B157 population were 52 and 10% with and without fungicide spray, respectively. Fungicides sprays reduced the survival time of B157, at both greenhouse and field. To achieve rust control in the field two strategies could be adopted: i. just sprays of B157 isolate or ii. start using the B157 and use cupric fungicides in the next sprays.

Keywords: *Coffea arabica*, coffee leaf rust, biological control, management.

1. Introdução

A ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) é a principal doença do cafeeiro, e pode causar perdas na produção superiores a 50% (Zambolim et al., 1997). Em cultivos convencionais, controla-se a ferrugem basicamente com fungicidas (Zambolim et al., 1997). Em cultivos orgânicos, apenas produtos à base de cobre podem ser usados. Apesar dos esforços para desenvolver variedades resistentes, ainda é difícil obter resistência durável à doença, em vista da alta variabilidade do patógeno (Van der Vossen, 2005). Em trabalhos anteriores, selecionou-se uma espécie de *Bacillus*, que reduziu a intensidade da ferrugem do cafeeiro em casa de vegetação e campo, sendo uma alternativa ao controle químico da doença (Haddad et al., 2004; Haddad et al., 2007a).

Estudos de processos associados à dinâmica de populações foliares, como imigração, emigração, crescimento e morte, bem como estudos ecológicos dos possíveis agentes de biocontrole, podem direcionar estratégias de controle de doenças da parte aérea (Kinkel, 1997). Para ser eficiente, um agente de biocontrole não pode depender apenas de sua ação antagônica. Depende, também, da sua capacidade de permanecer viável na superfície da planta hospedeira, ou seja, de competir com a microbiota existente e de multiplicar e persistir sob condições adversas (Fokkema, 1990). *Bacillus* spp. produzem endósporos, que resistem a condições adversas como irradiação ultravioleta, dessecação, temperaturas altas e solventes orgânicos (Raaijmakers et al., 2002). Tais características são desejáveis para um antagonista, pois facilitam sua sobrevivência no filoplano. Endósporos facilitam a formulação de produtos comerciais, o que aumenta o potencial de uso de *Bacillus* spp. no biocontrole de doenças (Raaijmakers et al., 2002; Emmert & Handelsman, 1999). Já se verificou ocorrer variação na sobrevivência de isolados de *Bacillus* spp. Quatro isolados de *Bacillus* sp.

controlaram o oídio da abóbora, causado por *Podosphaera fusca*, em pelo menos 16 dias (Romero et al., 2004). Esses autores, utilizando microscopia eletrônica de varredura, constataram células bacterianas aderidas a conídios germinados e hifas de *P. fusca*, após 48h. Para um isolado de *B. subtilis*, antagonista de *Cercospora beticola*, houve declínio acentuado em sua população já nos primeiros 4 dias da aplicação (Collins et al., 2003).

Outra questão importante relaciona-se às restrições no uso de fungicidas cúpricos na agricultura orgânica. Há uma restrição na quantidade desses produtos usada anualmente em pulverizações do cafeeiro (Carvalho et al., 2002). Assim, a adoção de um agente de controle biológico poderia diminuir a quantidade de fungicidas cúpricos usada, sem prejudicar a eficiência de controle da doença. Para tanto é preciso verificar a compatibilidade entre o agente de controle biológico e fungicidas cúpricos, que são também usados no controle de doenças bacterianas. Em vista do exposto, este trabalho objetivou avaliar a sobrevivência de *Bacillus* sp. no filoplano de cafeeiros. Avaliou-se, também, o efeito de fungicidas cúpricos na sobrevivência da bactéria, em condições de casa de vegetação e campo.

2. Material e Métodos

2.1. Sobrevivência de *Bacillus* sp. no filoplano de cafeeiros em casa de vegetação

Selecionaram-se antibióticos aos quais o isolado B157 de *Bacillus* sp. era naturalmente insensível (B157-I+), por meio de antibiograma em disco de papel. Repicou-se a bactéria para meio 523 em erlenmeyers, mantendo-se em agitador orbital a 150 rpm, a 30°C. Após 24 h, adicionaram-se 100µL do crescimento em 6mL de meio 523 semi-sólido, e verteu-se em meio ágar-água em placas de Petri. Posteriormente, distribuíram-se diferentes antibióticos sobre o meio onde o isolado foi incorporado.

Considerou-se como insensível ao antibiótico, o isolado que cresceu por cima do disco contendo dado antibiótico, sem haver halo de inibição.

Em todos os experimentos seguintes, cultivou-se o B157-I+ em meio líquido 523 contendo os antibióticos selecionados (amoxicilina e ampicilina, 100µg de cada.mL⁻¹) em erlenmeyers, mantendo-se em agitador orbital, a 150rpm e 30°C. Após 24 h, centrifugou-se o crescimento bacteriano (8.000rpm/20 min), descartou-se o sobrenadante, ressuspenderam-se as células bacterianas em solução salina, e ajustou-se a concentração em solução salina (0,85%) + Tween 20 (0,05%) para D.O._{540nm} = 0,2, em espectrofotômetro.

Em folhas de mudas cultivadas em casa de vegetação, aplicou-se a suspensão acima, até o ponto antes do escorrimento, uma ou duas vezes em intervalo de 30 dias. No tratamento controle, aplicou-se apenas solução salina (0,85%) + Tween 20 (0,05%). Após permanecerem em câmara de nevoeiro por 24 h no escuro, transferiram-se as mudas para a casa de vegetação. Semanalmente, durante 60 dias, de cada planta coletou-se uma folha, da qual retiraram-se 20 discos (1cm de diâmetro), que foram transferidos para 40mL de solução salina (0,85%) em erlenmayer, mantendo-se por 60min em agitador orbital a 150rpm. De cada amostra, semearam-se 100µL em meio 523 contendo 100µg de cada antibiótico selecionado, em placas de Petri, incubando-se a 30°C. Após 24 a 48h, determinou-se o número de unidades formadoras de colônia.

2.2. Sobrevivência de *Bacillus* sp. no filoplano de cafeeiros tratados com fungicidas cúpricos

2.2.1. Experimento em casa de vegetação

Executou-se o experimento durante 2 meses. Em folhas de mudas cultivadas em casa de vegetação, compararam-se os seguintes tratamentos: i- uma aplicação de B157-

I+, no primeiro mês; ii- duas aplicações de B157-I+ (uma no primeiro e outra no segundo mês); iii- uma aplicação de B157-I+, no segundo mês; iv- aplicação de hidróxido de cobre e após 30 dias a aplicação de B157-I+; v- aplicação de Calda Viçosa (5g de sulfato de cobre /L) e após 30 dias a aplicação de B157-I+; e vi- aplicação de solução salina (0,85%) + Tween 20 (0,05%). As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24h após a aplicação de B157-I+.

Para avaliar a sobrevivência de B157-I+, semanalmente durante 60 dias (nos tratamentos i e ii) ou 30 dias (nos tratamentos iii e iv), coletou-se uma folha/planta, da qual retiraram-se 20 discos (1cm de diâmetro), que foram transferidos para 40ml de solução salina (0,85%) em erlemmayer, mantendo-se por 60min em agitador orbital a 150rpm. Aliquotas de 100µl das amostras foram individualmente semeadas em meio 523 com 100µg de cada antibiótico selecionado, em placas de Petri, incubando-se a 30°C. Após 24 a 48h, determinou-se o número de unidades formadoras de colônia.

Na folha restante inoculou-se *H. vastatrix* aos 0, 15, 30, 45 ou 60 dias após aplicar cada tratamento. Após a inoculação, transfereiram-se as mudas para câmara de nevoeiro a 25°C, no escuro. Após 48h, reconduziram-se as mudas para em casa de vegetação. Após 40 dias da inoculação, coletaram-se as folhas onde houve a inoculação de *H. vastatrix*, e suas imagens foram digitalizadas e analisadas quanto à severidade da ferrugem, com o programa Quant (Vale et al., 2003). Cada tratamento foi comparado quanto à eficiência em reduzir a severidade da ferrugem em relação ao tratamento em que aplicou-se solução salina (0,85%) + Tween 20 (0,05%) e inoculou-se o patógeno.

2.2.2. Experimento de campo

Conduziu-se o experimento em duas condições: i – cultivo convencional de ‘Catuaí Vermelho’ com 12 anos, localizado na Universidade Federal de Viçosa, em

Viçosa, MG, altitude de 667 m, latitude sul de 20° 44' 43'' e longitude oeste de 42° 50' 58''. Considerou-se a lavoura como sendo de cultivo convencional, pois houve adubação química e controle químico de plantas invasoras, mas não houve aplicação de produtos para controle de pragas e doenças; e ii- cultivo orgânico de 'Catuaí' com 20 anos, em Ervália-MG, altitude de 900m, latitude sul de 21° 36' 09'' e longitude oeste de 45° 48' 15''. Em Ervália, o produtor pulverizou calda viçosa em toda a área em novembro de 2007. Após 30 dias desta pulverização, aplicou-se o isolado B157I+ (0,4L/planta) com um pulverizador costal.

Após a aplicação, e semanalmente durante 30 dias, em lados opostos de cada planta, coletaram-se duas folhas, das quais retiraram-se 20 discos (1cm de diâmetro), que foram transferidos para solução salina em erlenmayer, mantendo-se por 60min em agitador orbital a 150rpm. Semearam-se 100µl de cada amostra em meio 523 com 100µg de cada antibiótico selecionado, em placas de Petri, incubando-se a 30°C. Após 24 a 48h, determinou-se o número de unidades formadoras de colônia.

Em Viçosa, os tratamentos e avaliação da sobrevivência foram similares aos efetuados no experimento de casa de vegetação. Em ambas as localidades, mensalmente (durante 4 meses) coletaram-se 40 folhas (20 folhas/planta, 10 em lados opostos), em ramos plagiotrópicos do terço médio da planta de cada parcela. No laboratório, avaliou-se a incidência de ferrugem (porcentagem de folhas doentes).

Os experimentos foram em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições (duas plantas = uma unidade experimental). Cada bloco foi montado seguindo a linha de plantio. Uma fileira de plantio foi mantida como bordadura entre os blocos e, dentro de cada bloco, duas plantas foram bordaduras entre os tratamentos.

2.3. Análise dos dados

Descreveu-se o efeito do tempo na sobrevivência de B157-I+ por meio de modelos de regressão linear simples, para cada período estudado. Para ajuste dos modelos, transformaram-se os dados de UFC em $\log(\text{UFC}+1)/\text{cm}^2$. Avaliou-se a adequabilidade dos modelos por meio do coeficiente de determinação, quadrado médio do resíduo e análise de resíduos. Compararam-se a taxa de decréscimo na população em função do tempo (r-pop) e a população inicial (Pop-In), estimados pelo modelo ajustado, segundo Madden et al. (2007). Para o experimento em que se avaliou o efeito de fungicidas cúpricos na sobrevivência de *Bacillus* sp., calculou-se a área abaixo da curva de sobrevivência (AACs). Submetram-se os valores de AACs à análise de variância, e compararam-se as médias dos tratamentos com o teste Tukey ($\alpha = 0,05$). Nas análises estatísticas, usou-se o programa SAS System v. 9.1.

3. Resultados

3.1. Sobrevivência de *Bacillus* sp. no filoplano de cafeeiros em casa de vegetação

Recuperou-se o isolado B157-I+ até, no máximo, 30 dias após a aplicação, nos dois períodos avaliados no experimento, e a população de B157-I+ reduziu-se rapidamente com o tempo (Fig. 1).

3.2. Sobrevivência de *Bacillus* sp. no filoplano de cafeeiros tratados com fungicidas cúpricos

3.2.1. Experimento em casa de vegetação

No primeiro mês, quando não se aplicou fungicida cúprico, houve queda acentuada da população nas primeiras semanas (Figura 2). Não houve diferença entre a pop-in e r-pop entre os dois tratamentos quando se aplicou somente B157-I+ (dados não

mostrados). No segundo mês, obtiveram-se dois grupos bem definidos de padrão de curva de sobrevivência (Figura 2 A-F). A sobrevivência foi maior nos tratamentos onde não se aplicou cobre, e a população inicial foi maior quando não se aplicou fungicida cúprico (Tabela 1). Houve maior decréscimo da população do antagonista nas mudas em que se pulverizou fungicida cúprico, independente do princípio ativo (Tabela 1). A AACCS foi maior nos tratamentos sem fungicida cúprico (Tabela 1). Houve correlação positiva ($r = 0,88$) entre a eficiência de controle e a densidade populacional da bactéria.

3.2.2. Experimento de campo

No cultivo orgânico de Ervália, não se obteve uma curva para comparação, mas a tendência geral foi similar ao ocorrido nos tratamentos que receberam fungicida cúprico no cultivo convencional (Figura 1 e 3 – E e F). A aplicação desses fungicidas reduziu a sobrevivência da bactéria.

Em Viçosa, os resultados em campo foram similares aos obtidos em casa de vegetação. No primeiro mês, recuperou-se a bactéria até 21 dias (Figuras 2-A, 2-B, Figuras 3-A e 3-B), a partir de quando a população declinou acentuadamente em relação ao experimento em casa de vegetação (Figuras 2-A, 2-B, Figuras 3-A e 3-B). Para AACCS, r-pop e Pop-in, os resultados foram semelhantes aos obtidos no experimento em casa de vegetação (Tabela 1). A ferrugem não ocorreu durante toda a condução do estudo de sobrevivência.

4. Discussão

Monitorou-se a sobrevivência de *Bacillus* sp. ao longo do tempo no filoplano de cafeeiro, visando determinar formas eficientes de usar o antagonista no controle da ferrugem. Ao contrário do esperado para uma espécie bacteriana que produza endósporos, a população de B157 caiu rapidamente já nas primeiras semanas, tanto em casa de vegetação quanto no campo. Em geral, o isolado B157 não sobreviveu mais que 30 dias e, em determinada situação no campo, não sobreviveu além de 21 dias. Dessa forma, não houve acúmulo da população de um mês para outro, apesar de se efetuarem pulverizações por dois meses consecutivos. Há relatos de redução acentuada das populações de *Bacillus* spp. após aplicados. A população de um isolado de *B. subtilis*, antagonista de *Cercospora beticola*, declinou acentuadamente, já nos primeiros 4 dias da aplicação. Como houve correlação entre a população de B157 e o controle da doença, provavelmente a eficiência do controle dependa da bactéria viva no campo (Collins et al., 2003). Quatro isolados de *Bacillus* sp. foram eficientes no controle do oídio da abóbora (*Podosphaera fusca*) por, pelo menos, 16 dias (Romero et al., 2004). A ação dos antagonistas foi creditada à antibiose, e observou-se que esses isolados permaneceram no filoplano em níveis populacionais similares ao aplicado, por, pelo menos, 16 dias. Suspensões de células de *B. subtilis*, esterilizadas ou não, pulverizadas 24 h antes de inocular *H. vastatrix*, reduziram a severidade da ferrugem em cafeeiros em casa de vegetação (Bettiol & Várzea, 1992). Para os autores, houve maior eficiência de controle quando se aplicaram células vivas do antagonista.

Quando a densidade populacional dos antagonistas relaciona-se à eficiência no controle da doença, é necessário manter essa população em nível suficiente para obter um controle efetivo. Dependendo do patossistema, essa população pode ser mantida mais facilmente. Quando Scherm et al. (2004) usaram *B. subtilis* no patossistema

Vaccinium myrtillus - *Monilinia vaccinii-corymbosa*, a população da antagonista diminuiu bruscamente nos primeiros 4 dias. Como o patógeno infecta flores que permanecem abertas por pouco tempo, a manutenção do isolado em um nível que exerça controle é mais fácil. Entretanto, no patossistema *H. vastatrix* - cafeeiro, a planta permanece exposta a infecções pelo patógeno por longo tempo. Como supõe-se que o antagonista atue inibindo a germinação dos esporos do patógeno pela produção de compostos antifúngicos (Haddad et al., 2007b) é necessário que a densidade populacional do antagonista esteja em determinado nível para que esse efeito persista por um longo período de tempo. Quando o principal mecanismo de ação do antagonista é a antibiose, espera-se uma correlação entre densidade populacional do antagonista e eficiência no controle da doença (Collins et al., 2003). Assim, estudos futuros deverão focar o binômio concentração e intervalo de aplicação, para garantir a durabilidade da eficiência do agente de biocontrole, apesar de o isolado B157 ter sido tão eficiente quanto o hidróxido de cobre no controle da doença em condições de campo (Haddad et al., 2007a).

Há, também, necessidade de estudos de requerimento ecológicos do isolado, para que se aumente sua eficiência. Entender a influência de fatores bióticos e abióticos na expressão da síntese de antibióticos abre uma possibilidade de manipular estes fatores, para maior produção do antibiótico e, conseqüentemente, aumentar assim a eficiência do agente de biocontrole (Raaijmakers et al., 2002). Outro aspecto que demanda estudos é o da formulação. A aplicação do antagonista em formulações adequadas tem papel decisivo na eficiência final de produtos à base de *Bacillus* spp. (Schisler et al., 2004). Deve-se explorar o uso de nutrientes que possam aumentar a sobrevivência da bactéria. Estes nutrientes podem aumentar a sobrevivência do antagonista, bem como sua multiplicação (Sabaratnam & Traquair, 2002). Em estudos

in vitro, a glicose estimulou a produção do antibiótico 2,4-diacetylphloroglucinol e reprimiu a produção de pioluteorin (Duffy & Défago, 1999), e a quantidade do antibiótico produzido por *P. fluorescens* está diretamente relacionada à sua densidade populacional e à sua capacidade de colonizar a rizosfera de plantas de trigo (Raaijmakers et al., 1999). Espera-se, portanto, que a adição de glicose em um produto formulado para essa estirpe da antagonista tenha efeito na colonização e eficiência do agente.

As condições ambientais podem afetar a capacidade de controle de doenças por agentes de biocontrole (Guetsky et al., 2001). Pode-se aumentar a eficiência do biocontrole com a aplicação de antagonistas que atuem por mais de um mecanismo, separadamente ou conjuntamente e tenham requerimentos ecológicos diferenciados (Guetsky et al., 2001). Com esta combinação, melhora-se a durabilidade e a eficiência do controle biológico, pois patógenos podem responder ao ataque dos agentes de biocontrole e diminuir a eficiência desses agentes (Duffy et al., 2003). Portanto, um programa de controle biológico deve procurar selecionar outros microorganismos eficientes no manejo da ferrugem, para uso em alternância ou em conjunto com o isolado B157. Esse isolado atua diretamente, reduzindo a germinação de urediniosporos de *H. vastatrix*. Se após uma seleção de potenciais agentes de biocontrole, encontrar-se algum que atue por outros mecanismos, o uso combinada deste isolado ao B157 provavelmente aumentaria a eficiência do controle. A aplicação de *B. pumilus*, *B. subtilis* e *Curtobacterium flaccumfaciens*, em mistura, foi mais eficiente no controle de doenças do pepino que a aplicação separada (Raupach e Kloepper, 1998). O uso simultâneo de *Pichia guilhermondii* e *B. mycooides* em folhas de morangueiro foi mais eficiente no controle de *Botrytis cinerea*, efeito atribuído ao sinergismo dos

antagonistas, com modos de ação e requerimentos ecológicos diferentes (Guetsky et al., 2001).

O controle biológico seria uma alternativa viável para reduzir a quantidade de fungicidas cúpricos na agricultura orgânica, apesar de ter-se observado redução na sobrevivência do isolado B157 por fungicidas cúpricos. Como a população de células vivas correlacionou-se ao controle da doença, provavelmente fungicidas cúpricos diminuíam a eficiência do biocontrole. Poder-se-ia contornar esse problema com a aplicação do isolado B157 antes das pulverizações cúpricas. Para controle da ferrugem, recomendam-se de quatro a cinco pulverizações com fungicidas cúpricos, em intervalos mensais. Assim, aplicar-se-ia o isolado B157 na(s) primeira(s) pulverizações e pulverizar-se-ia um fungicida cúprico nas posteriores, visto que o cobre é importante para a agricultura, principalmente por ser um nutriente relacionado ao aumento da produtividade no cafeeiro (Zambolim et al., 1997). Como observado, o biocontrole da ferrugem do cafeeiro com o isolado B157 é alternativa viável. A disponibilização do isolado para uso comercial depende de resolver algumas questões, como obter um produto formulado. Deve-se, também, manter a procura por novos isolados eficientes para ser obter um manejo adequado da doença, sem agredir o ambiente.

Referências:

- Bettiol, W., Várzea, V. M. P., 1992. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. Fitopatologia Brasileira 17, 91-95.
- Carvalho, V. L., Cunha, R. L., Chalfoun, S. M., 2002. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. Informe Agropecuário 23, 101-114.

- Collins, D. P., Jacobsen, B. J. Maxwell B., 2003. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26, 224-232.
- Duffy, B., Schouten A., Raaijmakers J. M., 2003. Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41,501–38.
- Duffy, B. K., Défago, G., 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2429–2438.
- Emmert, E. A. B., Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171, 1-9.
- Fokkema, N. J. E., 1990. Biological control of aerial plant surfaces. In: Komada, H., Kiritani, K., Bay-Petersen, J. (Eds.), *The biological control of plant diseases*. Food & Fertilizer Thecnology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan, pp. 41-48.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinoor A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91, 621-627.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Romeiro, R. S., 2004. Biocontrol of coffee leaf rust with antagonists isolated from organic crops. In: *Annual Meeting of the American Phytopathological Society, 2004, Anaheim, Ca.* *Phytopathology* 94, S37.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Teixeira, H., 2007a. Biocontrol as an alternative for leaf rust management in organically-grow coffee. *IOBC/WPRS Bull.* 30, 93-96.

- Haddad, F., Maffia, L. A., Saraiva, R. M., Mizubuti, E. S. G., 2007b. Mecanismo de ação de bactérias antagonistas a *Hemileia vastatrix*. Fitopatologia Brasileira 32, 259.
- Kinkel, L. L., 1997. Microbial population dynamics on leaves. Annual Review of Phytopathology 35, 327-347.
- Madden, L. V., Hughes, G., van den Bosch, F., 2007. The study of plant disease epidemics. The American Phytopathological Society, St Paul, USA.
- Raaijmakers, J. M., Bonsall, R. F., Weller, D. M., 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. Phytopathology 89, 470-475.
- Raaijmakers, J. M., Vlami M., Souza J. T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek 81, 537–547.
- Raupach, G.S., Kloepper J. W., 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology 88, 1158-1164.
- Romero, D., Pérez-García, A., Rivera, M. E., Cazorla, F. M., de Vicente, A., 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. Applied Microbiology Biotechnology 64, 263–269.
- Sabaratnam, S., Traquair, J.A., 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. Biological Control 23, 245–253.
- Scherm H., Ngugi, H. K., Savelle, A. T., Edwards, J. R., 2004. Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. Biological Control 29, 199 – 206.

- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., Jackson, M. A., 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94, 1267-1271.
- Vale, F. X. R., Fernandes Filho, E. I., Liberato, J. R., 2003. Quant. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, p.105.
- Van der Vossen, H. A. M., 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: Zambolim, L., Zambolim, E. M., Várzea, V. M. P. (Eds.), *Durable resistance to coffee leaf rust*. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp. 1-29.
- Zambolim, L., Vale, F. X. R., Pereira, A. A., Chaves, G. M., 1997. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: Vale, F. X. R., Zambolim, L. (Eds.), *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*, Vol. 1. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil, pp.83-140.

Tabela 1 – População inicial de *Bacillus* sp. (B157-I+), área abaixo da curva de sobrevivência de B157-I+ (AACS) e taxa de decréscimo na sobrevivência (r) estimada com o modelo linear simples, no filoplano de cafeeiros em casa de vegetação (CVeg) e no campo. Aplicaram-se os tratamentos no período de dois meses

Tratamento	População		AACS**		r-pop*	
	inicial*					
	Campo	CVeg	Campo	CVeg	Campo	CVeg
Duas aplicações de B157-I+ em intervalos mensais (valores no segundo mês)	5,2 a	5,0 a	102,7 a	106,7 a	-0,115 a	-0,105 a
Uma aplicação de B157-I+ no segundo mês	5,1 a	5,1 a	103,2 a	107,7 a	-0,118 a	-0,098 a
Aplicação de hidróxido de cobre e, 1 mês após, aplicação de B157-I+	4,4 b	4,3 b	48,7 b	46,3 b	-0,173 b	-0,170 b
Aplicação de Calda Viçosa e, 1 mês após, aplicação de B157-I+.	4,3 b	4,2 b	45,0 b	45,0 b	-0,172 b	-0,165b

* Os valores de população inicial e r-pop seguidos da mesma letra não diferem entre si, segundo o intervalo de confiança ($\alpha = 95\%$). **

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (teste Tukey, $\alpha=0.05$).

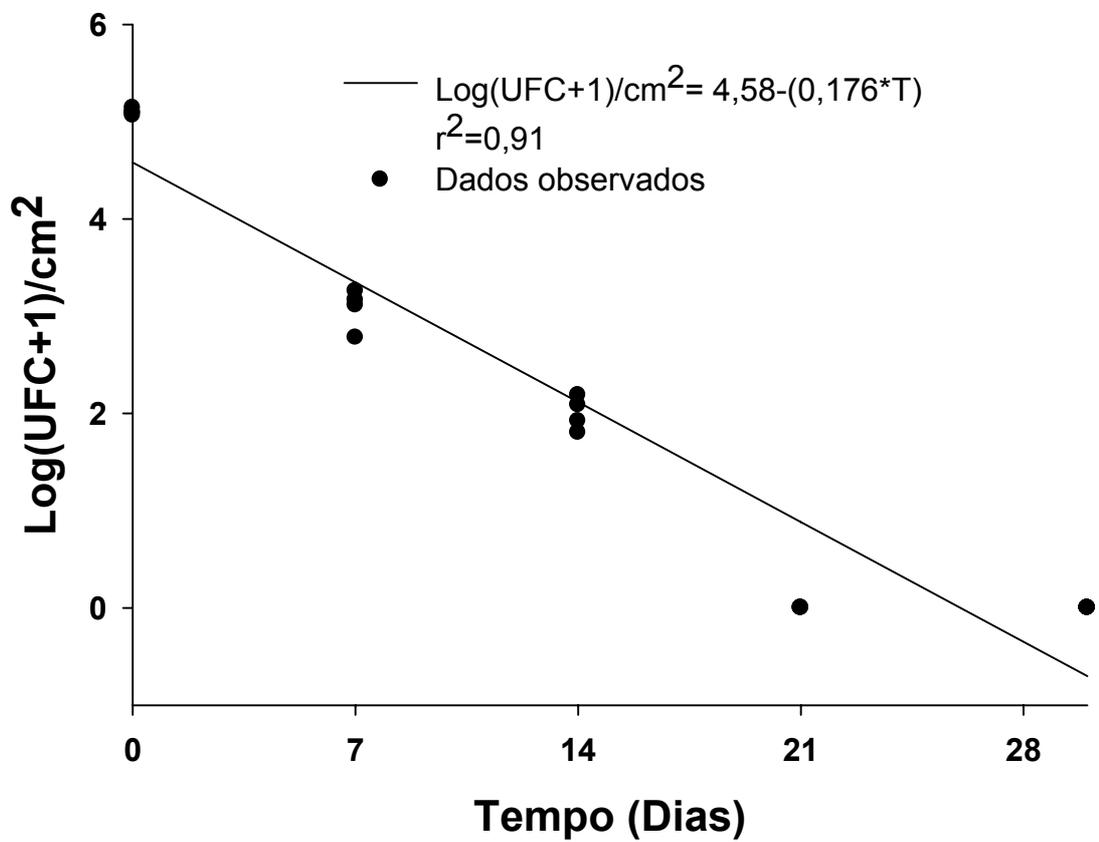


Figura 1. Sobrevivência de *Bacillus* sp. (B157-I+-I+) em cafeeiros em condições de campo (Ervália-MG).

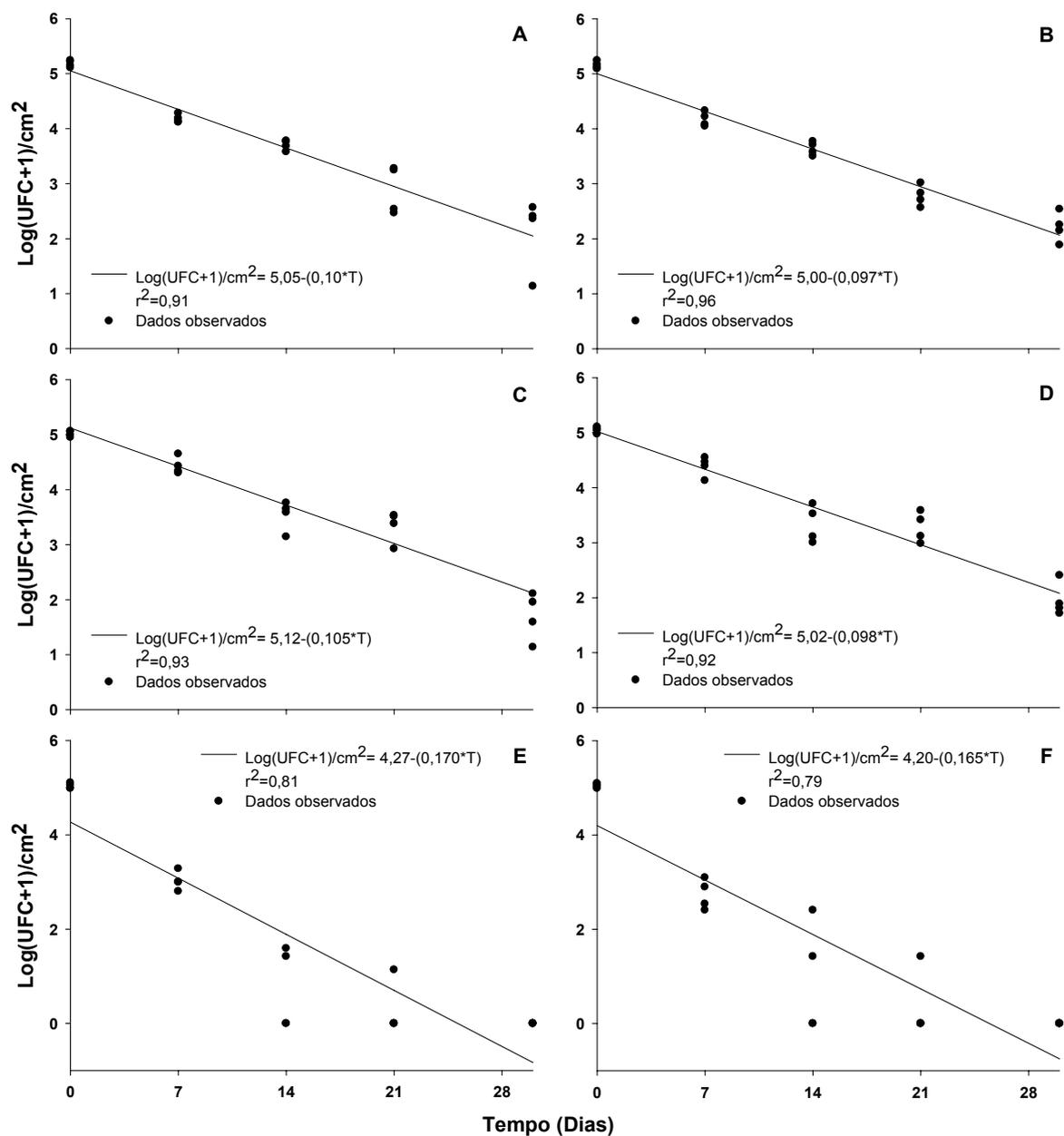


Figura 2. Sobrevivência de *Bacillus* sp. (B157-I+) no filoplano de cafeeiros em casa de vegetação. A – uma aplicação de B157-I+; B – primeira aplicação de B157-I+, no primeiro mês; C – segunda aplicação de B157-I+; D – aplicação de B157-I+ no segundo mês; E - aplicação de hidróxido de cobre e, 1 mês após, aplicação de B157-I+; F - aplicação de sulfato de cobre e, 1 mês após, aplicação de B157-I+.

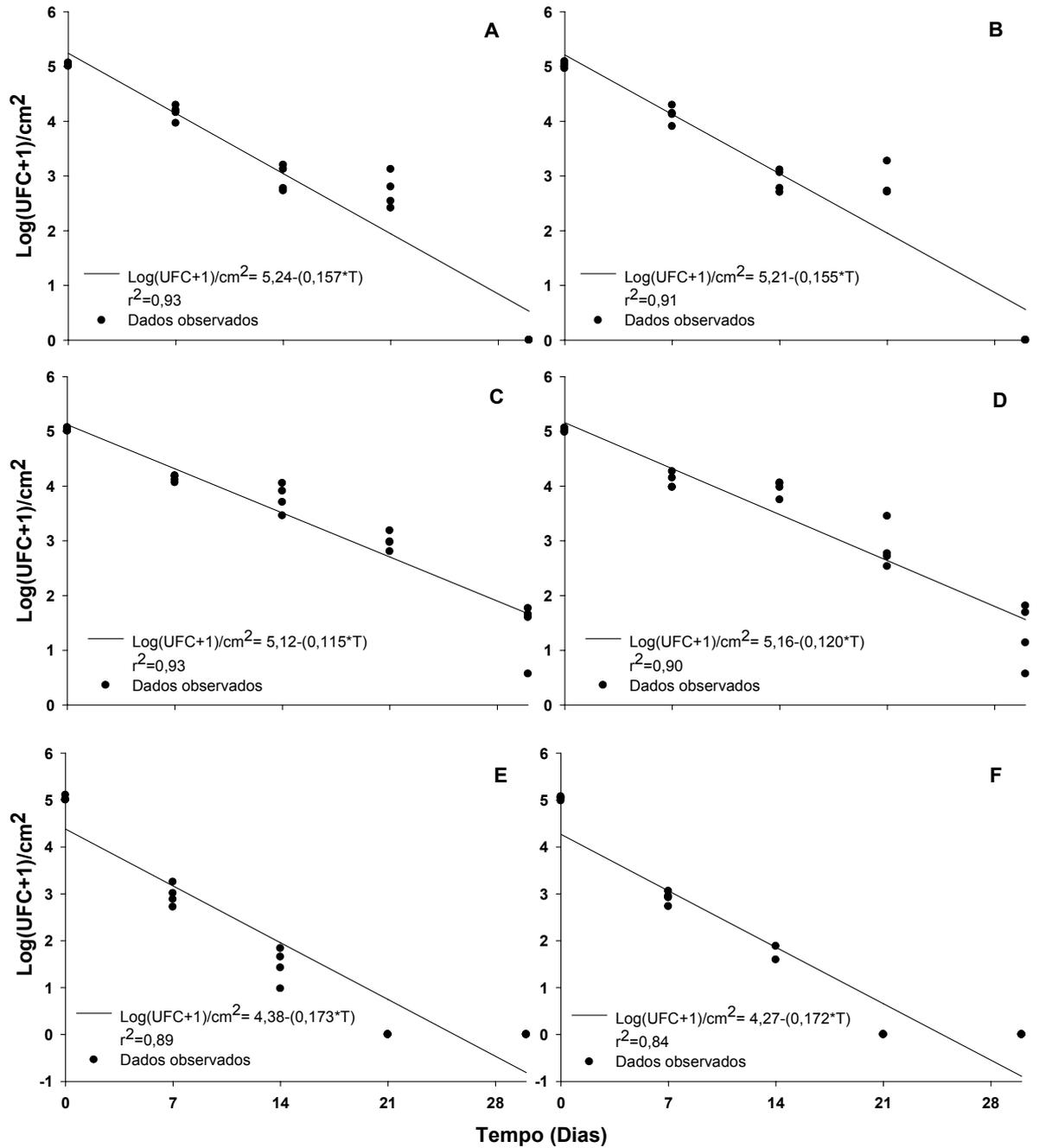


Figura 3. Sobrevivência de *Bacillus* sp. (B157-I+) em plantas de cafeeiro em condições de campo (Viçosa-MG). A – uma aplicação de B157-I+, no primeiro mês; B – primeira aplicação de B157-I+; C – segunda aplicação de B157-I+; D – aplicação de B157-I+ no segundo mês; E - aplicação de hidróxido de cobre e, 1 mês após, aplicação de B157-I+; F - aplicação de sulfato de cobre e, 1 mês após, aplicação de B157-I+.

CONCLUSÕES GERAIS

O isolado de *Bacillus* sp. foi tão eficiente quanto o hidróxido de cobre no controle da ferrugem do cafeeiro em condições de campo. Portanto, esse isolado tem potencial para biocontrole da ferrugem em cafezais orgânicos.

Os isolados de *Pseudomonas* sp. e de *Bacillus* sp. não protegeram sistemicamente cafeeiros e, segundo os resultados, produziram substância(s) com ação antifúngica a *H. vastatrix*, *in vitro* e *in vivo*.

A sobrevivência de *Bacillus* sp. no filoplano de cafeeiros decresceu rapidamente ao longo do tempo.

Fungicidas cúpricos reduziram o tempo de sobrevivência de *Bacillus* sp. no filoplano.

Devem-se efetuar estudos ecológicos e de formulações de *Bacillus* sp., para aumentar sua sobrevivência no filoplano e sua eficiência no controle da ferrugem.