

MÁRCIO TADEU GODINHO

**POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO
COM BACTÉRIAS RESIDENTES DO FILOPLANO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

MÁRCIO TADEU GODINHO

**POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO
COM BACTÉRIAS RESIDENTES DO FILOPLANO**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2010.

Prof. Leandro Grassi de Freitas

Prof. José Rogério de Oliveira

Pesq. Wagner Bettiol
(Co-orientador)

Prof. Everaldo Antônio Lopes
(Co-orientador)

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Presidente da Banca)

Ao meu mestre e amigo Prof. Reginaldo Romeiro.

Aos meus pais Augusto e Cármina.

À minha avó Doralice

À Luana

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em meu caminho, iluminando e permitindo a conquista de mais essa vitória;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro, pela amizade, pelo incentivo sempre presente, dedicação e confiança em meu trabalho;

Ao Dr. Wagner Bettiol, pelo suporte profissional, orientação, dedicação e amizade durante a realização deste trabalho;

Ao Dr. Everaldo Antônio Lopes, pela amizade e conselhos dados durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico, Adriana, Hélivio, Thaís, Silvia, Lorena, Mônica, Lívio, Cristian, Larissa pela amizade e pelo agradável ambiente de trabalho;

Ao funcionário Bruno pelo apoio para a realização deste trabalho e à amizade durante este tempo;

Aos amigos da Toca do Tatu (Victor, Otávio, Gustavo, Henrique, Flávio, Lucas e Rony), aos quais agradeço em especial pela amizade, momentos de descontração, incentivo, e por me agüentarem durante esses anos de Viçosa;

Aos meus pais, Augusto e Cármina, por acreditarem em mim, pelo suporte em todos os sentidos, pelo incentivo constante, pelo amor, compreensão, atenção e por me ensinarem seus valores, que me guiam durante toda minha vida;

Aos meus irmãos, Guilherme e Karina, por acreditarem em mim e serem presentes ao longo de minha vida;

Aos meus parentes no geral por me incentivarem, mesmo a distância, a realização deste trabalho;

À Luana, pelo carinho, atenção, amor, dedicação, paciência, força e apoio em todos os momentos deste trabalho;

A todos que ajudaram e apoiaram durante esses anos e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MÁRCIO TADEU GODINHO, filho de Augusto Tadeu Godinho e Cármina Maria Amâncio Godinho, nasceu em Três Pontas, Minas Gerais, no dia 03 de novembro de 1981.

Residiu e estudou todos os anos do ensino fundamental e médio na cidade de Três Pontas, Minas Gerais. No ano de 2001, mudou-se para a cidade de Viçosa, Minas Gerais, onde cursou e concluiu (2006) o curso de Agronomia pela Universidade federal de Viçosa (UFV). Em 2008 ingressou no curso de pós-graduação em Fitopatologia em nível de mestrado na Universidade Federal de Viçosa. Em fevereiro de 2010, submeteu-se à defesa de dissertação.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Isolamento de bactérias residentes de filoplano do cafeeiro	9
3.1.1. Isolamento a partir de lavados de folhas.....	9
3.1.2. Uso de ultra-som para auxiliar a extração	10
3.1.3. Técnica específica para isolamento de microrganismos formadores de endósporos.....	10
3.2. Avaliação do potencial de antagonismo dos isolamentos de residentes do filoplano do cafeeiro a <i>Hemileia vastatrix</i>	10
3.2.1. Inibição da germinação urediniósporos.....	10
3.2.2. Discos de folha.....	11
3.2.3. Folhas destacadas	14
3.2.4. Mudras de Cafeeiro.....	14
3.3. Identificação dos Isolados	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Isolamento dos antagonistas.....	16
4.2. Inibição da germinação de urediniósporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	16
4.3. Teste em discos de folhas.....	22
4.4. Teste em folhas destacadas	24
4.5. Teste em casa-de-vegetação	25
4.6. Identificação dos isolados	26
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	31

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
---------------------------------	----

RESUMO

GODINHO, Márcio Tadeu, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Potencial de controle biológico da ferrugem do cafeeiro com bactérias residentes do filoplano.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-Orientadores: Wagner Bettiol e Everaldo Antônio Lopes.

Procurando-se microorganismos promissores para o controle da ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, foram isolados residentes do filoplano de folhas de café sadias por simples lavagem de folha ou por utilização de ultra-som, com posterior diluição. Também foram selecionadas bactérias capazes de formar endósporos, obtendo-se um total de 217 isolados. Após o isolamento foram realizados quatro ensaios para seleção destes organismos como agentes de biocontrole da ferrugem. O primeiro ensaio realizado foi de germinação de uredinósporos de *H. vastatrix* em lâmina de vidro, comparando-se a germinação em água destilada e a germinação quando foi depositada uma gota de cada um dos isolados obtidos, deste experimento foram selecionados 33 isolados com efeito inibitório na germinação. Posteriormente os isolados foram testados, em discos de folhas, quanto a sua capacidade em suprimir o avanço da doença. Os 33 isolados foram atomizados em folhas de cafeeiro em três diferentes tempos em relação à inoculação de *H. vastatrix* (24 horas antes, simultaneamente e 24 horas depois). Quatro isolados foram selecionados e considerados capazes de reduzir a severidade da doença nas condições do experimento. Esses quatro isolados foram testados em folhas destacadas para confirmação dos resultados, novamente observando-se redução na intensidade da doença em relação à testemunha, que

continha apenas água destilada. O último experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, comparando-se os quatro isolados com as testemunhas (pulverização apenas com água destilada e com o fungicida sistêmico epoxiconazol). Os quatro isolados proporcionaram o nível de controle da doença similar ao obtido pelo uso do fungicida (aproximadamente 100%). A identificação baseada no perfil de ácidos graxos identificou os isolados UFV 025, UFV 033 e UFV 080 como *Bacillus cereus*, e o isolado UFV 070 como *Bacillus sphaericus*. Com os resultados dos experimentos podemos concluir que bactérias residentes do filoplano de cafeeiro podem ser isoladas e selecionadas como potenciais agentes de biocontrole de ferrugem.

ABSTRACT

GODINHO, Márcio Tadeu, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Potential biological control of coffee rust with phylloplane resident bacteria.** Advisor: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-Advisors: Wagner Bettiol and Everaldo Antônio Lopes.

Looking for promising microorganisms for the control of coffee leaf rust, caused by *Hemileia vastatrix*, were isolated phylloplane residents from coffee leaves healthy by simply washing the sheet or by using ultrasound, with subsequent dilution. Were also selected bacteria capable of forming endospores, yielding a total of 217 isolates. After isolation were carried out four tests for selection of these organisms as biocontrol agents of rust. The first test conducted was the germination of urediniospores of *H. vastatrix* on glass slide, comparing the germination in distilled water and germination when a drop of each of the isolates obtained was deposited, from this experiment we selected 33 isolates with an inhibitory effect on germination. Subsequently, isolates were tested on leaf discs, as its capacity to suppress disease progression. The 33 isolates were sprayed on leaves of coffee plants at three different times in relation to inoculation with *H. vastatrix* (24 hours before, simultaneously and 24 hours later). Four isolates were considered capable of reducing the severity of the disease in the conditions of the experiment. These four isolates were tested on detached leaves to confirm the results, again observing reductions in disease severity compared to control, which contained only distilled water. The last experiment was conducted in green-house, comparing the four isolates with the controls (sprayed only with distilled water and with the systemic fungicide epoxiconazol). The four isolates provided the level of disease control similar to that obtained by the use of fungicide (approximately

100%). The identification based on fatty acid profile of the isolates identified UFV 025, UFV UFV 033 and 080 as *Bacillus cereus*, isolate UFV and 070 as *Bacillus sphaericus*. With the results of the experiments we can conclude that resident bacteria in the phylloplane of coffee can be isolated and selected as potential biocontrol agents of rust.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, com uma produção estimada em mais de 51 milhões de sacas de 60 kg na safra de 2008/2009 (Agrianual, 2009), ano de bienalidade positiva para o café. Face à crescente demanda do mercado externo (Pereira e Guimarães, 2004), nos últimos anos tem aumentado o interesse em se produzir cafés especiais. O café produzido organicamente pode atingir preço duas vezes superior ao dos cafés tradicionais. Entretanto, a cafeicultura orgânica apresenta diversas normas oficiais de produção (Brasil *et al.*, 1999), dentre as quais se destaca a proibição do uso de agrotóxicos, havendo necessidade de desenvolvimento de alternativas a esses produtos.

Existem numerosos fatores que limitam o desenvolvimento do cafeeiro, como as pragas e as doenças. Dentre as doenças, a mais importante no Brasil é a ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix*, Berk e Br. (Garcia *et al.*, 1993), que pode causar perdas na produção superiores a 50% (Zambolim *et al.*, 1997). As cultivares predominantemente plantadas no Brasil são suscetíveis à maioria das raças de *H. vastatrix*.

Além da ferrugem, também se destaca, dentre as doenças fúngicas, a cercosporiose causada por *Cercospora coffeicola* Berk e Cooke, a qual chega a causar perdas em torno de 30%, principalmente em regiões de maior altitude (Carvalho e Chalfoun, 2001).

Na produção do café orgânico, com a proibição do uso de pesticidas, o manejo de doenças pode ser realizado com o uso de cultivares resistentes e, eventualmente, pelo emprego de fungicidas à base de cobre, se autorizado pela entidade certificadora (Carvalho

et al., 2002). Entretanto, segundo (Esques e Kushalappa, 1989), resistência duradoura a *H. vastatrix* é de difícil obtenção, face à grande variabilidade fisiológica do patógeno.

Dentre deste quadro, o uso do controle biológico para as doenças foliares do cafeeiro pode ser uma alternativa viável no caso de cultivos orgânicos.

Os objetivos do presente trabalho foram isolar e testar organismos procariotas residentes de filoplano e selecioná-los como possíveis agentes de biocontrole de ferrugem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O cafeeiro (*Coffea* sp.), um arbusto da família Rubiaceae, é originário da Etiópia, centro da África, onde faz parte da vegetação natural. O gênero *Coffea* possui 103 espécies, incluindo *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, as únicas cultivadas em larga escala. O café foi cultivado primeiramente pelos árabes, que tinham controle completo sobre o cultivo e preparação da bebida e o guardavam como um grande segredo, proibindo-o a estrangeiros. Mas a partir de 1615 foi levado à Europa por viajantes e os holandeses, que conseguiram as primeiras mudas, o difundiram no velho continente. Com aumento do consumo, o café foi difundido para as colônias européias, chegando ao Novo Mundo. Chegou ao norte do Brasil pelas Guianas. Em sua trajetória pelo Brasil, o café passou pelo Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Com as condições climáticas favoráveis, o cultivo se espalhou rapidamente, com a produção voltada para o mercado doméstico (Abic, 2009).

A busca pela região ideal para a cultura do café se estendeu por todo o país, se firmando hoje em regiões dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo, Bahia e Rondônia. O café é um dos produtos mais importantes da pauta de exportações do Brasil (Abic, 2009). O país é o primeiro produtor e exportador e o segundo consumidor mundial do produto (Agrianual, 2009).

O ambiente onde o cafeeiro é cultivado determina o seu desenvolvimento e produtividade que são influenciados pelo clima e solo. No manejo da lavoura cafeeira é de fundamental importância a manutenção do máximo enfolhamento para melhor vingamento de flores e, conseqüentemente, maiores produtividades (Mendes e Guimarães, 2007).

Dentre as limitações encontradas para o cultivo do café incluem-se as relacionadas ao solo e à temperatura, além de pragas e doenças. Os solos mais procurados para o plantio do cafeeiro são aqueles onde o relevo torna a mecanização da colheita possível, reduzindo-se o uso de mão-de-obra, o que reduz os custos de produção. A suplementação mineral de nutrientes é viável na maioria dos solos brasileiros, explicando a demanda por terrenos com menores declives (Matiello *et al.*, 2005). Em relação às temperaturas, de acordo com Matiello *et al.* (2005) existe um zoneamento baseado em parâmetros térmicos para o cultivo de café (Tabela 1).

Tabela 1. Aptidão de regiões para o cultivo do cafeeiro de acordo com a temperatura e espécie cultivada.

Aptidão	Temperaturas (média anual em °C)	
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Regiões aptas	19 – 22 °C	22 – 26 °C
Regiões marginais	18 – 19 °C	21 – 22 °C
	22 – 23 °C	
Regiões inaptas	<18° >23 °C	< 21 °C

Fonte: Matiello et al. (2005)

Conforme mencionado anteriormente deve-se procurar o máximo enfolhamento, o qual é dependente também das pragas e doenças que atacam a cultura. As principais pragas são a broca-do-café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) e o bicho mineiro (*Leucoptera coffeella* Guérin-Mèneville e Perrottet). No caso das doenças destacam-se a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), a doença mais importante do cafeeiro no Brasil, que pode ocasionar perdas de mais de 50% (Zambolim *et al.*, 2005) e a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berkeley e Cooke).

O fungo *H. vastatrix*, pertencente ao filo Basidiomycota, é classificado como uma ferrugem macrocíclica incompleta, tendo as fases de pínio e écio ausentes (Hennen e Figueiredo, 1984) e grande variabilidade fisiológica (Eskes e Kushalappa, 1989).

Atualmente verifica-se uma demanda crescente pelos denominados cafés de origem orgânica, principalmente pelo Japão, países europeus e norte-americanos (Pereira e Guimarães, 2004). A demanda por produtos agrícolas orgânicos tem crescido a uma taxa de 25% ao ano no Brasil e, em conformidade com a Associação de Cafeicultura Orgânica do Brasil (ACOB), a produção de café orgânico tem uma taxa de crescimento médio de 50%

ao ano, distribuída no sul de Minas, São Paulo, norte do Paraná, Espírito Santo e Bahia, além de algumas propriedades em Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Rio de Janeiro. A proibição de emprego de fungicidas na produção de café orgânico resulta em maior incidência da ferrugem.

A indisponibilidade de resistência duradoura a *H. vastatrix* (Eskes e Kushalappa, 1989), aliada à crescente restrição de uso até mesmo de produtos à base de cobre, cria uma necessidade de que se desenvolvam alternativas para o controle da ferrugem do cafeeiro em cultivos orgânicos. Nesse contexto, o emprego do controle biológico constitui uma alternativa viável para o manejo racional da doença, pois o cultivo orgânico é um sistema apropriado para o desenvolvimento e a comercialização de produtos biológicos (Harman, 2000).

A microbiota presente no filoplano é diversificada, englobando organismos como leveduras, vírus, fungos, protozoários e bactérias (Andrews, 1992; Kinkel, 1997; Lindow e Brandl, 2003; Leveau, 2009). Entretanto, a população mais abundante é de bactérias, com uma estimativa de $10^6 - 10^7$ células/cm² (Lindow e Leveau, 2002; Leveau, 2009). Pouco se sabe em relação a diversos aspectos das bactérias não patogênicas que colonizam este local e que aparentemente exercem importante papel na supressão de organismos deletérios (Romeiro, 2007).

O controle biológico pelo uso de microrganismos vivos pode ter como agentes rizobactérias, microrganismos endófitas, residentes de filoplano (Macagnan *et al.*, 2001) entre outros. Considerando ser o cafeeiro uma planta perene em que a dispensa de rizobactérias e de organismos endofitas pode ser de difícil exequibilidade, a possibilidade de emprego de residentes de filoplano talvez seja a opção mais viável e adequada. O filoplano caracteriza-se como um ambiente complexo e mutável sazonalmente, com variações de maior grandeza nos parâmetros temperatura, umidade, incidência de radiação, ventilação, composição, diversidade microbiana e quantidade de nutrientes disponíveis (Kijima *et al.*, 1995; Leveau, 2009). De fato, o filoplano é classificado como um ambiente que dificulta o estabelecimento de populações com a finalidade de controle biológico (Romeiro, 2007). Um agente considerado promissor pode não ser capaz de cumprir seu papel devido ao estabelecimento não efetivo no filoplano (Lindow e Leveau, 2002; Romeiro, 2007).

Microorganismos associados ao filoplano são conhecidos como residentes de filoplano ou epífitas. Para o presente trabalho foi adotado o conceito de residente de

filoplano proposto por Beattie e Lindow (1999), assim como adotado por Romeiro (2007), como sendo organismos capazes de nele sobreviverem e se multiplicarem.

Muitos microorganismos presentes no filoplano apresentam ou podem apresentar potencial como agentes de biocontrole (Blakeman e Fokkema, 1982). Tratch e Bettiol (1997) discutiram que tentativas de se utilizar residentes de filoplano como agentes de biocontrole têm sido realizadas há muitos anos, e que continuam sendo válidas.

Existem muitos relatos na literatura de organismos utilizados como agentes de biocontrole de doenças, alguns exemplos são citados a seguir:

Dois isolados bacterianos obtidos do filoplano de tomateiro foram testados quanto a sua capacidade em controlar a requeima causada por *Phytophthora infestans* em condições de campo (Halfeld-Vieira et al., 2008). O experimento contou com o fungicida chlorothalonil (1,5 g l⁻¹) e água como controles positivo e negativo, respectivamente. Foi observada uma redução de 55% na intensidade da doença em folhas do terço mediano da planta e de 62% nas folhas superiores, quando pulverizadas com o antagonista UFV-STB 6 (*Novosphingobium capsulatum*) em relação ao tratamento controle (água). O isolado UFV-IEA 6 (*Bacillus cereus*) foi capaz de reduzir a intensidade da doença em 55%, somente nas folhas do terço superior das plantas. As plantas pulverizadas com o isolado UFV-STB 6 também apresentaram redução significativa no percentual de frutos sintomáticos. Os resultados demonstram que os dois isolados bacterianos têm potencial no controle da doença.

Um isolado de *Bacillus subtilis* (BD0310) mostrou-se eficaz no controle de *Colletotrichum theae-sinensis* em plantas de chá na Coreia (Kim et al., 2009). Selecionado a partir do filoplano de chá, a bactéria testada em casa-de-vegetação revelou maior eficácia quando aplicada de modo preventivo em relação ao modo curativo, reduzindo a intensidade da doença. Nos testes de compatibilidade com os agrotóxicos registrados para a cultura, o antagonista foi sensível apenas ao sulfato de cobre. No teste de viabilidade de prateleira o organismo permaneceu viável e com atividade antifúngica na forma de suspensão concentrada por 12 meses a temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). No experimento em condições de campo, *B. subtilis* BD0310 apresentou resultados mais efetivos no controle da antracnose do chá quando usado alternadamente com o controle químico, demonstrando ser um efetivo método de controle para a doença.

No trabalho de Ohtaka et al. (2008), um fungo não identificado (isolado MKP5111B) foi selecionado a partir do filoplano de arroz e usado contra o agente causal da

brusone, *Magnaporthe grisea*, em três tratamentos distintos: micélio vivo (Std), micélio morto por nitrogênio líquido (FR) e micélio morto por autoclavagem (AC), que foram pulverizados nas mudas ou misturados ao solo onde as sementes foram plantadas. Os resultados demonstram que os tratamentos Std e FR foram inibitórios a doença, com menor número de lesões em relação ao controle (Std, $1,3 \pm 0,5$ lesões; FR, $1,1 \pm 0,6$; controle, $14,8 \pm 1,6$). O tratamento AC não foi efetivo ($13,6 \pm 2,1$ lesões). O efeito da supressividade foi relatado em folhas novas, sem a presença do micélio do antagonista. Sugere-se que o fungo pode ter induzido resistência às plantas de arroz.

Especificamente em relação à ferrugem do cafeeiro, embora existam poucos trabalhos publicados sobre o seu biocontrole, há alguns resultados promissores. Cristancho (1995) relatou que a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* foi reduzida com a aplicação de produto comercial à base de *Bacillus thuringiensis*. O efeito protetor da bactéria em discos de folha inoculados com o patógeno durou 16 dias, com o máximo aos oito dias após a aplicação. De acordo com o relato de Roveratti *et al.* (1989), a dispensa de suspensão de propágulos de *B. thuringiensis* ao filoplano de plantas de cafeeiro levou a proteção sistêmica contra *H. vastatrix*. Os autores relataram redução em 90% no número de pústulas por folha nas primeiras cinco semanas da aplicação, redução no tamanho das lesões, redução na esporulação do patógeno, produção de urediniósporos incompletos e, em alguns casos, total inibição da esporulação. Porras *et al.* (1999) relataram que um isolado de *Pseudomonas sp.* atuou como indutor de resistência a *H. vastatrix* em cafeeiro. Haddad *et al.* (2004) selecionaram 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 espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus*. Os isolados foram testados em experimentos distintos, em campo comercial de cafeeiro orgânico localizado em Machado, MG (Haddad *et al.*, 2009). Foram usados 10 tratamentos que se constituíram dos sete isolados, hidróxido de cobre, silicato de cálcio e água, aplicados três e quatro vezes mensalmente nos experimentos 1 e 2 respectivamente. No experimento 1, a aplicação se iniciou em janeiro de 2005, com a severidade em torno de 24% e nenhum dos tratamentos controlou a doença efetivamente. No segundo experimento, as aplicações se iniciaram em novembro de 2005, com severidade em torno de 7,5%, e houve diferença significativa ($P < 0,0001$) entre os tratamentos quanto à incidência e severidade máxima (avaliados em junho de 2006), à taxa de aumento da incidência entre novembro de 2005 e junho de 2006, e para as áreas abaixo da curva de progresso da doença, tanto para a

incidência quanto para a severidade da ferrugem. Os valores mais baixos para esses tratamentos foram obtidas nas parcelas tratadas com hidróxido de cobre ou com *Bacillus* sp. isolado B157, e valores intermediários com *Pseudomonas* sp. isolado P286. Em um terceiro experimento realizado em 2007 em Ervália, MG, os isolados B157 e P286 foram novamente avaliados. O isolado B157 reduziu a intensidade da ferrugem de forma tão eficaz quanto o hidróxido de cobre.

Para o presente trabalho procurou-se isolar e selecionar potenciais agentes bacterianos de biocontrole da ferrugem do cafeeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento de bactérias residentes de filoplano do cafeeiro

Foram amostradas plantas de cafeeiro, preferencialmente nunca expostas a agrotóxicos, a fim de que se encontrasse maior diversidade de organismos em seu filoplano. Além disso, foram coletadas folhas de plantas em cafezais de Três Pontas, Varginha e Viçosa (MG) e Venda Nova do Imigrante (ES).

O procedimento consistiu em remover as bactérias presentes no filoplano de cafeeiro e individualizá-las em cultura por diferentes estratégias: isolamento a partir de lavados de folhas; uso de ultra-som para auxiliar a extração e por meio de técnica específica para isolamento de microrganismos formadores de endósporos.

3.1.1. Isolamento a partir de lavados de folhas.

Dez gramas de folhas sadias foram adicionadas a 100 ml de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada contendo Tween 80 a 0,3%, deixando-se sob agitação (120 rpm) por 20 min. A temperatura foi ajustada para 25-30°C e, em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000g por 20 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O sedimento, visível ou não, foi ressuspendido em 2 ml de solução salina, seguindo-se diluição em série (fator 1:10). Tomaram-se 100 mL de cada diluição e realizou-se o semeio em placa de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970) com auxílio de alça de Drigalsky. Após as primeiras 24 horas de incubação a 28°C, colônias bacterianas individualizadas foram repicadas para tubos contendo meio inclinado. As colônias foram marcadas de modo que decorrentes 48 horas de incubação, as que surgissem após esse período poderiam ser visualizadas e também repicadas, sendo estabelecido dessa forma um universo de culturas puras de

residentes de filoplano a serem testadas como potenciais antagonistas. Cada isolamento também foi mantido em solução salina a temperatura ambiente.

3.1.2. Uso de ultra-som para auxiliar a extração

Dez gramas de folhas sadias foram adicionadas a 100 ml de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada contendo Tween 80 a 0,3% e submetidas a ultra-som (60 Hz por 20 min). A temperatura foi ajustada para 25-30°C e, em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000g por 20 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O sedimento, visível ou não, foi ressuspendido em 2 ml de solução salina, seguindo-se diluição em série (fator 1:10). Tomou-se 100 mL de cada diluição e realizou-se o semeio em placa de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970) com auxílio de alça de Drigalsky. O restante do procedimento foi realizado conforme descrito no item 3.1.1.

3.1.3. Técnica específica para isolamento de microrganismos formadores de endósporos.

Fragmentos de folhas foram transferidos para o meio líquido de Finley e Fields (1962) para indução da formação de endósporos. Após cultivo por 72 h sob agitação (120 rpm) a 25°C, a cultura foi retirada e aquecida a 80°C por 10 minutos de modo a matar células vegetativas e, a seguir, diluída em série seguindo-se semeio em meio sólido. O restante do procedimento seguiu-se como no isolamento a partir de lavados de folha (item 3.1.1).

3.2. Avaliação do potencial de antagonismo dos isolamentos de residentes do filoplano do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*

Estudou-se a capacidade de cada isolado, em inibir a germinação de uredinósporos e promover o controle da doença em discos de folha, folhas destacadas e mudas de cafeeiro.

3.2.1. Inibição da germinação uredinósporos.

Uma suspensão de uredinósporos foi preparada a partir de propágulos do patógeno coletados no dia da utilização, utilizando-se folhas de cafeeiro infectadas presentes na área de viveiro do *Campus* da Universidade Federal de Viçosa e não expostas a agrotóxicos. Ajustou-se a concentração da suspensão para 1 mg de uredinósporos por 1 ml de água destilada esterilizada, homogeneizada por 5 min contendo Tween 80 a 0,3%. Na superfície de uma lâmina estéril adicionou-se uma gota de 15 µl de suspensão de uredinósporos (sob agitação constante) e, sobre esta, igual volume de suspensão de células do antagonista

($OD_{540} = 0,4$) crescidas em até 24 h. No tratamento controle foi utilizada água destilada. As lâminas foram colocadas em caixas gerbox contendo algodão saturado com água e fechadas de modo a manter a umidade elevada em seu interior, evitando a secagem da gota. Após 6 h de incubação no escuro a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, urediniósporos germinados e não germinados foram mortos utilizando-se lacto-fucsina e contados em 20 campos, escolhidos aleatoriamente, por lâmina. Para cada antagonista foram analisadas duas lâminas, utilizando-se a média das contagens para estimativa da germinação dos esporos, expressa em porcentagem em relação ao controle.

3.2.2. Discos de folha.

Discos de 2.0 cm de diâmetro foram retirados de folhas jovens completamente desenvolvidas da cultivar Mundo Novo, originados de cultivo orgânico na região de Jaguariúna, SP, e depositados em caixas plásticas sobre uma espuma esterilizada saturada com água, tendo sua face abaxial voltada para cima de maneira a permitir atomização da suspensão de 1 ml de células do antagonista ($OD_{540}=0,4$) crescido em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) por 24 h. Os antagonistas utilizados foram pré-selecionados no teste anterior.

Os agentes bacterianos foram atomizados 24 h antes e depois e simultaneamente da atomização de suspensão (5 ml por bandeja) contendo os urediniósporos de *H. vastatrix* (1 mg/ml), coletados no dia da inoculação e oriundos de plantas de cafeeiro infectadas presentes na área da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP e processados conforme descrito no item 3.2.1. Após a inoculação as bandejas foram fechadas e colocadas em uma sala climatizada a aproximadamente $22^\circ\text{C} \pm 1$, no escuro nas primeiras 24 h e posteriormente com fotoperíodo de 12 h. A severidade da doença foi avaliada contando-se o número de lesões por disco logo após a evidenciação dos sintomas nas testemunhas inoculadas e tratadas com água.

As parcelas contendo os tratamentos foram separadas com um plástico, de modo que a suspensão contendo os isolados atingissem apenas os discos de repetição respectivos ao seu tratamento (Figura 1). Na Figura 2 pode ser visualizado o isolamento da parcela que não recebeu inoculação com o patógeno.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (agentes de biocontrole X momentos de aplicação) com 10 repetições por tratamento, sendo um disco igual a uma unidade experimental. Os controles foram tratamentos inoculados e

atomizados com água e tratamentos não inoculados. Foi realizado também um teste de germinação dos urediniósporos, conforme descrito no item 3.2.1, para averiguar sua capacidade de infecção. Os resultados foram analisados pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade.

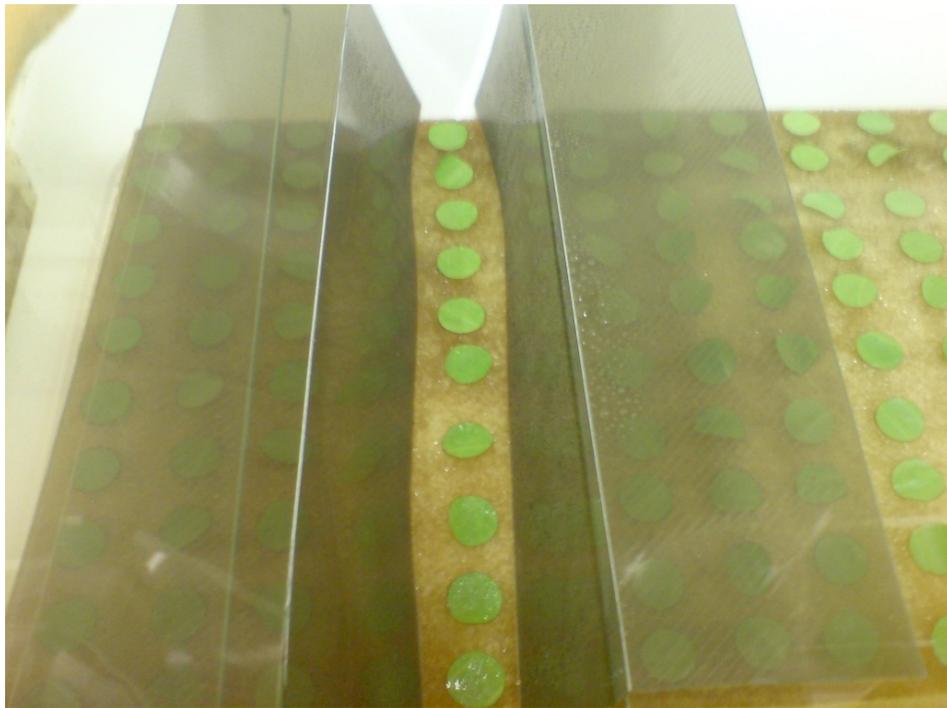


Figura 1: Proteção dos discos para dispensa de cada antagonista (1 ml por tratamento).

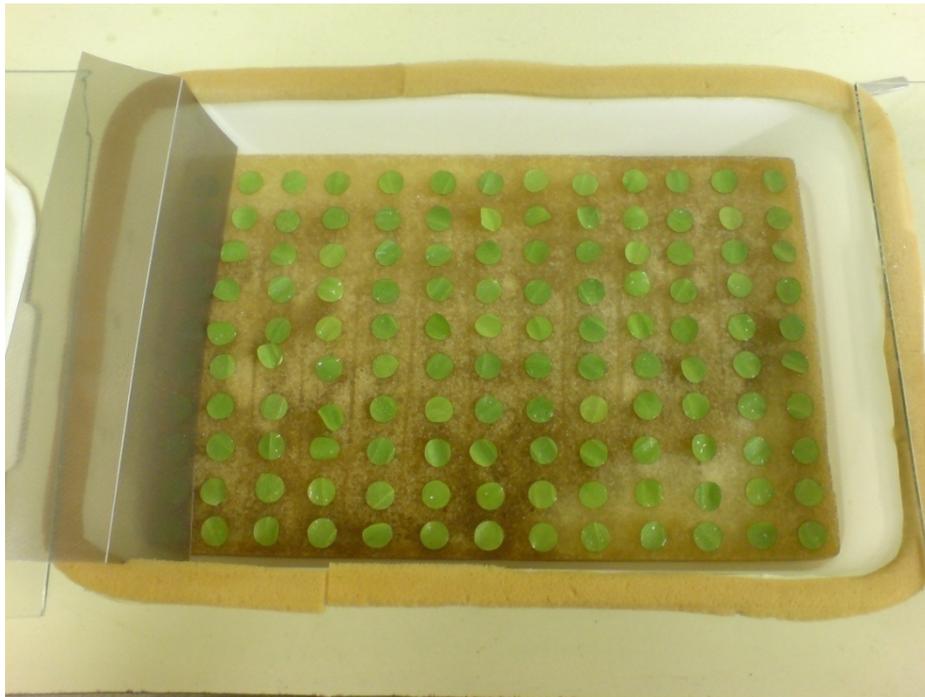


Figura 2: Proteção do tratamento controle não inoculado.

3.2.3. Folhas destacadas

Para o teste em folhas destacadas foram utilizadas folhas de cafeeiro sadias completamente desenvolvidas da cultivar Catuaí, originadas de um cultivo sem pulverização com agrotóxicos há mais de um ano, na região de Viçosa, MG. As folhas foram depositadas em uma bandeja plástica sobre uma espuma estéril e toda saturada com água e a sua parte abaxial voltada para cima, conforme descrito no item 3.2.2, e atomizadas com suspensão dos antagonistas ($OD_{540}=0,4$), 24 h antes e depois e simultaneamente à inoculação da suspensão de urediniósporos (1 mg/mL). As caixas foram fechadas com uma tampa de vidro e colocadas em câmara de crescimento a 22°C, nas primeiras 24 h no escuro e posteriormente com fotoperíodo de 12 h. Os tratamentos consistiram dos antagonistas selecionados no teste de disco de folhas e os controles foram água destilada e uma testemunha não inoculada, adaptando-se a metodologia descrita por Shiomi *et al.* (2006).

Para os tratamentos foram utilizadas sete repetições em delineamento inteiramente casualizado, espalhadas nas bandejas dentro da câmara, sendo uma folha igual a uma repetição. A avaliação foi feita após o aparecimento das pústulas na testemunha atomizada com água destilada, procedendo-se a contagem do número de lesões em cada folha e a medição da área foliar através do programa QUANT (Vale *et al.*, 2003). Para a análise dos resultados foi calculada a razão entre o número de pústulas e a área foliar, de maneira a eliminar o efeito do tamanho variado das folhas. Foi realizado o teste de Dunnet (5%), comparando-se todos os tratamentos com as testemunhas, e o esquema fatorial 4x3 (isolados x épocas de aplicação) foi analisado pelo teste de Tukey (5%) para verificação de diferença entre os isolados. Para constatação da viabilidade dos urediniósporos foi realizado o teste de germinação em lâmina de vidro, conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.4. Mudras de Cafeeiro

Cada um dos possíveis antagonistas selecionados nos testes anteriores tiveram seu cultivo realizado em meio 523 sólido (Kado e Heskett, 1970) e, na fase exponencial de crescimento, células bacterianas foram recolhidas em água de torneira e a concentração da suspensão ajustada para $OD_{540}=0,4$. O filoplano de mudras de cafeeiro 'Mundo Novo', cultivadas em tubetes sem a utilização de agrotóxicos, foi atomizado 24 h antes e depois e simultaneamente à inoculação de *H. vastatrix*, de modo a cobrir toda a superfície da folha próximo ao ponto de escorrimento da gota. Os urediniósporos foram obtidos de plantas presentes na área de viveiro de café da Universidade Federal de Viçosa, no dia na

inoculação, e processados conforme descrito no item 3.2.1. Utilizou-se 3 ml de cada antagonista e também da suspensão de urediniósporos para as cinco repetições do experimento. Após a inoculação do patógeno, as mudas foram mantidas em câmara úmida a temperatura de aproximadamente 25°C, no escuro, por 24 h e, em seguida, foram levadas a casa-de-vegetação e mantidas a temperatura e umidade parcialmente controladas, variando de 23 – 28 °C e 70 – 90 %, respectivamente. Para cada repetição foram avaliadas duas folhas, sendo utilizada a média entre elas para a análise estatística. A área lesionada pelo patógeno foi estimada com o uso do programa QUANT (Vale *et al.*, 2003) logo após o aparecimento dos sinais no tratamento onde as folhas foram inoculadas e atomizadas com água destilada. O delineamento foi inteiramente casualizado e foram utilizados como controles um fungicida sistêmico (epoxiconazol), pulverizado conforme os outros tratamentos, e água destilada. Também para este experimento testou-se o poder germinativo dos urediniósporos, no teste de germinação em lâmina de vidro (item 3.2.1). A análise estatística deste experimento contou com uma análise fatorial 5 x 3+1 (tratamentos x épocas de aplicação + tratamento controle, água com suspensão de urediniósporos).

3.3. Identificação dos Isolados

A identificação dos isolados foi feita com base na análise do perfil de ácidos graxos, realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente com uso do sistema MIDI onde as porcentagens cromatográficas são automaticamente calculadas e após comparação com a biblioteca padrão, as identificações bacterianas são expressas como gênero, espécie e sub-espécie.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento dos antagonistas

Foram obtidos 217 isolados, constituindo-se a coleção testada nos experimentos.

4.2. Inibição da germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*

Dos 217 isolados, 96 atingiram a fase exponencial de crescimento em menos de 24 h. Os resultados obtidos na inibição da germinação quando comparados com a testemunha são apresentados na Tabela 2. Trinta isolados foram capazes de inibir a germinação dos urediniósporos entre 89 e 100 %: UFV 007, UFV 008, UFV 009, UFV 010, UFV 011, UFV 016, UFV 018, UFV 032, UFV 033, UFV 034, UFV 035, UFV 038, UFV 063, UFV 055, UFV 057, UFV 025, UFV 026, UFV 027, UFV 028, UFV 029, UFV 030, UFV 031, UFV 071, UFV 077, UFV 079, UFV 024, UFV 076, UFV 023, UFV 059, UFV 080.

Tabela 2. Procedência, data de coleta, método de isolamento, tipo de folha, cultivar e capacidade em inibir a germinação *in vitro* de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* dos 96 isolados de procariotas residentes do filoplano de cafeeiro obtidos neste trabalho.

Isolado	Procedência	Data da Coleta	Tipo de folha	Método de isolamento	Cultivar	Inibição da Germinação (%)
UFV 001	Viçosa/MG	21/09/2007	Nova	Agitação	Catuaí	27,6
UFV 002	Viçosa/MG	21/09/2007	Nova	Agitação	Catuaí	30,6
Continua						

UFV 003	Viçosa/MG	21/09/2007	Nova	Ultra som	Catuaí	28,3
UFV 004	Viçosa/MG	21/09/2007	Nova	Ultra som	Catuaí	15,9
UFV 005	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Ultra som	Catuaí	50,5
UFV 006	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Ultra som	Catuaí	47,4
UFV 007	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Ultra som	Catuaí	98,5
UFV 008	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Ultra som	Catuaí	100,0
UFV 009	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Ultra som	Catuaí	94,5
UFV 010	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	97,1
UFV 011	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	96,5
UFV 012	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	87,4
UFV 013	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	17,9
UFV 014	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	18,5
UFV 015	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	22,3
UFV 016	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	93,3
UFV 017	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	31,0
UFV 018	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	91,2
UFV 019	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	21,2
UFV 020	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	40,8
UFV 021	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	1,9
UFV 022	Viçosa/MG	10/1/2007	Velha	Agitação	Catuaí	19,6

Continua

UFV 023	Três Pontas/MG	16/01/2008	Nova	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 024	Três Pontas/MG	16/01/2008	Nova	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 025	Três Pontas/MG	15/01/2008	Nova	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 026	Três Pontas/MG	15/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 027	Três Pontas/MG	15/01/2008	Nova	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 028	Três Pontas/MG	15/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 029	Três Pontas/MG	15/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 030	Três Pontas/MG	15/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 031	Três Pontas/MG	15/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 032	Três Pontas/MG	16/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	92,6
UFV 033	Três Pontas/MG	16/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	100,0
UFV 034	Venda Nova do Imigrante/ES	2/7/2008	Velha	Ultra som	-	100,0
UFV 035	Três Pontas/MG	16/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	96,1
UFV 036	Três Pontas/MG	16/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	40,9
UFV 037	Três Pontas/MG	16/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	31,9
UFV 038	Três Pontas/MG	16/01/2008	Velha	Agitação	Mundo Novo	91,7
UFV 039	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	45,0
UFV 040	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	47,6
UFV 041	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	20,8
UFV 042	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	17,4
Continua						

UFV 043	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	24,5
UFV 044	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	30,5
UFV 045	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	13,8
UFV 046	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	30,4
UFV 047	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	11,2
UFV 048	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	35,3
UFV 049	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	32,5
UFV 050	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	38,1
UFV 051	Varginha/MG	3/3/2009	Nova	Agitação	Mundo Novo	25,9
UFV 052	Viçosa/MG	21/09/2007	Nova	Ultra som	Catuaí	6,7
UFV 053	Viçosa/MG	21/09/2007	Nova	Ultra som	Catuaí	6,6
UFV 054	Viçosa/MG	21/09/2007	Nova	Ultra som	Catuaí	35,4
UFV 055	Viçosa/MG	21/09/2007	Velha	Ultra som	Catuaí	100,0
UFV 056	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	100,0
UFV 057	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	100,0
UFV 058	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	97,7
UFV 059	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	100,0
UFV 060	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	100,0
UFV 061	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	95,0
UFV 062	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	100,0

Continua

UFV 063	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Agitação	-	100,0
UFV 064	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	53,9
UFV 065	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	58,1
UFV 066	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	14,1
UFV 067	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	48,5
UFV 068	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	68,7
UFV 069	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	52,0
UFV 070	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	66,3
UFV 071	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	100,0
UFV 072	Varginha/MG	3/3/2009	Velha	Esporogênica	Mundo Novo	7,6
UFV 073	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	100,0
UFV 074	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	40,3
UFV 075	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	44,5
UFV 076	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	89,9
UFV 077	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	100,0
UFV 078	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	32,4
UFV 079	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	100,0
UFV 080	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	91,2
UFV 081	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	49,9
UFV 082	Viçosa/MG	5/1/2009	-	Ultra som	Mundo Novo	73,4
Continua						

UFV 083	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	15,6
UFV 084	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	28,9
UFV 085	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	8,1
UFV 086	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	8,6
UFV 087	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	15,5
UFV 088	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	6,8
UFV 089	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	14,9
UFV 090	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	6,5
UFV 091	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	21,7
UFV 092	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	0,8
UFV 093	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	0,6
UFV 094	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	3,3
UFV 095	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	11,0
UFV 096	Venda Nova do Imigrante/ES	10/12/2008	-	Ultra som	-	7,3

4.3. Teste em discos de folhas

Os resultados do experimento de discos de folhas foram avaliados logo após o surgimento dos sinais da doença (27 dias após a inoculação) no tratamento pulverizado com água e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito dos isolados de bactérias do filopiano de cafeeiro sobre a média do número de lesões de ferrugem em discos de folha da variedade Mundo Novo.

	24 horas antes	Simultaneamente	24 horas depois
Tratamento	Média do número de lesões	Média do número de lesões	Média do número de lesões
UFV 080	0,10 d	0,40 d	0.90 d
UFV 077	1,00 d	2,70 c	4.70 b
UFV 023	0,67 d	0,40 d	14.20 a
UFV 018	0,11 d	0,22 d	3.80 c
UFV 016	4,40 c	0,10 d	3.20 c
UFV 011	3,40 c	0,10 d	4.20 c
UFV 010	0,50 d	0,90 d	3.60 c
UFV 070	1,10 d	1,40 d	4.40 c
UFV 079	2,50 c	0,90 d	4.30 c
UFV 029	2,90 c	0,40 d	7.50 b
UFV 028	0,80 d	0,60 d	18.90 a
UFV 076	0,10 d	0,70 d	4.56 b
UFV 027	0,56 d	1,10 d	2.70 c
UFV 026	1,00 c	1,00 d	3.30 c
UFV 025	0,50 d	0,40 d	0.40 d
UFV 024	0,20 d	0,10 d	10.20 b
UFV 071	0,20 d	3,33 c	4.22 c
UFV 065	1,50 d	0,44 d	7.60 b
UFV 063	1,22 d	1,40 d	9.67 b
UFV 059	2,80 c	0,90 d	9.80 b
UFV 057	1,70 c	0,30 d	4.60 c
UFV 055	1,90 d	0,10 d	6.40 b
UFV 007	0,80 d	0,00 d	4.22 b
UFV 038	1,70 d	0,10 d	4.50 c
UFV 035	1,40 d	0,70 d	3.67 c
UFV 034	1,20 d	0,10 d	1.46 c
UFV 033	1,20 d	0,30 d	0.60 d
UFV 008	0,60 d	1,75 c	6.20 b
UFV 009	0,20 d	1,70 d	3.30 c
UFV 032	0,30 d	3,00 c	1.50 d
UFV 031	0,90 d	2,70 c	7.20 b
UFV 030	1,20 d	3,20 c	0.80 d
UFV 068	0,20 d	3,80 c	4.40 b
TI 1	7,20 b	15,80 a	6.10 b
TI 2	13,80 a	10,60 b	10.20 b
TI 3	12,80 a	17,20 a	6.80 b
TN 1	0,00 d	0,00 d	0.00 d
TN 2	0,00 d	0,00 d	0.00 d
TN 3	0,00 d	0,00 d	0.00 d

TI = Testemunha inoculada, TN = Testemunha não inoculada. Médias dos tratamentos seguidos da mesma letra não se diferem pelo teste de Scott-knott a 1 %. Os dados foram transformados para o Log₁₀ (X+1) antes de proceder à análise de variância.

4.4. Teste em folhas destacadas

As quatro bactérias selecionadas no experimento anterior foram testadas em folhas destacadas com o intuito de se confirmar o potencial como redutoras da severidade da ferrugem. Os antagonistas apresentaram diferença em relação ao controle positivo pelo teste de Dunnet a 5 %, ou seja, foram capazes de reduzir a severidade da doença. Houve diferença entre os tratamentos independentemente da época, sendo o isolado UFV 080 o que apresentou as menores médias. A avaliação foi 23 dias após a inoculação de *H. vastatrix*, contando-se o número de lesões e dividindo-se pela área foliar, a fim de minimizar diferenças de tamanho das folhas (Tabela 4). As diferenças entre os isolados quando comparados entre si estão na Tabela 5. Não houve diferença em relação à época de aplicação.

Tabela 4. Efeito dos isolados UFV 025, UFV 033, UFV 070 e UFV 080 pulverizados em folhas destacadas de café ‘Catuaí’ 24 h antes e após e simultaneamente à inoculação de urediniósporos de *H. vastatrix* sobre a razão entre o número de lesões e a área foliar.

Tratamento	24 horas antes	Simultaneamente	24 horas depois
UFV 025	0,23 *	0,32 *	0,11 *
UFV 033	0,06 *	0,43 *	0,2 *
UFV 070	0,51 *	0,4 *	0,26 *
UFV 080	0 *	0,11 *	0,16 *
Água		2,11	
Não Inoculada		0	

Os tratamentos se diferiram da testemunha inoculada pelo teste de Dunnet 5 %.

Tabela 5. Efeito dos isolados UFV 025, UFV 033, UFV 070 e UFV 080 pulverizados em folhas destacadas de café ‘Catuaí’ 24 h antes e após e simultaneamente à inoculação de urediniósporos de *H. vastatrix* sobre a razão entre o número de lesões e a área foliar.

Tratamentos	Média da razão (número de lesões/área foliar)
UFV 080	0,09 b
UFV 025	0,22 ab
UFV 033	0,23 ab
UFV 070	0,40 a

O efeito dos tratamentos diferiram entre si independentemente da época de aplicação, avaliados no esquema fatorial 4 X 3 (isolados x épocas de aplicação) pelo teste de Tukey a 5 %.

4.5. Teste em casa-de-vegetação

O ensaio de biocontrole em casa-de-vegetação foi realizado com os mesmos quatro organismos utilizados nos estudos com folhas destacadas, e os resultados foram semelhantes, ocorrendo apenas diferença entre os tratamentos e o controle e não havendo diferença entre os isolados. O nível de controle da doença em relação à testemunha pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito dos isolados UFV 025, UFV 033, UFV 070 e UFV 080 pulverizados em mudas de café ‘Mundo Novo’ 24 h antes e após e simultaneamente à inoculação de urediniósporos de *H. vastatrix* sobre área foliar lesionada.

Tratamentos	Inibição da doença (%)		
	24 horas Antes	Simultaneamente	24 horas Depois
Testemunha		0 b	
UFV 025	100 a	96 a	100 a
UFV 033	96,9 a	100 a	100 a
UFV 070	100 a	100 a	100 a
UFV 080	100 a	94,9 a	98,8 a
Fungicida	100 a	100 a	100 a

Médias seguidas da mesma letra não se diferem ao teste de Tukey 5 %.

4.6. Identificação dos isolados

Os isolados UFV 080, UFV 025 e UFV 027 foram identificados como *Bacillus cereus*, uma espécie descrita em vários trabalhos como agente eficiente de biocontrole (Silva *et al.*, 2004; Halfeld-Vieira *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). O isolado UFV 070 foi identificado como *Bacillus sphaericus*, também relatado como agente de biocontrole de doenças (Bajoria *et al.*, 2008).

5. DISCUSSÃO

Os métodos de lavagem de folha e uso de ultra-som com posterior diluição possibilitaram o crescimento de colônias individualizadas de diferentes aspectos, as quais foram repicadas e armazenadas tanto em tubos contendo meio 523 inclinado como em solução salina (NaCl 0,85%), de modo a se manterem duas reservas distintas dos isolados.

A utilização dos dois métodos não ocasionou diferenças nas colônias obtidas, em conformidade com o trabalho de Halfeld-Vieira *et al.* (2004), onde para os dois métodos cresceram vários tipos colônias passíveis de serem repicadas isoladamente, quando diluídas. Para o método de isolamento de bactérias formadoras de endósporos ocorreu o crescimento de colônias muito semelhantes, tanto na cor como formato. Vários desses isolados foram identificados (dados não mostrados), e todos eles foram considerados como sendo pertencentes ao gênero *Bacillus*, o que não é surpreendente visto que esse gênero é capaz de formar endósporos. Portanto os métodos de isolamento foram adequados para os fins do presente trabalho

No teste de germinação em lâmina de vidro, todos os 217 isolados foram colocados para crescerem e apenas aqueles que atingiram sua fase exponencial de crescimento antes de 24 h foram usados contra urediniósporos de *H. vastatrix*, em conformidade com a recomendação de Romeiro (2007), de que um bom agente de biocontrole deve ter crescimento rápido. Outros organismos com crescimento mais lento poderiam ser selecionados e utilizados e também poderia ser encontrado potencial de biocontrole nos mesmos, porém o critério adotado durante os experimentos foi o de que um bom agente de biocontrole precisa crescer rápido para competir melhor com o patógeno em questão.

Para os próximos experimentos, os isolados utilizados foram selecionados (do experimento de germinação) pelo critério de crescimento rápido (citado anteriormente) em conjunto com sua capacidade em inibir a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* variando entre 89 e 100 %, em um total de 30 isolados selecionados. Adicionalmente três isolados, obtidos pelo método de seleção de endósporos, com capacidade em inibir a germinação com valores entre 58 e 69 %: UFV 068, UFV 070 e UFV 065, também foram selecionados. Embora esses três isolados tenham apresentado capacidade reduzida em inibir a germinação dos urediniósporos, eles constituem bactérias capazes de formar endósporos, possuindo, portanto, um mecanismo adicional de sobrevivência, o que é desejável para a dispensa no filoplano, o qual é um ambiente com sobrevivência dificultada (Romeiro, 2007).

Na realidade, todos os organismos isolados deveriam ser testados nas próximas fases da seleção, conforme recomendado por Romeiro (2007), pois embora não apresentem efeito direto sobre o patógeno, podem induzir resistência na planta, conforme relatado por Fabry *et al.* (2007). Esses autores relataram o biocontrole do nematóide *Meloidogyne javanica* em tomateiro por um isolado de *Rhizobium etli* que não apresentou efeito direto sobre o patógeno, mas sim sobre o hospedeiro, possivelmente ativando seus mecanismos de resistência de forma a inibir o desenvolvimento do nematóide. Entretanto, devido ao grande número de isolados obtidos (217), uma seleção inicial foi necessária para tornar os experimentos posteriores mais exequíveis e o critério utilizado foi a capacidade de inibir a germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix* e crescimento rápido.

No experimento de discos de folhas, nos períodos “24 horas antes” e “simultaneamente” à inoculação de *H. vastatrix*, todos os isolados apresentaram algum efeito deletério sobre a doença, o que não é surpreendente, visto que todos os organismos utilizados foram capazes de inibir a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* e nesses períodos foi possível apresentarem esse potencial. Quando dispensados 24 h depois da inoculação de *H. vastatrix*, alguns isolados como UFV 023 e UFV 028 apresentaram valores superiores aos das testemunhas inoculadas (TI), ou seja, aumentaram a severidade da doença. Efeito semelhante foi relatado por Shiomi *et al.* (2006) trabalhando com o mesmo patossistema. Dentre os isolados testados foram selecionados o UFV 025, UFV 080e UFV 033, por apresentarem suas médias não diferentes estatisticamente nos três momentos de aplicação sendo as mesmas as menores entre todos os isolados. Apesar de ter apresentado efeito menos significativo, o isolado UFV 070 foi selecionado por ser uma

bactéria formadora de endósporo. Sua média no momento “24 h depois” foi intermediária, porém diferindo-se das testemunhas inoculadas.

O teste de discos foi feito com folhas da variedade Mundo Novo e o teste de folhas destacadas com a variedade Catuaí. Para efeitos de experimentação provavelmente não seria o ideal a utilização de variedades diferentes em um processo de seleção, porém as folhas disponíveis para o momento do experimento em folhas destacadas eram apenas da variedade Catuaí. Mas podemos tomar uma outra visão pensando pelo lado de que os organismos foram testados em duas variedades diferentes e foram efetivos mesmo assim, como podemos observar nos resultados do experimento em folhas destacadas, e com resultados semelhantes ao experimento de discos de folhas. O isolado UFV 070 também foi o menos efetivo no controle da doença, porém em discos de folha houve diferença significativa quando o mesmo foi aplicado 24 h após a inoculação, já para folhas destacada não ocorreu diferença significativa nos momentos de aplicação. Essa diferença poderia estar relacionada ao uso de variedades diferentes ou relacionada à estatística envolvida nas análises. Os testes estatísticos também foram diferentes para os dois experimentos, talvez não encontrássemos diferenças significativas nos momentos de aplicação no teste de discos de folha para o isolado UFV 070, porém para esse experimento foi necessária a análise por Scott-Knott para que tivéssemos agrupamentos de isolados e a interpretação dos resultados fossem facilitadas.

Com o experimento em folhas destacadas pudemos confirmar que a seleção (até o momento) dos organismos foi efetiva possibilitando a montagem do experimento em casa de vegetação com organismos promissores no biocontrole de ferrugem do cafeeiro.

Nos resultados do experimento em casa-de-vegetação os isolados foram tão eficazes no controle da doença quanto o fungicida sistêmico epoxiconazol (Opus®), recomendado e registrado para a cultura do café. Haddad et al. (2009), comparando os isolados no campo, relataram que o isolado “B157” de *Bacillus* sp. reduziu a doença com o mesmo nível de controle do hidróxido de cobre, um fungicida protetor. Apesar de não ocorrer diferença entre os momentos de aplicação para os quatro isolados testados, é comum os resultados mais significativos se apresentarem quando as bactérias são depositadas no filoplano nos momentos que antecedem a inoculação de *H. vastatrix*, permitindo maior tempo e melhor adaptação do agente de biocontrole, e/ou ativação dos mecanismos de defesa da planta, conforme relatado por Shiomi *et al.* (2006), onde os isolados de bactérias endofíticas TF2-II, TF7-II, TG4-I, e TG11-II foram mais eficazes quando aplicados 72 h antes, 24 h antes e

simultaneamente à inoculação de *H. vastatrix* em mudas. Bettioli *et al.* (1994) também demonstram que um produto à base de *Bacillus subtilis* foi capaz de reduzir o número de folhas lesionadas em 60% e o número de lesões por folha em 100% quando aplicado 72 h antes e 24 h antes da inoculação do patógeno.

Apesar dos resultados promissores, os isolados estudados no presente trabalho necessitam ser testados para averiguação do seu real potencial em suprimir a ferrugem do cafeeiro em condições de campo. É necessária a confirmação de até qual ponto após a inoculação de *H. vastatrix* os isolados ainda são capazes de serem efetivos, qual o comportamento dos mesmos quando aplicados no campo sem condições controladas, e a época correta de aplicação.. Haddad *et al.*, (2009) relatam que, com uma taxa de infecção de 24%, a aplicação de antagonistas não foi suficiente para impedir o progresso da epidemia de ferrugem. Entretanto, quando a taxa de infecção foi em torno de 7,5%, um dos isolados promoveu o controle ao mesmo nível do hidróxido de cobre. Esses resultados sugerem uma estratégia de manejo baseada na época de aplicação do antagonista e também do fungicida. Também é necessário determinar os modos de ação dessas bactérias, a concentração a ser utilizada, compatibilidade com outros produtos utilizados na cultura, formulação e a interação dos antagonistas com outros agentes patogênicos.

6. CONCLUSÕES

- 217 bactérias foram isoladas do filoplano de cafeeiro
- Quatro Bactérias apresentaram valores próximos a 100 % de controle da ferrugem do cafeeiro em mudas em casa de vegetação, todas identificadas como sendo do gênero *Bacillus* , portanto formadoras de endósporos.
- Organismos residentes de filoplano podem ser selecionados e usados como potenciais agentes de biocontrole de doenças do cafeeiro, principalmente em sistemas de cultivo orgânico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abic. Associação Brasileira da Indústria de Café. História. Data de acesso: 25/09/2009. http://www.abic.com.br/scafe_historia.html#cafe_brasil. 2009
- Agrianual. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. 2009
- Bajoria, S., Varshney, A. K., Pareek, R. P., Mohan, M. K. e Ghosh, P. Screening and characterization of antifungal clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba*) rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology, v.18, n.2, p.139-156. 2008.
- Beattie, G. A. e Lindow, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. Phytopathology, v.89, n.5, p.353-359. 1999.
- Bettiol, W., Saito, M. L. e Brandão, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. Summa Phytopathologica, v.20, p.119-122. 1994.
- Blakeman, J. P. e Fokkema, N. J. Potential for Biological-Control of Plant-Diseases on the Phylloplane. Annual Review of Phytopathology, v.20, p.167-192. 1982.
- Brasil, Ministério, Da, Agricultura, E, Do e Abastecimento. Instrução Norminativa, 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 v. 63, n.5, p.2465-2476. 1999.
- Carvalho, V. L. e Chalfoun, S. M. Cercospora: doença do cafeeiro também chamada de "olho-pardo" ou "olho-de-pomba. Informe Tecnológico, v.26. 2001.
- Carvalho, V. L., Cunha, R. L. e Chalfoun., S. M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. Informe Agropecuário, v.23, p.101-114. 2002.

- Cristancho, A. M. A. Efecto protector de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en plantas de café contra el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berk. Y Br. Cenicafé (Colombia), v.46, p.140-151. 1995.
- Eskes, A. B. e Kushalappa, A. C. Natural enemies and biological control. Coffee rust: epidemiology, resistance and management. Florida; USA: Boca Raton, v.CRC Press Inc. 1989. 161 169 p.
- Fabry, C. F. S., Freitas, L. G., Godinho, M. T., Neves, W. S. e Ferraz, S. Resistência Sistêmica a *Meloidogyne javanica* Induzida por *Rhizobium etli* *. Nematologia Brasileira, p.5-9. 2007.
- Finley, N. e Fields., M. L. Heat activationand heat-inducet dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. Journal of Applied Microbiology, v.10, p.231-236. 1962.
- Garcia, E. G., Jimenez, E., Castro, O. e Mora, B. Variation of Chemical-Composition in Leaves of Coffea Sp (Rubiales, Rubiaceae) in Relation with Resistance to *Hemileia-Vastatrix* (Uredinales, Pucciniaceae). Revista De Biologia Tropical, v.41, n.2, Aug, p.209-214. 1993.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G. e Romeiro, R. S. Isolating and screening antagonists to *Hemileia vastatrix*. Phytopathology, v.94, n.6, Jun, p.S37-S37. 2004.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G. e Teixeira, H. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. Biological Control, v.49, n.2, May, p.114-119. 2009.
- Halfeld-Vieira, B. A., Romeiro, R. S. e Mizubuti, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole: scielo. 29: 638-643 p. 2004.
- Halfeld-Vieira, B. A., Vieira, J. R., Romeiro, R. D., Silva, H. S. A. e Baracat-Pereira, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v.41, n.8, Aug, p.1247-1252. 2006.
- Harman, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, v.84, n.4, April, 2000, p.377-393. 2000.
- Hennen, J. F. e Figueiredo, M. B. The life cycle of *Hemileia vastatrix*. Simpósio sobre Ferrugem do Cafeeiro. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Instituto de Investigação Científica Tropical: Oeiras, Portugal 1984.
- Kado, C. I. e Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology, v.60, p.969-976. 1970.

- Kijima, T., Yonai, S., Oohashi, K. e Amagai, M. Process for biologically preventing dicotyledoneous plant diseases using symbiotic bacteria. USA. 5.401.655(03-28-1995) 1995.
- Kim, G. H., Lim, M. T., Hur, J. S., Yum, K. J. e Koh, Y. J. Biological Control of Tea Anthracnose Using an Antagonistic Bacterium of *Bacillus subtilis* Isolated from Tea Leaves. Plant Pathology Journal, v.25, n.1, Mar, p.99-102. 2009.
- Leveau, J. Microbiology Life on Leaves. Nature, v.461, n.7265, Oct 8, p.741-741. 2009.
- Li, B., Xu, L. H., Lou, M. M., Li, F., Zhang, Y. D. e Xie, G. L. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against bacterial leaf spot of *Euphorbia pulcherrima*. Letters in Applied Microbiology, v.46, n.4, Apr, p.450-455. 2008.
- Lindow, S. E. e Leveau, J. H. Phyllosphere microbiology. Current Opinion in Biotechnology, v.13, n.3, p.238-243. 2002.
- Macagnan, D., Romeiro, R. S., Pomella, A. W. V., Silva, G. B. e Deuner, C. C. Detecção de compostos antifúngicos produzidos por bactérias residentes de filoplano de cacauero contra *Crinipellis pernicioso* em condições de laboratório. Fitopatologia Brasileira, v.26, p.386. 2001.
- Matiello, J. B., Santinato, R., Garcia, A. W. R., Almeida, S. R. e Fernandes, D. R. Diagnóstico da cafeeicultura In: Mapa/Procafé (Ed.). Cultura de Café no Brasil. Varginha, 2005. Diagnóstico da cafeeicultura
- Mendes, A. N. G. e Guimarães, R. J. Resumo - Botânica do Café. Lavras. 2007. (Material didático da disciplina Cafeicultura I)
- Ohtaka, N., Kawamata, H. e Narisawa, K. Suppression of rice blast using freeze-killed mycelia of biocontrol fungal candidate MKP5111B. Journal of General Plant Pathology, v.74, n.2, Apr, p.101-108. 2008.
- Pereira, A. C. e Guimarães, P. T. G. Cafés especiais: iniciativas brasileiras e tendências de consumo. Belo Horizonte. 2004. 80 p. (Eпамig (Série documentos, 41))
- Romeiro, R. S. Controle biológico de plantas: fundamentos. Viçosa: UFV. 2007. 269 p.
- Roveratti, D. S., Teixeira, A. R. R. e Moraes, W. B. C. *Bacillus thuringiensis* a new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. Journal of Phytopathology, v.126, p.149-159. 1989.
- Shiomi, H. F., Silva, H. S. A., De Melo, I. S., Nunes, F. V. e Bettiol, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. Scientia Agricola, v.63, n.1, Jan-Feb, p.32-39. 2006.
- Silva, H. S. A., Deuner, C. C. e Romeiro, R. S. Crescimento de tomateiro avaliado após aplicação de rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Summa Phytopathologica, v.30, n.2, p.281-283. 2004.

Tratch, R. e Bettioli, W. Effect of biofertilizers on micelial growth and spores germination of plant pathogenic fungi. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v.32, n.11, Nov, p.1131-1139. 1997.

Vale, F. X. R., Fernandes Filho, E. I. e Liberato, J. I. R. QUANT - A software for plant disease severity assessment. Christchurch, New Zealand 2003.

Zambolim, L., Vale, F. X. R., Pereira, A. A. e Chaves, G. M. Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Visconde do Rio Branco. In: L. F. X. Z. Ribeiro Do Vale (Ed.). Café (Coffea arabica L.), controle de doenças Suprema Gráfica e Editora., v.1, 1997. Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Visconde do Rio Branco, p.83-140

Zambolim, L., Vale, F. X. R. e Zambolim, E. M. Doenças do cafeeiro (Coffea arabica e C. canephora). São Paulo: Agronômica Ceres, v.2. 2005. 165-180 p. (Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.)