

CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM (*HEMILEIA VASTATRIX*) DO CAFEIEIRO COM *BACILLUS SUBTILIS* EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

W. BETTIOL^{1**} & V.M.P. VARZEA²

¹EMBRAPA/CNPDA; C. Postal 69, 13820 - Jaguariúna, SP. ²Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro, Estação Agronômica Nacional. Quinta do Marquês, 2.780 Oeiras, Portugal.

(Aceito para publicação em 17/02/92)

RESUMO

BETTIOL, W. & VARZEA, V.M.P. Controle Biológico da Ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. Fitopatol. bras. 17:91-95. 1992.

Suspensões de células dos isolados AP-3 e AP-150 de *Bacillus subtilis* inibiram totalmente a germinação dos uredíniosporos das raças I, II, XXV, XXIX e XXXI de *Hemileia vastatrix* quando a concentração de *Bacillus* foi superior a 5×10^7 cel/ml. Em concentrações inferiores houve redução na inibição mas os tubos germinativos dos uredíniosporos considerados germinados mostravam-se deformados.

B. subtilis quando pulverizado 24 horas antes da inoculação dos uredíniosporos de *H. vastatrix* foi efetivo em controlar a infecção em discos de folhas.

A pulverização de suspensão esterilizada de células dos isolados AP-3 e AP-150 de *B. subtilis* em folhas destacadas de cafeeiro da variedade caturra, nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ e $4,3 \times 10^8$ cel/ml, reduziu o número de lesões em 62 e 72%, respectivamente; enquanto a não esterilizada, nas mesmas concentrações, em 87 e 73%. Quando pulverizadas em mudas com 8 pares de folhas a redução no número de lesões, para os isolados AP-3 e AP-150 aplicados em suspensão esterilizada, foi de 67 e 59%, respectivamente; enquanto a não esterilizada em 89 e 63%, respectivamente.

Palavras chave: cafeeiro, ferrugem, controle biológico, *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Biological control of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) by *Bacillus subtilis* under controlled conditions.

Cell suspensions of the isolates AP-3 and AP-150 of *Bacillus subtilis* at concentrations higher than 5×10^7 cells/ml totally inhibited urediniospore germination of races I, II, XXV, XXIX and XXXI of *Hemileia vastatrix*. Inhibition of more than 70% was achieved with a *Bacillus* concentration of 5×10^6 cells/ml, and the germinated urediniospore had high levels of deformation.

Spraying of sterilized and unsterilized cell suspensions on coffee cv. caturra leaves, of isolates AP-3 and AP-150 at concentrations of 2.2×10^8 and 4.3×10^8 cells/ml, respectively, reduced the number of lesions up to 87 and 73, 62 and 72%. When these isolates were sprayed on young plants, the inhibition of *H. vastatrix* lesion development was of 89, 67, 63 and 59%, respectively.

INTRODUÇÃO

A ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro encontra-se disseminada na maioria das regiões cafeeiras do mundo e a produção pode sofrer quebras de 20 a 30% devido à incidência da doença (Matiello *et al.*, 1985). O controle vem sendo realizado satisfatoriamente com fungicidas cúpricos ou sistêmicos como triadimefon, triadimenol, propiconazole e

pirocarbolido (Matiello *et al.*, 1985). Os fungicidas sistêmicos podem selecionar linhagens resistentes do patógeno. Os programas de pulverização com produtos a base de cobre, apesar do efetivo controle da doença, tem colaborado com a explosão, a nível de campo, do bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*), do ácaro (*Oligonychus ilicis*) e aumento da "coffee berry disease" (CBD) (*Colletotrichum coffeanum*), além de seu acúmulo nos solos (Fulton, 1984).

Assim, há necessidade de considerar outras possibilidades para controle da ferrugem como a resistência de

* Trabalho financiado pela USAID

** Bolsista do CNPq

plantas (Bergamin Filho, 1976; Eskes, 1983), a indução de resistência (Moraes *et al.*, 1976; Martins *et al.*, 1985, 1986; Guzzo *et al.*, 1987; Roveratti *et al.*, 1987) e o controle biológico (Bettiol *et al.*, 1989).

Bacillus subtilis é excelente produtor de antibióticos e tem se mostrado promissor para controle de algumas ferrugens como *Uromyces phaseoli* (Baker *et al.*, 1983; Baker *et al.*, 1985; Centurion, 1990); *Puccinia pelargonii-zonalis* (Rytter *et al.*, 1989); *Hemileia vastatrix* (Martins *et al.*, 1985).

O presente trabalho teve por objetivos, avaliar o efeito de *B. subtilis* na germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix* e na infecção de discos de folhas por *H. vastatrix*; e avaliar a eficiência desse microrganismo no controle da ferrugem em folhas destacadas e mudas de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Efeito de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*.

Gotas de suspensões de células dos isolados AP-3 (originário de folhas de eucalipto, AP-85, AP-150 e AP-203 (originários de folhas de arroz) de *B. subtilis*, com 10^7 céls/ml, foram colocadas sobre lâminas de vidro. Adicionou-se determinada quantidade de uredíniosporos de *H. vastatrix* e após 6 horas de incubação a 25°C , em câmara úmida, no escuro foi efetuada a avaliação através da contagem dos uredíniosporos germinados.

2. Efeito de *B. subtilis* sobre a infecção de *H. vastatrix* em discos de folha.

Sobre discos de 1 cm de diâmetro de folhas de cafeeiro da variedade Mundo Novo, mantidas em câmara úmida, foram pulverizadas suspensões de 10^7 céls/ml dos isolados AP-3, AP-85, AP-150 e AP-203 de *B. subtilis*, 24 horas antes e após a inoculação de *H. vastatrix*, na concentração de 1 mg de uredíniosporos/ml de água. Aos 34 dias de incubação a $\pm 24^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, determinou-se o número de discos lesionados, conforme técnica descrita por Eskes (1982).

3. Efeito de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de diversas raças de *H. vastatrix*.

Avaliou-se o efeito de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos das raças I, II, XXV, XXXI e XXIX de *H. vastatrix*. Os isolados testados foram AP-3 e AP-150 nas concentrações de $2,1 \times 10^6$ e $2,9 \times 10^6$ céls/ml, respectivamente. Utilizou-se a metodologia experimental descrita no item 1. Posteriormente, o experimento foi repetido nas concentrações de $5,4 \times 10^6$; $5,4 \times 10^7$ e $5,4 \times 10^8$ céls/ml dos isolados AP-3 e AP-150 sobre a raça XXXI.

4. Controle da ferrugem do cafeeiro com *B. subtilis* em folhas destacadas e mudas.

Folhas jovens de cafeeiro da variedade caturra foram acondicionadas em caixas de alumínio tampadas com vidro, sobre espuma enxarcada com água no fundo e nos lados. Em cada caixa foram colocadas 7 folhas que quase flutuavam na espuma superumedecida. Cada tratamento foi composto de 3 repetições, sendo constituída por uma caixa. Setenta e duas horas antes da inoculação do patógeno, pulverizaram-se suspensões de *B. subtilis* isolados AP-3 e AP-150, esterilizadas e não esterilizadas, nas concentrações de $4,3 \times 10^6$ e $2,2 \times 10^6$ céls/ml, respectivamente. As inoculações do patógeno foram feitas com a raça III, na concentração de 1 mg de uredíniosporos/1,5 ml de água. A incubação deu-se a 24°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas da pulverização com *B. subtilis*, as caixas foram transferidas para

sala com ar condicionado onde ficaram destampadas por 2 horas para secagem das gotículas na superfície. Em seguida voltaram para a incubadora prosseguindo-se a incubação por mais 22 horas.

Transcorrido esse período, procedeu-se a incubação a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas.

Para o estudo de controle da ferrugem em mudas, foram utilizadas mudas de cafeeiro da variedade caturra com 4 pares de folhas jovens. O delineamento foi inteiramente casualizado com 8 repetições, cada uma com 1 planta. A metodologia de inoculação da ferrugem e de *B. subtilis* foi semelhante à usada para folhas. Após permanência em câmara úmida e escura por 48 horas, as mudas foram transferidas para casa de vegetação a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, sendo avaliado o número de lesões por folha e os períodos de incubação e latente.

RESULTADOS

1. Efeito de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*.

Os isolados AP-3, AP-85, AP-150 e AP-203 inibiram a germinação dos uredíniosporos de *H. vastatrix* em 85,3; 93,6; 93,0 e 64,9%, respectivamente. A média de germinação dos uredíniosporos estava em torno de 15,7%.

2. Efeito de *B. subtilis* sobre a infecção de *H. vastatrix* em discos de folha.

O controle da infecção da ferrugem foi efetivo quando *B. subtilis* foi pulverizado 24 horas antes da inoculação dos uredíniosporos de *H. vastatrix*. Os isolados AP-150 e AP-203 apresentaram comportamento superior aos AP-3 e AP-85. A pulverização dos antagonistas, 24 horas após a inoculação do patógeno, não apresentou controle, exceto o isolado AP-203 (Figura 1).

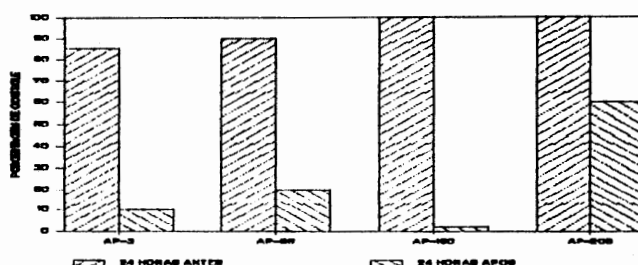


Fig. 1 - Porcentagem de controle da ferrugem do cafeeiro com *Bacillus subtilis* aplicado 24 horas antes e após a inoculação de *Hemileia vastatrix*.

3. Efeito de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de diversas raças de *H. vastatrix*.

As concentrações mais elevadas de *B. subtilis* inibiram totalmente a germinação dos uredíniosporos das raças testadas de *H. vastatrix* (Tabela 1). Ressalta-se que nas concentrações mais baixas, onde se observou uredíniosporos germinados (Tabela 1), os tubos germinativos exibiam deformações aberrantes.

4. Controle da ferrugem do cafeeiro com *B. subtilis* em folhas destacadas e mudas.

Tanto em folhas destacadas quanto em mudas, verificou-se que *B. subtilis* reduziu o número de lesões por folha (Tabelas 2 e 3). Observou-se que a suspensão não esterilizada do antagonista foi mais eficiente que a esterilizada (Tabelas 2 e 3). O isolado AP-3 com suspensão de células não

TABELA 1 – Porcentagem de inibição de germinação por *Bacillus subtilis* em uredíniosporos das raças II, I, XXV, XXXI e XXIX de *Hemileia vastatrix* portadoras de diferentes genes de virulência (V).

Isolado de <i>B. subtilis</i>	concentração (Céls/ml)	raça e genótipo de virulência				
		II V5	I V2V5	XXV V2V5V6	XXXI V2V5V6V9	XXIX V5V6V7V8V9
AP-3	2,1x10 ⁸	100*	100	100	100	100
	5,4x10 ⁸				100	
	5,4x10 ⁷				95,7**	
	5,4x10 ⁶				20,7**	
AP-150	2,9x10 ⁸	100	100	100	100	100
	5,7x10 ⁸				100	
	5,7x10 ⁷				98,2**	
	5,7x10 ⁶				70,6**	
germinação em água destilada		15,7%	13,7%	15,5%	70,5%	50,3%

* Média de 20 repetições.

** Tubos germinativos deformados.

TABELA 2 – Efeito de *Bacillus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (raça III de *Hemileia vastatrix*) em folhas destacadas da variedade catuaçu.

Tratamento	Concentração de células (céls/ml)	Número de lesões p/folhas	Inibição (%) ¹	Período de incubação (dias) ²	Período latente (dias) ³
Testemunha		1524 ^a	0	13	27
Suspensão de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-150	4,3x10 ⁸	415b	73	13	26
Suspensão esterilizada de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-150	4,3x10 ⁸	425b	72	13	26
Suspensão de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-3	2,2x10 ⁸	200c	87	13	29
Suspensão esterilizada de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-3	2,2x10 ⁸	585b	62	13	28

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x}$.

nº de lesões da test. – nº lesões do tratam.

1. % de inib. = $\frac{\text{nº de lesões da test.} - \text{nº lesões do tratam.}}{\text{nº de lesões da testemunha.}} \times 100$

2. Período compreendido entre a inoculação e o aparecimento de sintomas macroscopicamente visíveis.

3. Período compreendido entre a inoculação e o aparecimento de 50% das lesões esporuladas.

4. Média de 21 leituras.

esterilizada apresentou comportamento superior ao AP-150 (Tabelas 2 e 3).

No ensaio com mudas os tratamentos com suspensões não esterilizadas do antagonista apresentaram o período latente superior aos dos tratamentos com suspensões esterilizadas (Tabela 3).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A inibição da germinação de esporos constatada deve estar relacionada a produção de antibióticos por *B. subtilis* uma vez que Katz & Damain (1977) relataram a produção de 66 antibióticos por isolados deste antagonista.

TABELA 3 – Efeito de *Bacillus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (raça III de *Hemileia vastatrix*) em mudas da variedade catarra.

Tratamento	Concentração de células (célts/ml)	Número de lesões p/folha	Inibição (%) ¹	Período de incubação (dias) ²	Período latente (dias) ³
Testemunha		1352 ^a	0	14	29
Suspensão de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-150	4,3x10 ⁸	495b	63,4	14	33
Suspensão esterilizada de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-150	4,3x10 ⁸	557b	58,8	14	28
Suspensão de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-3	2,2x10 ⁸	146c	89,2	14	31
Suspensão esterilizada de <i>B. subtilis</i> – isolado AP-3	2,2x10 ⁸	450b	66,7	14	28

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x}$.

nº de lesões da test. – nº lesões do tratam.

1. % de inib. = $\frac{\text{nº de lesões da test.} - \text{nº lesões do tratam.}}{\text{nº de lesões da testemunha.}} \times 100$

nº de lesões da testemunha.

2. Período compreendido entre a inoculação e o aparecimento de sintomas macroscopicamente visíveis.

3. Período compreendido entre a inoculação e o aparecimento de 50% das lesões com esporos.

4. Média de 16 leituras.

Como neste trabalho, Baker *et al.*, (1983) e Bettiol *et al.*, (1988) também encontraram maior efetividade de *B. subtilis* quando aplicado 24 horas antes da inoculação de *Uromyces phaseoli* e *Cylindrocladium scoparium*. Uma das possíveis explicações é que *B. subtilis* e/ou seus metabólitos podem agir sobre a germinação de esporos e/ou no desenvolvimento de tubos germinativos. Outra explicação seria a atuação de *B. subtilis* induzindo a resistência do hospedeiro (Martins *et al.*, 1985).

É interessante observar que sempre as suspensões não esterilizadas de células de *B. subtilis* apresentaram melhor controle da ferrugem, demonstrando que as células viáveis são mais ativas para o controle (Tabelas 2 e 3). Teve-se alguma evidência do mecanismo de ação de indução de resistência no hospedeiro quando se observaram maiores períodos latentes relacionados com a aplicação de células vivas do antagonista (Tabelas 2 e 3).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Carlos J. Rodrigues Júnior do CIFC/Portugal pelas sugestões na realização dos trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, C.J., STAVELY, J.R., THOMAS, C.A., SASSER, M. & MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and as development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathol.* 73(8):1148-1152. 1983.
- BAKER, C.J., STAVELY, J.R. & MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Dis.* 69:770-772. 1985.
- BERGAMIN FILHO, A. Possibilidades do emprego da resistência vertical no melhoramento do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. *Summa Phytopathol.* 2:103-108. 1976.
- BETTIOL, W., AUER, C.G., CAMARGO, L.E.A. & KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium* com *Bacillus* sp. *Summa Phytopathol.* 14(3/4):210-218. 1988.
- BETTIOL, W., GALVÃO, J.A.H., GHINI, R. & MENDES, M.D.L. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). *Summa Phytopathol.* 15(1):43. 1989. (Res.)
- CENTURION, M.A.P.C. Seleção de microrganismos antagonísticos à ferrugem (*Uromyces phaseoli* (Reven) Wint.) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese de Doutorado, Piracicaba, ESALQ/USP, 1990. 116p.
- ESKES, A.B. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Wageningen: Landbouwhogeschool te Wageningen, 1983. 140p. (PhD thesis Diss.)
- FULTON, R.H. Chemical control of coffee leaf rust in Central America. In: Fulton R.H. *Coffee Rust in the Americas*. APS., 1984. p.75-83.
- GUZZO, S.D., MARTINS, E.M.F. & MORAES, W.B.C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I – partial purification of the extracellular

- inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. *Fitopatol. bras.* 12(4):377-385. 1987.
- KATZ, E. & DEMAINE, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41(2):449-474. 1977.
- MARTINS, E.M.F., BERETTA, M.J.G., ROVERATTI, D.S. & MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. *Fitopatol. bras.* 10(3):521-529. 1985.
- MARTINS, G.M.F., DE MARIA, A.C., GRUNWALDT-STOECKER, G. & MORAES, W.B.C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. *Fitopatol. bras.* 11(4):891-898. 1986.
- MATIELLO, J.B. *et al.* In: *Cultura de café no Brasil: Manual de recomendações*. Sed. (S.L.):IBC-GERCA, 1985. 580p.
- MORAES, W.B.C., MARTINS, E.M.F., MUSUMECI, M.R. & BERETTA, M.J.G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. *Suma Phytopathol.* 2:39-43. 1976.
- ROVERATTI, D.S., TEIXEIRA, A.R.R. & MORAES, W.B.C. Controle alternativo da ferrugem do cafeeiro pela utilização de produtos comerciais a base de *Bacillus thuringiensis*. *Fitopatol. bras.* 12(2):137. 1987. (Res.).
- RYTTER, J.L., LUKEZIC, F.L., CRAIG, R. & MOORMAN, G.W. Biological control of *Geranium rust* by *Bacillus subtilis*. *Phytopathol.* 79(3):367-370. 1989.
-