

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

Efeito de bacterias endofiticas
2004 TS-PP-2004.00499



CNPMA-5054-1

**EFEITO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO CAFEEIRO NO
CONTROLE DA FERRUGEM**

HUMBERTO FRANCO SHIOMI

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas - Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia - Área de Concentração em
Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Fevereiro - 2004

2004.00499

2004.00499

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO CAFEEIRO NO
CONTROLE DA FERRUGEM**

HUMBERTO FRANCO SHIOMI

ORIENTADOR: DR. WAGNER BETTIOL

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas - Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia - Área de Concentração em
Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Fevereiro - 2004



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Shiomi, Humberto Franco, 1970-
S556e Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro no controle
da ferrugem / Humberto Franco Shiomi. -- Botucatu, [s.n.],
2004.

iv, 58 f. : il. color., tabs.

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

Orientador: Wagner Bettiol.

Inclui bibliografia.

1. Microorganismos. 2. Sistemas de controle biológico.
3. Hemileia vastatrix. 4. Bacillus (Bactéria).
I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu).
Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

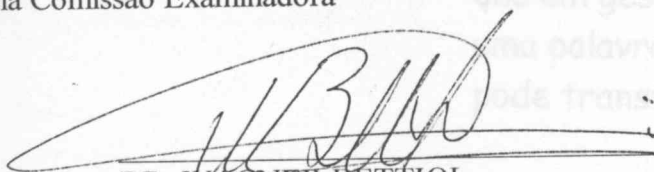
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

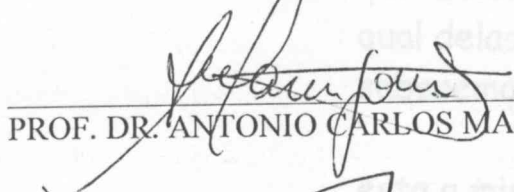
TÍTULO: "EFEITO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO CAFEEIRO NO CONTROLE DA FERRUGEM"

ALUNA: HUMBERTO FRANCO SHIOMI

ORIENTADOR: DR. WAGNER BETTIOL

Aprovado pela Comissão Examinadora


DR. WAGNER BETTIOL


PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI


DR. ITAMAR SOARES DE MELO

Data da Realização: 02 de fevereiro de 2004.

Poema para ser transfigurado

Chacal

quem somos
o que queremos
logo logo saberemos

por enquanto
sabemos
que um gesto
uma palavra
pode transformar o mundo

qual deles
qual delas
saberemos já já

esta a missão do artista:
experimental

por isso somos querido
por isso somos preciso
por dar nossas vidas
pelo que - ainda - não é
pelo que - quem sabe - será

o que somos
o que queremos
saberemos juntos
já já

OFEREÇO

À minha esposa Alessandra,

Por todo o amor, por todo o apoio e pelo exemplo de bondade,
correção e dedicação!

Amor, respeito, generosidade, compaixão,
Virgínia, Flor, Filizola, Luan e
Fris, pela alegria e pelos
momentos

Meu desejo é que a vida seja sempre
mais feliz e mais plena para todos os
momentos e pessoas

DEDICO

À minha mãe, Vanda, pelo amor, dedicação, incentivo e apoio durante toda a minha vida.

Às minhas irmãs Vânia, Valéria e Vanessa, pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.

Aos meus sogros Kiosi e Izaura, tia Cida, meus cunhados Adriana e Denny, Andréa e Davi, Toninho, Alex e Bill, pelo carinho e amizade, sempre incentivando e torcendo para tudo dar certo.

Aos meus sobrinhos Giovanna, Virgínia, Yuri, Nicole, Irina e Éric, pela alegria e bons momentos.

Ao amigo e ex-chefe Prof. Dr. Mário Motidome, pelo exemplo de idealismo e correção.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 – A cultura cafeeira	7
2.2 – A ferrugem do cafeeiro	8
2.3 – Microrganismos endofíticos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 – Preparo de mudas de café	19
3.2 – Coleta de folhas infectadas e processamento de uredíniosporos	19
3.3 – Preparo e padronização da suspensão de bactérias endofíticas e de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i>	20
3.4 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. I. Testes de germinação de uredíniosporos	20
3.5 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. II. Testes em discos de folhas	22
3.6 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. III. Testes em folhas destacadas	24
3.7 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. IV. Testes em mudas de cafeeiro	25
3.8 – Identificação de bactérias endofíticas.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 – Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a germinação de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i>	28

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	Página iii
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 – A cultura cafeeira	7
2.2 – A ferrugem do cafeeiro	8
2.3 – Microrganismos endofíticos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 – Preparo de mudas de café	19
3.2 – Coleta de folhas infectadas e processamento de uredíniosporos	19
3.3 – Preparo e padronização da suspensão de bactérias endofíticas e de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i>	20
3.4 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. I. Testes de germinação de uredíniosporos	20
3.5 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. II. Testes em discos de folhas	22
3.6 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. III. Testes em folhas destacadas	24
3.7 – Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. IV. Testes em mudas de cafeeiro	25
3.8 – Identificação de bactérias endofíticas	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 – Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a germinação de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i>	28

4.2 – Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em discos de folha da cv. Mundo Novo	32
4.3 – Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em folhas destacadas da cv. Mundo Novo	37
4.4 – Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em mudas da cv. Mundo Novo	41
4.5 – Identificação de bactérias endofíticas.....	44
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Origem dos isolados de bactérias endofíticas estudados	18
2. Porcentagem de germinação de uredíniosporos de <i>Hemileia vastatrix</i> , submetidos a suspensões de isolados de bactérias endofíticas	31
3. Porcentagem de área lesionada pela ferrugem, em discos de folha de cafeeiro da cv. Mundo Novo, submetidas a suspensões de isolados de bactérias endofíticas, aplicadas 72 horas antes e após, 24 horas antes e após e concomitantemente à inoculação de da suspensão de uredíniosporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	35
4. Número de lesões de ferrugem por folha destacada de cafeeiro cv. Mundo Novo, submetida a suspensões de isolados de bactérias endofíticas, aplicadas 72 horas antes e após, 24 horas antes e após e concomitantemente à inoculação de da suspensão de uredíniosporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	40
5. Número de lesões de ferrugem por folha em plantas de cafeeiro cv. Mundo Novo, submetida a suspensões de isolados de bactérias endofíticas, aplicadas 72 horas antes e após, 24 horas antes e após e concomitantemente à inoculação de da suspensão de uredíniosporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	43
6. Isolados de bactérias endofíticas do cafeeiro identificadas.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema para realização do teste de germinação de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i> ...	21
2. Esquema para realização do teste em discos de folhas de cafeeiro.....	23
3. Inoculação de bactérias endofíticas sobre discos de folhas de cafeeiro da cv. Mundo Novo	23
4. Esquema para realização do teste em folhas destacadas de cafeeiro.....	25
5. Germinação de uredíniosporos de <i>H. vastatrix</i> em lâminas de vidro, na presença de água (a), propiconazole (b) e bactérias endofíticas (c).....	30
6. Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em folhas destacadas da cv. Mundo Novo	39

EFEITO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO CAFEEIRO NO CONTROLE DA FERRUGEM.

Botucatu, 2004. Dissertação (mestrado em agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: HUMBERTO FRANCO SHIOMI

Orientador: WAGNER BETTIOL

RESUMO

Experimentos sob condições controladas e testes de campo com bactérias endofíticas isoladas de folhas e caules de *Coffea arabica* e *Coffea robusta*, provenientes das cidades de Pedreira-SP, Mococa-SP e Pindorama-SP, foram realizados com o objetivo de avaliar a inibição da germinação de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*, raça II e o controle do desenvolvimento da ferrugem alaranjada do cafeeiro, em testes em discos de folhas, folhas destacadas e em plantas da cv. Mundo Novo, pela aplicação de suspensões de bactérias endofíticas 72 e 24 horas antes e após à inoculação de *H. vastatrix* e concomitantemente à inoculação com o patógeno. Isolados de bactérias endofíticas testados demonstraram eficácia na inibição da germinação de uredíniosporos e/ou no desenvolvimento da ferrugem, com valores acima de 50%, embora os resultados obtidos nos testes de germinação de uredíniosporos tenham sido inferiores ao tratamento com o propiconazole. Nos testes em discos de folhas, folhas destacadas e em plantas de cafeeiro, os isolados endofíticos T G4-Ia, T F2-IIc, T F7-Ib e T F9-Ia, demonstraram melhor controle da ferrugem do cafeeiro. Os

isolados endofíticos T G4-Ia e T F9-Ia foram identificados como *Bacillus lentimorbus* e *Bacillus cereus*, respectivamente. Os resultados indicam a ocorrência de isolados endofíticos eficientes em controlar a ferrugem alaranjada do cafeeiro. Alguns isolados de bactérias endofíticas podem aumentar a severidade da doença.

Palavras chave: controle biológico de doenças, *Hemileia vastatrix*, microrganismos endofíticos.

EFFECT OF ENDOPHYTIC BACTERIA ON CONTROL OF COFFEE LEAF RUST.

Botucatu, 2004. Dissertation (Master's Degree in Agronomy/ Plant Protection) –

Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: HUMBERTO FRANCO SHIOMI

Adviser: WAGNER BETTIOL

SUMMARY

Experiments under controlled conditions and field tests with endophytic bacteria from leaves and stem of *Coffea arabica* and *Coffea robusta* plants from Pedreira-SP, Mococa-SP and Pindorama-SP, were carried out with the objective to evaluate the inhibition of germination of urediniospores of *Hemileia vastatrix*, race II and control the development of coffee leaf rust cv. Mundo Novo leaf disk, detached-leaf and coffee plants, by dropping of bacterial suspensions 72 e 24 hours prior and after the *H. Vastatrix* and also concomitant the application of the pathogen. Endophytes tested demonstrated inhibition efficacy of urediniospores germination and/or the development of leaf rust over 50%, although the results obtained in urediniospores germination was below of propiconazole treatment. In leaf disk and detached-leaf inoculations, the endophytes strains T G4-Ia, T F2-IIc, T F7-Ib and T F9-Ia demonstrated better control of coffee leaf rust disease. The endophytic strains T G4-Ia and T F9-Ia was identified as *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus cereus*.

The results indicates the occurrence of efficient endophytes controlling the coffee leaf rust. Some endophytes can partially improve the severity of coffee leaf rust.

Keywords: biological control, *Hemileia vastatrix*, endophytic bacteria



Figure 1. Percentage of endophytic bacteria isolated from rice leaves over time (0 to 120 days) for three treatments: Control, Fungicide, and Bacterial. The Control treatment shows a steady increase in the percentage of endophytic bacteria, reaching approximately 80% by day 120. The Fungicide treatment shows a steady decrease, reaching approximately 20% by day 120. The Bacterial treatment shows a steady increase, reaching approximately 60% by day 120. Error bars represent standard deviation.

Endophytic bacteria are those that live inside the plant tissue without causing any harm to the plant. They can be found in various parts of the plant, including the roots, stems, and leaves. Endophytic bacteria can provide a variety of benefits to the plant, including protection against pathogens, promotion of growth, and improvement of nutrient uptake. In this study, we investigated the effect of endophytic bacteria on rice plants infected with *Hemileia vastatrix*. We found that endophytic bacteria can reduce the severity of the infection and improve the growth of the plant. This suggests that endophytic bacteria could be used as a biological control agent for *Hemileia vastatrix*.

1. INTRODUÇÃO

O café ocupa uma posição de destaque no cenário mundial como produto agrícola de grande importância comercial e no qual se baseia a economia de muitos países. O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café, contribuindo para o aumento das divisas líquidas do país.

Entretanto, o café vem perdendo gradativamente sua importância como produto comercial nas exportações brasileiras, tendo representado 70% na década de 20, passando a 50% em 1960 e atualmente tem ficado em torno de 5%. A taxa de crescimento nesta década ficou na ordem de 0,2%, indicando uma estagnação no consumo (ORMOND et al., 1999).

Inúmeros são os fatores que afetam a produtividade da cultura do café.

Dentre as principais doenças que acometem o cafeeiro, a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., é a mais importante e tem sido controlada principalmente por meio de fungicidas e variedades resistentes.

A necessidade de racionalização do uso de agrotóxicos, os casos de resistência dos fungos fitopatogênicos aos fungicidas e os crescentes custos dos insumos, associados à queda real do preço dos produtos pagos aos produtores, tornaram-se fatores de grande importância para que o controle biológico passasse a ser mais estudado e visto como uma arma valiosa a ser utilizada na adoção de um padrão tecnológico menos impactante ao ambiente.

Devido ao acúmulo de informações a respeito das interações dos microrganismos endofíticos com as plantas hospedeiras, tanto produzindo substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al., 1997) ou promotoras de crescimento aos hospedeiros (HALLMANN et al., 1997; BENT; CHANWAY, 1998), como no controle de pragas (FAETH; HAMMON, 1997; AZEVEDO et al., 2000), os microrganismos endofíticos tem sido objeto de interesse crescente como ferramentas de controle biológico de pragas e doenças de plantas nos diferentes agroecossistemas.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de isolados de bactérias endofíticas, obtidos de diferentes partes do cafeeiro, sobre a germinação de uredíniosporos e sobre o desenvolvimento de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem, em testes avaliados em discos de folhas, em folhas destacadas e em plantas de cafeeiro da cv. Mundo Novo e estudar a sua influência sobre alguns componentes epidemiológicos da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura cafeeira

O gênero *Coffea* spp., da família Rubiácea, compreende provavelmente mais de 70 espécies, sendo em sua maioria árvores e arbustos que se encontram nas regiões baixas dos bosques tropicais chuvosos. Porém, somente as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre & Froehner são utilizadas atualmente em grande escala para a produção de café, sendo que o maior volume produzido é representado pelo café arábico (BECKER-RATERINK, 1991).

Segundo o USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), a produção mundial de café no ano de 2000 ficou ao redor de 115 milhões de sacas, das quais o

Brasil participou com 31,1 milhões de sacas, sendo que o Estado de São Paulo foi o segundo maior produtor, ficando atrás de Minas Gerais (AGRIANUAL, 2001). A espécie *Coffea arabica*, originária da Etiópia, tem a maior participação no total produzido, seguida pelo café robusta/conilon (*Coffea canephora*). Outras espécies tem importância regional, ou interesse em programas de melhoramento genético ou mesmo devido ao seu conteúdo quase nulo de cafeína (BECKER-RATERINK et al., 1991).

Estima-se que no Brasil tenham sido plantados, entre 1994 e 1998, mais de 4 bilhões de plantas (70 a 100 mil hectares). Além do aumento de área plantada, houve melhora no manejo dos cafezais existentes. Em 1997, a produção brasileira foi de 19 milhões de sacas, com um crescimento de 61% em 2000, quando a produção de café esteve na ordem de 31,1 milhões de sacas (AGRIANUAL, 2001).

Além da expectativa de crescimento de produção nos cafezais brasileiros, devido à contribuição dos cafezais plantados recentemente e à melhora nos tratamentos culturais, a partir de 1997, teve início uma fase descendente nos preços alcançados pelo café e que perdura até hoje, na qual a rentabilidade anual do negócio, medido pela taxa interna de retorno (TIR), que era de 19,8%, passou para 12,9% (AGRIANUAL 2001).

Dessa forma, torna-se cada vez mais importante pensar não somente no incremento da produtividade na cultura e redução dos custos de produção, mas também na busca constante da qualidade, em resposta à demanda da sociedade por produtos cada vez menos agressivos às pessoas, ao ambiente e que promovam justiça social.

2.2. A ferrugem do cafeeiro

No Brasil, a ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., foi constatada pela primeira vez no estado da Bahia em 1970 e ocorre em todas as regiões do mundo onde a cultura é explorada. Em países como o Sri Lanka, Índia e Java a doença causou sérios problemas epidemiológicos. No Brasil, as perdas podem reduzir, em média, 35% a 40% da produção (RIBEIRO DO VALE; ZAMBOLIM, 1996). Diversos pesquisadores salientaram a importância do conhecimento dos fatores biológicos e climáticos que governam o desenvolvimento da ferrugem, como base para um controle mais efetivo (MIGUEL et al., 1975; TERRONES, 1984), citados por Talamini (1999).

O patógeno infecta as folhas do cafeeiro, causando manchas cloróticas e translúcidas, com um a três milímetros de diâmetro. Na face inferior, desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjadas, formadas pelos uredíniosporos do fungo. Como consequência, ocorre desfolha prematura, redução da área fotossinteticamente ativa e morte dos ramos laterais, afetando o florescimento, o pegamento dos frutos e a produção do ano seguinte (CHALFOUN; ZAMBOLIM, 1985; GODOY et al., 1997).

Dentre as condições ambientais ideais para o desenvolvimento da doença, destacam-se temperaturas na faixa de 20°C a 24°C, com presença de água para a germinação dos esporos, chuvas frequentes e sombreamento, espaçamentos mais fechados, adubação e tratamentos culturais inadequados (MATIELLO, 1991). A carga pendente é de suma importância no controle da ferrugem. A maior incidência é relacionada às lavouras com alta carga pendente (SILVA-ACUÑA, 1985; CARVALHO, 1991). Zambolim et al. (1985) sugerem

ser este fato o responsável por um desequilíbrio de nutrientes nas folhas, com consequente migração desses nutrientes para os frutos, tornando os cafeeiros mais suscetíveis à doença.

Um ponto importante para o início da epidemia de ferrugem nos cafezais é a alta densidade de hospedeiros suscetíveis. Nas grandes áreas, ou mesmo em regiões com plantio de variedades susceptíveis, como o 'Catuaí', o desenvolvimento da doença é favorecido, pois o potencial de inóculo será maior e a disseminação facilitada entre as lavouras (CHALFOUN, 1997; CARVALHO; CHALFOUN, 1998).

Bock (1962), citado por Talamini (1999), em trabalhos sobre a epidemiologia da ferrugem do cafeeiro, sugere que os fatores ambientais mais importantes, depois da temperatura, que condicionam a ocorrência dessa doença são: distribuição e intensidade de chuvas, quantidade de inóculo residual existente no final da estação seca e grau de enfolhamento da árvore no transcorrer da estação chuvosa.

Quanto à chuva, vários autores demonstraram seu relevante papel na disseminação e na germinação dos esporos de *H. vastatrix*. Nutman (1960), Bock (1962), Roberts (1963) e Terrones (1984), citados por Talamini (1999), chegaram à conclusão de que a chuva constitui o principal agente de disseminação de uredíniosporos na lavoura.

2.3. Microrganismos endofíticos

Embora tenham sido descritos a partir do século XIX, os microrganismos endofíticos só receberam maior atenção há pouco mais de 20 anos, quando se

verificou que possuíam a capacidade de proteger seus hospedeiros contra pragas e doenças e dar proteção até a herbívoros domésticos, como, por exemplo, ovinos e bovinos.

Os microrganismos endofíticos compreendem principalmente fungos e bactérias que habitam o interior das plantas sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros (PETRINI, 1991). Numa definição mais ampla, os endofíticos podem ser considerados como microrganismos isolados de tecidos vegetais desinfestados superficialmente ou do interior destes, e que não causam, aparentemente, danos às plantas. Eles se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, por não serem prejudiciais às plantas ou lhes causar doenças e são distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (HALLMANN et al., 1997).

Durante o período compreendido entre 1876 e 1926, muitos trabalhos detalharam a presença de populações bacterianas associadas às plantas. O interesse nestas populações começou com Pasteur, que em 1876, descreveu a sua presença no suco de uva, extraído assepticamente da uva estéril. Em novos experimentos foram relatados que isolados de bactérias estavam presentes no interior das plantas de uva, mas os resultados foram desprezados, pois o isolamento foi atribuído a alguma condição patológica da planta ou a um erro experimental (HOLLIS, 1951), citado por Soares (2000).

Segundo Musson (1994), em 1904, Hiltner utilizou o termo “bacteriorriza” para descrever bactérias encontradas em raízes de plantas, mas o crédito do nome de bactérias endofíticas foi dado a Perotti, que descreveu bactérias simbióticas em tecidos radiculares de plantas saudáveis, em 1926. Ele usou o termo “endofítico” para descrever o endossimbionte *Rhizobium* spp., que também foi encontrado em tecidos de várias plantas.

Desde então, um grande número de trabalhos foram publicados utilizando o termo “endofítico”, com o isolamento de bactérias em muitas espécies de plantas e partes de plantas, em vários estágios de crescimento. (TERVET; HOLLIS, 1948; MENELEY; STRANGHELLINI, 1975; MUNDT; HINKLE, 1976; XIAO et al., 1990).

Para fungos, a primeira definição do termo endofítico foi feito por de Bary em 1866, aplicando o nome à micota interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não e, nos casos de interações antagonísticas ou simbióticas (STONE, 1986).

Na medida em que os microrganismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias, foram sendo estudados, verificou-se que eles poderiam possuir propriedades importantes, tais como a de conferir maior resistência a seus hospedeiros, alterar as propriedades fisiológicas de plantas que os abrigam, produzir hormônios vegetais e outros compostos, tais como enzimas e fármacos de interesse biotecnológico (AZEVEDO et al., 2000).

As bactérias endofíticas, assim como os fitopatógenos, apresentam a capacidade de penetrar e se disseminar sistemicamente na planta hospedeira, habitando de forma ativa o apoplasto (QUADT-HALLMANN et al., 1997b), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997) e, ocasionalmente, colonizar os espaços intracelulares (QUADT-HALLMANN; KLOPPER, 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997a). Esta colonização apresenta um nicho ecológico semelhante ao ocupado por fitopatógenos, o qual pode se apresentar como um agente de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997). Os mecanismos de controle podem ser por ação direta sobre o patógeno no interior da planta (PAN et al., 1997), por antibiose (PLEBAN et al., 1997; STURZ et al., 1998), ou indiretamente

por indução de resistência sistêmica no hospedeiro (DUIJFF et al., 1997; KRISHNAMURTHY; GNANAMANICKAM, 1997; M'PIGA et al., 1997; RAUPACH; KLOEPPER, 1998) e/ou por competição por nutrientes (MARI et al., 1996).

Pettit et al. (1968), citados por Soares (2000), encontraram *Bacillus subtilis* em estudos de *Aspergillus flavus* no amendoim. Eles notaram que no interior do amendoim, que continha a bactéria endofítica, havia ocorrido redução da população e dos movimentos fúngicos em tecidos infectados. Baseado nestas observações, eles sugeriram que a bactéria endofítica poderia ser utilizada para controle do fungo patogênico.

Narisawa et al. (1988) demonstraram que infecções em couve chinesa (*Brassica campestris*), causadas por *Plasmodiophora brassicae*, foram suprimidas por 60 isolados de fungos endofíticos provenientes de raízes de couve, de um total de 322 isolados.

Qiu et al. (1990) isolaram bactérias endofíticas de algodão, identificando-as posteriormente como *Pseudomonas* spp. Em testes *in vitro*, elas foram altamente antagônicas a *Colletotrichum gossypii* e *Rhizoctonia solani*. Quando o solo esterilizado foi infestado com *C. gossypii*, dois isolados de bactéria endofíticas reduziram a mortalidade da semente em até 31,1%. Em solo não estéril, o valor desta redução de mortalidade aumentou para 59,5%.

McInroy e Kloepper (1991) verificaram a presença de uma microbiota bacteriana muito diversificada em plantas saudáveis de milho e algodão, com o número de gêneros isolados dos tecidos do caule e da raiz maior do que o encontrado na rizosfera dessas mesmas plantas. Como as populações de endofíticos encontrados em plântulas foram relativamente altas, tanto nos caules, como nas raízes, estes autores sugeriram que muitos deles originaram-se

da semente. Demonstraram também que a comunidade de endofíticos, principalmente do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* em hastes de milho era diminuída com a maturidade da planta, talvez devido a um aumento da competição, pela falta de nutrientes ou ao acúmulo de metabólitos tóxicos.

Lima et al. (1994) estudando o controle do “mal seco” em citrus, causado pelo fungo *Phoma tracheiphila*, testaram isolados de bactérias endofíticas *in vitro*, e obtiveram nove isolados antagônicos à *P. tracheiphila*. Estes isolados foram inoculados no caule de plântulas de laranjeira 15 dias antes da inoculação do patógeno. Foi observado que houve um menor índice de doença nas plantas inoculadas com endofíticos, se comparadas ao controle. Observaram também que houve um aumento na população de bactérias endofíticas inoculados.

Sieber et al. (1988) sugerem que determinados fungos endofíticos isolados de trigo (*Triticum aestivum* L.) podem apresentar diferentes graus de resistência a *Septoria nodorum*.

Kloepper et al. (1999) mostraram que a aplicação de rizobactérias em sementes ou raiz pode induzir resistência a múltiplos patógenos dos tecidos foliares, como vírus, fungos e bactérias. Em tomate, a aplicação da rizobactéria promotora de crescimento *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN), induziu resistência sistêmica ao *Verticillium dahliae*. Neste caso, foi demonstrado que a colonização endofítica da planta pela rizobactéria foi necessária para a indução de resposta contra o patógeno (SHARMA; NOWAK, 1998). Segundo os autores, como endofítico esta bactéria tem a vantagem de evitar a competição microbiana durante a indução de resistência. Esta característica nas bactérias endofíticas pode favorecê-las,

aumentando os seus efeitos sobre a planta e reduzindo as variações decorrentes da interação com outros microrganismos, as quais podem inviabilizar a formulação de um produto comercial.

A promoção do crescimento de plantas pode ser influenciada por diversos outros mecanismos, além da fixação do nitrogênio, como a mineralização de componentes orgânicos de fósforo e a solubilização dos componentes inorgânicos de fósforo (KLOEPPER et al., 1989). Além do fósforo e do nitrogênio, a bacterização também tem proporcionado o aumento de outros nutrientes nas plantas, como boro e potássio (LUCON, 1998). O crescimento pode ser atribuído também à produção de substâncias reguladoras de crescimento, como giberelinas, citocininas e auxinas. Estas substâncias são produzidas por alguns microrganismos do solo em resposta ao metabolismo de exsudatos específicos das raízes (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1991).

A fixação de nitrogênio por bactérias é um dos mecanismos de promoção de crescimento e benefício às planta (KLOEPPER et al., 1989). Em um dos poucos estudos que foram realizados a respeito de bactérias endofíticas do café, foi demonstrado que bactérias endofíticas do gênero *Acetobacter*, encontradas nos tecidos da planta e em sua rizosfera são também potenciais fixadoras de nitrogênio (SALGADO et al., 1997).

Segundo Tuzun et al. (1991), a imunização de plantas, associada ao fenômeno de indução de resistência podem ser uma medida alternativa para o uso de agentes químicos no controle de doenças de plantas, tanto em casa de vegetação como em campo.

Dessa forma, o entendimento da dinâmica da interação planta/microrganismos endofíticos e o desenvolvimento de estratégias de controle de patógenos

envolve, inicialmente, o conhecimento da comunidade endofítica associada ao vegetal de interesse e aos mecanismos de ação desses organismos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se isolados de bactérias endofíticas originários de ramos e raízes, retirados de cafeeiros *Coffea arabica* e *Coffea robusta*, provenientes das regiões produtoras de Pedreira-SP, Mococa-SP e Pindorama-SP (Tabela 1), mantidos em coleção no Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna-SP e avaliados quanto à sua capacidade de controlar o agente da ferrugem do cafeeiro.

Tabela 1. Origem dos isolados de bactérias endofíticas estudados.

Código do isolado	Espécie	Parte da planta	Local
T F1-II a	<i>Coffea arabica</i>	folha	Pedreira-SP
T F2-I c	<i>C. arabica</i>	folha	Pedreira-SP
T F2-II c	<i>C. arabica</i>	folha	Pedreira-SP
T F3-II a	<i>C. arabica</i>	folha	Pedreira-SP
T F4-II a	<i>C. robusta</i>	folha	Mococa-SP
T F4-III a	<i>C. robusta</i>	folha	Mococa-SP
T F5-III a	<i>C. robusta</i>	folha	Mococa-SP
T F7-I a	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F7-I b	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F7-II a	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F7-II b	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F7-III a	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F7-III b	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F8-I a	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F8-II a	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F9-I a	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F9-I a F	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F9-I b F	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F9-I c F	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F9-I d F	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T F10-I a	<i>C. arabica</i>	folha	Pindorama-SP
T F10-II a	<i>C. arabica</i>	folha	Pindorama-SP
T F10-III a	<i>C. arabica</i>	folha	Pindorama-SP
T F11- III a	<i>C. arabica</i>	folha	Pindorama-SP
T F12- I a	<i>C. arabica</i>	folha	Pindorama-SP
A F2- I b	<i>C. robusta</i>	folha	Pedreira-SP
A F7- II b	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
A F7- III a	<i>C. robusta</i>	folha	Pindorama-SP
T G4-I a	<i>C. robusta</i>	galho	Mococa-SP
T G4- II a	<i>C. robusta</i>	galho	Mococa-SP
T G5- II b	<i>C. robusta</i>	galho	Mococa-SP
T G5- III c	<i>C. robusta</i>	galho	Mococa-SP
T G6- I b	<i>C. robusta</i>	galho	Mococa-SP
T G7- I c	<i>C. robusta</i>	galho	Pindorama-SP
T G7- III e	<i>C. robusta</i>	galho	Pindorama-SP
T G8- II a	<i>C. robusta</i>	galho	Pindorama-SP
T G8- III b	<i>C. robusta</i>	galho	Pindorama-SP
T G8- III c	<i>C. robusta</i>	galho	Pindorama-SP
T G10- II d	<i>C. arabica</i>	galho	Pindorama-SP
T G10- III c	<i>C. arabica</i>	galho	Pindorama-SP
T G11- II a	<i>C. arabica</i>	galho	Pindorama-SP

T G11- II b	<i>C. arabica</i>	galho	Pindorama-SP
T G12- II c	<i>C. arabica</i>	galho	Pindorama-SP
T G12- III a	<i>C. arabica</i>	galho	Pindorama-SP

3.1. Preparo de mudas de café

Mudas de café (*Coffea arabica* cv. 'Mundo Novo') suscetíveis a todas as raças de *Hemileia vastatrix*, foram adquiridas do Centro de Café e Plantas Tropicais, do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Campinas, SP. As mudas, plantadas inicialmente em sacos plásticos com capacidade para 250 mL de substrato, foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de cinco litros de solo. O solo utilizado foi o Latossolo Vermelho Amarelo, peneirado em malha de 1 cm² e misturado com 2,0 kg calcário, 5,0 kg superfosfato simples e 0,5 kg cloreto de potássio por m³ de solo.

3.2. Coleta e preservação dos uredíniosporos

Uredíniosporos de *H. vastatrix*, raça II, foram coletados de folhas lesionadas de plantas de café do Centro de Café e Plantas Tropicais, do Instituto Agronômico de Campinas - IAC. Estes foram retirados das lesões das folhas com auxílio de um coletor de esporos acoplado a um compressor de 1 HP e acondicionados em um recipiente, contendo cristais de dicromato de sódio, em umidade relativa de aproximadamente 52% (ESKES, 1989), mantidos sob refrigeração à 7°C ± 2 °C, até a sua utilização.

3.3. Preparo e padronização da suspensão de bactérias endofíticas e de uredíniosporos de *H. vastatrix*.

Os isolados de bactérias endofíticas foram cultivados em meio NA (Nutriente-Ágar), por 24 horas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada e esterilizada, por meio de alça e homogeneizados em agitador de tubos, para a obtenção de uma suspensão bacteriana, padronizada em espectrofotômetro à $\text{OD}_{550} = 0,1$.

Foi preparada uma suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix* na concentração de 1 mg mL^{-1} de água, mantida sob agitação em um agitador magnético por 5 minutos, para homogeneização da suspensão e posterior inoculação.

3.4. Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. I. Testes de germinação de uredíniosporos.

Suspensões de uredíniosporos de *H. vastatrix* e de 40 isolados de bactérias endofíticas foram preparadas, conforme 3.3. Dessa suspensão, uma alíquota de $15 \mu\text{L}$ de uredíniosporos e $15 \mu\text{L}$ de bactérias endofíticas foram colocadas nos dois pontos extremos de cada lâmina de microscopia (Figura 1).

As lâminas de microscopia contendo as suspensões bacterianas e de uredíniosporos de *H. vastatrix* foram colocadas em caixas plásticas cobertas com uma lâmina de vidro, contendo em seu interior uma camada de espuma saturada com água destilada, para proporcionar um microclima de alta umidade relativa. Após 6 horas de incubação, sob

temperatura de 22°C no escuro, foi colocado 15µL do corante lactofenol azul de algodão, sobre a suspensão contendo os tratamentos, para interromper o desenvolvimento dos tubos germinativos dos uredíniosporos e permitir melhor visualização das estruturas a serem avaliadas.

Para a determinação do percentual de uredíniosporos germinados, realizou-se 10 leituras em campos diferentes ao microscópio óptico (10 campos sob o aumento de 200x), sendo considerados como germinados, todos aqueles uredíniosporos que apresentavam o tubo germinativo com o comprimento de, no mínimo, metade do seu maior diâmetro. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado em quatro repetições. O experimento foi repetido e as médias dos tratamentos dos dois experimentos foram analisadas conjuntamente. Como testemunhas foram utilizadas água destilada esterilizada e o produto propiconazole (Tilt CE), na dosagem 1,2 µL do produto comercial por mL de água.

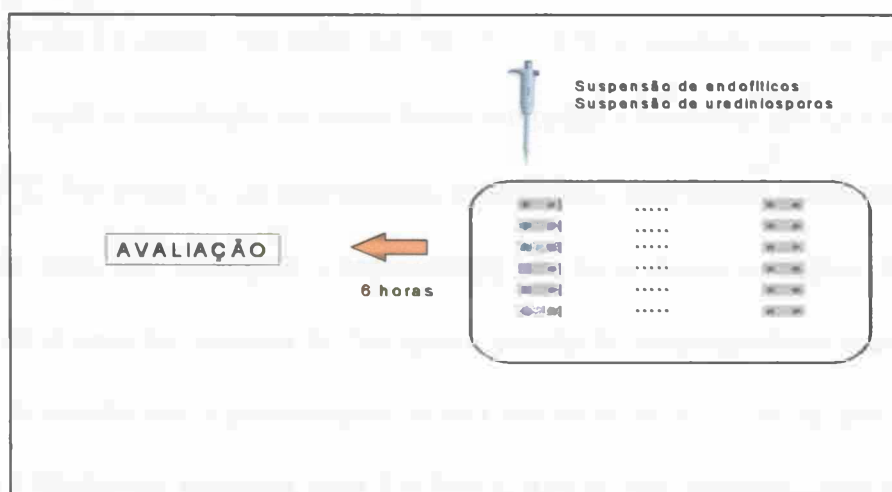


Figura 1 – Esquema para realização do teste de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*.

3.5. Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. II. Testes em discos de folhas.

O presente ensaio teve por objetivo avaliar 44 bactérias endofíticas, isoladas de cafeeiro, na sua capacidade de controlar a ferrugem em discos de folhas (cv. Mundo Novo). Uma alíquota de 25 μ L de suspensão de isolados de bactérias endofíticas, preparadas de acordo com o item 3.3., foi aplicada sobre os discos de folha, 72 e 24 horas antes e após e simultaneamente à inoculação de uredíniosporos de *H. vastatrix*. Igual volume de uredíniosporos foi aplicado com micropipeta.

Discos de folhas jovens, totalmente desenvolvidas, foram retirados com o auxílio de um furador de rolhas, com 2,0 cm de diâmetro e acondicionados em caixas plásticas, com a superfície dorsal voltada para cima, sobre uma camada de espuma saturada com água e, posteriormente, tampadas com lâmina de vidro, em ambiente controlado, com fotoperíodo de 12 horas, 500-1000 lux, $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa próxima a 100% (Figura 2). Após a inoculação, as caixas foram tampadas e incubadas no escuro por 24 horas, a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo, cada tratamento, com três repetições e representado por nove discos de folhas. A avaliação dos sintomas da doença foi realizada 30 dias após a inoculação, empregando-se uma escala de notas de 1 a 5, de acordo com a porcentagem de área lesionada (nota 1 = 0% de área lesionada; nota 2 = 1% a 25% de área lesionada; nota 3 = 26% a 50% de área lesionada; nota 4 = 51% a 75% de área lesionada; e nota 5 $\geq$ 75% de área lesionada).

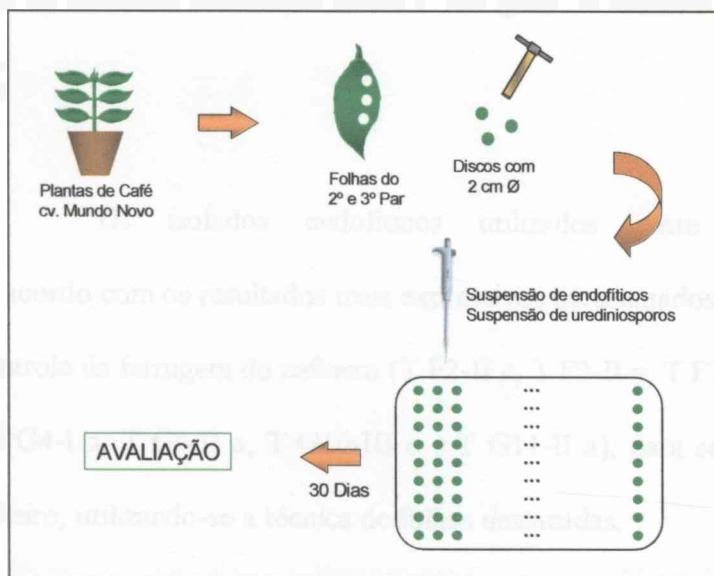


Figura 2 – Esquema para a realização do teste em discos de folhas de café.

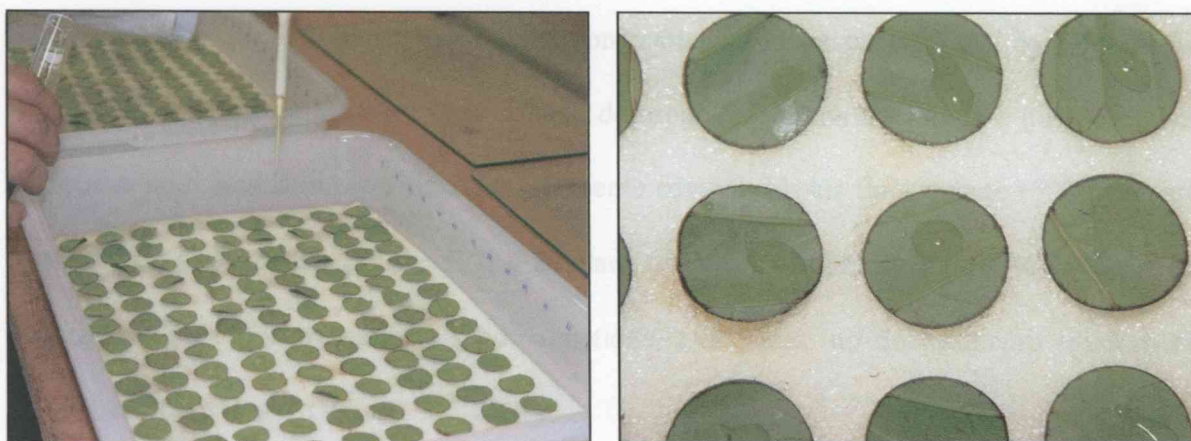


Figura 3: Inoculação de bactérias endofíticas sobre discos de folhas de café da cv. Mundo Novo.

3.6. Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. III. Testes em folhas destacadas.

Os isolados endofíticos utilizados neste experimento foram selecionados de acordo com os resultados mais expressivos apresentados nos ensaios em discos de folhas, no controle da ferrugem do cafeeiro (T F2-II c, T F3-II a, T F7-I b, T F7-II a, T F9-I a, A F7-III a, T G4-I a, T G4-II a, T G10-III c e T G11-II a), para se avaliar o controle da ferrugem do cafeeiro, utilizando-se a técnica de folhas destacadas.

Os tratamentos consistiram da pulverização de suspensões bacterianas sobre folhas jovens e totalmente desenvolvidas de cafeeiro cv. Mundo Novo, 72 e 24 horas antes e após, e simultaneamente à inoculação com a suspensão de uredíniosporos, preparados conforme 3.3. As folhas de cafeeiro foram acondicionadas em caixas plásticas, com a superfície dorsal voltada para cima, sobre uma camada de espuma saturada com água e posteriormente, tampadas com uma lâmina de vidro, em ambiente controlado: luz fluorescente (500-1000 lux), fotoperíodo de 12 horas, $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar próxima a 100%. Cada parcela foi representada por três folhas, sendo repetidos, três vezes, no delineamento experimental blocos ao acaso (Figura 4).

A inoculação foi realizada utilizando-se um pulverizador acoplado a um compressor de 1 HP. Após a inoculação, as caixas foram tampadas e colocadas no escuro por 24 horas, à $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação da reação dos sintomas foi realizada 21 dias após a inoculação, por meio da contagem do número de lesões por folha.

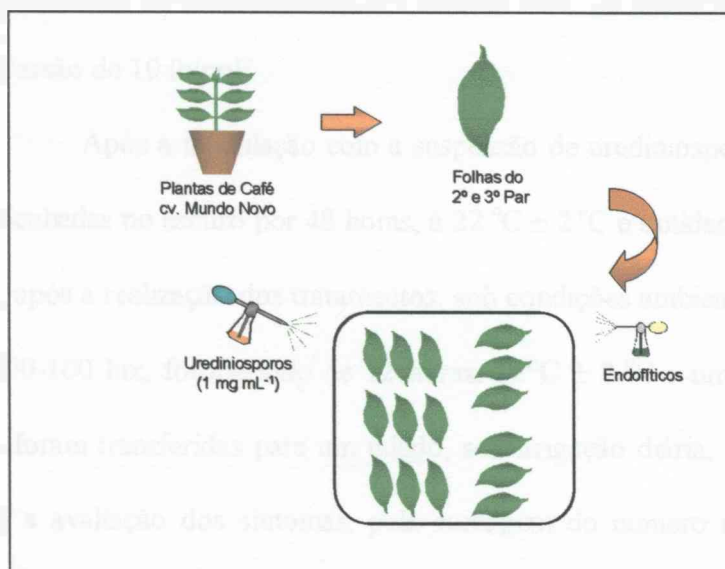


Figura 4 – Esquema para a realização do teste em folhas destacadas de cafeeiro.

3.7. Efeito de bactérias endofíticas sobre a ferrugem do cafeeiro. IV. Testes em mudas de cafeeiro.

Foram selecionados dez isolados endofíticos, de acordo com os resultados mais expressivos apresentados nos ensaios em discos de folhas, no controle da ferrugem do cafeeiro (T F2-II c, T F3-II a, T F7-I b, T F7-II a, T F9-I a, A F7-III a, T G4-I a, T G4-II a, T G10-III c e T G11-II a), visando avaliar a eficácia do controle da ferrugem, por bactérias endofíticas, em mudas de cafeeiro em vasos.

Foi utilizada a mesma metodologia descrita em 3.5. As suspensões bacterianas foram aplicadas com o auxílio de um pulverizador manual até o ponto de

escorrimento e a suspensão de uredíniosporos foi aplicada com um pulverizador acoplado a um compressor sob pressão de 10 lb/pol².

Após a inoculação com a suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, as mudas foram incubadas no escuro por 48 horas, à $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa próxima a 100%. As mudas, após a realização dos tratamentos, sob condições ambientais controladas: luz fluorescente de 500-100 lux, fotoperíodo de 12 horas, $22^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar próxima a 100%, foram transferidas para um telado, sob irrigação diária, onde permaneceram por 30 dias, para a avaliação dos sintomas, pela contagem do número de lesões por folha, sendo utilizado, como testemunha, água destilada esterilizada. Foi utilizado um delineamento experimental em blocos ao acaso, com dez repetições (duas plantas por vaso).

3.8. Identificação de bactérias endofíticas

Isolados de bactérias endofíticas foram identificados através do perfil dos ácidos graxos da membrana celular, pelo cromatógrafo gasoso (MIDI) e pelo sequenciamento de genes, pela amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico em termociclador (Gene AMP PCR System 9700).

Para a identificação das bactérias endofíticas pelo padrão de ácidos graxos, estas foram cultivadas em meio TSBA, pelo método de estrias cruzadas, e incubadas a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 ± 2 horas. Decorrido este tempo, foram coletados, aproximadamente, 40mg (quatro a seis alças com capacidade para 10 μL) da cultura no 3º quadrante e transferidos para tubos Kimax (100 X 13 mm). Depois, foram executadas quatro etapas para extração dos ácidos

graxos celulares (saponificação, metilação, extração e lavagem). Foi utilizado o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector Flame Ionization Detector (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface foi obtida pelos programas ChemStation A.09.01 [1206] e o método e a biblioteca selecionados foram o TSBA 40.

O tempo da corrida de cada amostra foi de 20,7 minutos. O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contém comprimento, área de picos e tempo de retenção nomeados. O resultado final foi apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando, dessa forma, o microrganismo em questão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*.

Dos quarenta isolados de bactérias endofíticas testados, trinta e quatro se mostraram eficazes em reduzir o percentual de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, sendo que os isolados T F2-I c, T F1-II c, T F9-I a F, T F9-I d F, A F7-II b, T G8-II b e T G11-II a apresentaram porcentagem de inibição da germinação média superior a 50% (Tabela 2). Foi observado, além da inibição na taxa de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, causada pela ação das bactérias endofíticas, deformações no tubo germinativo, prejudicando o seu desenvolvimento normal (Figura 5). Entretanto, os níveis de controle

apresentados pelos isolados endofíticos se mostraram inferiores aos valores obtidos pelo controle químico, representado pelo propiconazole.

Nos testes em lâminas de vidro, evidenciou-se uma ação inibidora causada por compostos produzidos pelas bactérias endofíticas sobre a germinação de uredíniosporos e/ou sobre o tubo germinativo do patógeno, devido ao aparecimento de deformações e conseqüentes danos ao seu desenvolvimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Bettiol e Várzea (1982), que, trabalhando com os isolados de *Bacillus subtilis* AP-3 e AP-150 na concentração de 5.10^7 cel.mL⁻¹, observaram que houve inibição total na germinação dos uredíniosporos de *H. vastatrix* das raças I, II, XXV, XXIX e XXXI. Em concentrações inferiores de suspensões de *B. subtilis*, os autores verificaram que os tubos germinados se mostravam deformados. Bettiol et al (1994) observaram inibição total na germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, quando da aplicação de extratos e de células de *B. subtilis*, obtidos de caldo fermentado na concentração de 1000 ppm. Centurion (1991) e Mizubuti (1992) obtiveram resultados semelhantes, pelo uso de isolados de *B. subtilis*, no controle de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. Segundo Klich et al (1991); McKeen et al (1986) e Pusey (1989), isolados de *B. Subtilis* produzem compostos peptidolipídicos, do grupo iturina, que apresentam propriedades antifúngicas. *Bacillus subtilis*, endofítica do pepino, também apresenta como modo de ação a indução de resistência sistêmica no hospedeiro (IRS), verificada por Yao et al. (1997) no controle do CMV (Cucumber Mosaic Virus). Essa bactéria foi relatada como endofítica da beterraba (*Beta vulgaris*) por Di Fiore e Del Gallo (1995).



(a)



(b)



(c)

Figura 5: Germinação de urediniosporos de *Hemileia vastatrix* em lâminas de vidro na presença de água (a), propiconazole (b) e bactérias endofíticas (c).

Tabela 2 – Porcentagem de germinação de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*, submetidos a suspensões de diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Tratamento	% de inibição da germinação	% de germinação
Água	0,00	54.399 a'
T F11-III a	10,680	48.591 ab
T F7-I a	11,379	48.213 ab
T F9-I b F	11,544	48.112 ab
T G6-I b	12,316	47.702 abc
A F2-I b	13,070	47.291 abc
T G10-II d	15,092	46.194 abcd
T F2-II a	24,173	41.246 bcde
T G5-II b	25,000	40.798 bcde
T F9-I a	27,500	39.439 bcdef
T F3-II a	27,794	39.280 bcdefg
T G5-III c	27,886	39.232 bcdefg
T F12-I a	31,507	37.263 cdefgh
T F4-II a	33,235	36.317 defgh
T G7-III e	38,254	33.594 efghi
T G7-I c	38,842	33.267 efghi
A F7-III a	39,007	33.179 efghi
T G8-III b	39,099	33.127 efghi
T F7-II b	40,018	32.631 efghij
T F5-III a	41,618	31.764 efghijk
T F10-III a	44,467	30.205 fghijkl
T F8-I a	44,540	30.167 fghijkl
T F9-I c F	44,945	29.949 fghijkl
T F7-I b	45,496	29.648 fghijkl
T G10-III c	45,827	29.470 fghijkl
T F10-II a	45,993	29.384 fghijkl
T F7-III a	46,544	29.082 fghijkl
T F7-II a	47,096	28.784 ghijkl
T G4-II a	47,445	28.589 hijkl
T G12-III a	47,960	28.309 hijkl
T G4-I a	48,254	28.150 hijkl
T F7-III b	48,621	27.945 hijkl
T G12-II c	49,651	27.387 hijkl
T F2-I c	54,154	24.944 ijkl
T G8-II a	54,357	23.976 ijklm
T F9-I d F	55,919	23.826 ijklm
T F4-III a	56,563	23.634 ijklm
T G11-II a	59,301	22.138 jklm
T F9-I a F	60,790	21.329 klm
A F7-II b	61,838	20.762 lm
T F2-II c	73,676	14.318 m
Propiconazole	95,441	2.479 n

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Waller-Duncan 5%). Os valores são médias de dois ensaios com três repetições, analisados conjuntamente.

4.2. Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em discos de folha da cv. Mundo Novo.

No tratamento em que os discos de folha de cafeeiro foram inoculados com suspensões de diferentes isolados de bactérias endofíticas, aplicadas 72 horas antes da suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, foi verificado que o isolado T F4-II a aumentou a severidade das lesões em 64,73%. Outros 31 isolados de endófitas apresentaram aumento da severidade das lesões em discos de folha de cafeeiro em relação à testemunha, porém não houve diferença significativa entre eles. Apenas o isolado T G4-I a controlou a doença em mais do que 50% (63,81% de controle), sem, contudo, diferir estatisticamente dos isolados T F9-I b F, T F1-II a e T F9-I a, pelo teste de Waller-Duncan, que controlaram a doença em 24,86%, 27,90% e 31,68%, respectivamente (Tabela 3).

Para os tratamentos em que os isolados endofíticos foram aplicados 24 horas antes da suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, os isolados endofíticos T F9-I a, T G5-II b, T G10-III c, T G4-I a, T F2-II c, T G11-II a e T F7-I b apresentaram controle da doença superiores a 50%. Entretanto, não diferiram dos isolados T G6-I b, T F9-I c F, T G12-II c, T F4-II a, A F7-III a, T F1-II a, T G8-III b, T G5-III c, T F7-III b, T F7-II a, T F9-I d F e T F3-II a, pelo teste de Waller-Duncan.

Para os tratamentos em que os isolados endofíticos foram aplicados concomitantemente à suspensão de uredíniosporos, os isolados T F8-I a, T F7-III a, T F2-I c, T F9-I a F, T F9-I b F, T F11-III a e T G7-I c proporcionaram aumento significativo na severidade da doença, com 65,51%, 59,74%, 51,34% e 50,89%, 47,44%, 41,01% e 37,28% respectivamente, em relação à testemunha. Outros 18 isolados endofíticos apresentaram

valores de severidade da doença superiores à testemunha, sem, contudo, apresentar diferença significativa. Os isolados T F1-II a, T F7-II a, T G10-III c, T F2-II c, T F9-I a, T G11-II a, T G4-I a e T F3-II a, se mostraram efetivos em controlar a ferrugem do cafeeiro, com valores superiores a 50% em relação à testemunha.

No tratamento em que os isolados endofíticos foram aplicados 24 horas após à suspensão de uredíniosporos, apenas o isolado T G11-II a apresentou redução na severidade da doença com 59,27% de controle. No tratamento em que a inoculação foi realizada 72 horas após à suspensão de uredíniosporos, nenhum isolado controlou a doença acima de 50%. Os isolados A F7-II b e A F7-III a apresentaram valores de controle da doença de 45,57% e 46,41%, respectivamente.

De todos os isolados testados, apenas o T G11-II a apresentou eficiência em inibir a germinação de uredíniosporos *in vitro* (Tabela 2) e em reduzir a porcentagem de área foliar lesionada em discos de folhas de cafeeiro (Tabela 3). Entretanto, quando comparado os resultados entre o tempo de aplicação dos endofíticos e a inoculação de *H. vastatrix* em discos de folhas, apenas o isolado T G4-I a controlou a doença em todos os períodos. Possivelmente, esse isolado apresenta como modo de ação a produção de metabólitos e a indução de resistência do hospedeiro.

Os isolados T F2-II c, T F3-II a, T F7-I b, T F7-II a, T F9-I a, A F7-III a, T G4-I a, T G10-III c e T G11-II a foram os que apresentaram os melhores resultados em testes em discos de folha. Dessa forma, foram selecionados para os estudos de controle da ferrugem em folhas destacadas e em plantas de café.

Diversos autores como Qiu et al. (1990), McInroy e Kloepper (1991), Narisawa et al. (1998), Lima et al. (1994) e Kloepper et al. (1999) verificaram a capacidade de bactérias endofíticas em controlar doenças fúngicas, quando aplicadas em seus hospedeiros.

Tabela 3 – Porcentagem de área lesionada pela ferrugem do caféiro, em discos de folha da cv. Mundo Novo, submetidas à suspensões de isolados de bactérias endofíticas 72 horas antes e após, 24 horas antes e após e concomitantemente à inoculação de *H. vastatrix*.

Tratamentos	- 72 horas			- 24 horas			0 horas			+ 24 horas			+ 72 horas		
	% de controle	% de área lesionada¹	% de	% de controle	% de área lesionada¹	% de	% de controle	% de área lesionada¹	% de	% de controle	% de área lesionada¹	% de	% de controle	% de área lesionada¹	% de
Água	0,00	10,86 bcdefgh		0,00	13,63 ab		0,00	10,73 efghij		0,00	12,25 abcde		0,00	14,33 ab	
T F1-II a	27,90	7,83 ghi		37,93	8,46 abcdefg		50,70	5,29 klmn		-1,55	12,44 abcde		19,82	11,49 abcd	
T F2-I c	9,02	9,88 defgh		26,78	9,98 abcdef		-51,35	16,24 abc		1,39	12,08 abcde		22,61	11,09 abcd	
T F2-II c	-3,04	11,19 bcdefgh		77,62	3,05 fg		76,98	2,47 no		4,65	11,68 abcdef		12,07	12,60 abcd	
T F3-II a	-40,88	15,30 abc		49,38	6,90 bcdefg		88,16	1,27 o		23,87	9,33 bcdef		-2,51	14,69 a	
T F4-II a	-64,73	17,89 a		35,22	8,83 abcdefg		-2,80	11,03 defghij		-14,37	14,01 abcd		1,19	14,16 ab	
T F4-III a	-18,51	12,87 bcdef		31,03	9,40 abcdef		-2,89	11,04 defghij		8,41	11,22 abcdef				
T F5-III a	-27,16	13,81 abcde		25,39	10,17 abcde		-19,94	12,87 abcdefgh		-4,41	12,79 abcde		14,24	12,29 abcd	
T F7-I a	-29,00	14,01 abcde		20,98	10,77 abcd		-27,49	13,68 abcdefgh		6,94	11,40 abcdef		3,21	13,87 abcd	
T F7-I b	8,47	9,94 defgh		84,15	2,16 g		39,61	6,48 ijklmn		0,08	12,24 abcde		7,26	13,29 abcd	
T F7-II a	-11,05	12,06 bcdefgh		47,91	7,10 bcdefg		59,27	4,37 lmno		-11,76	13,69 abcd		1,95	14,05 ab	
T F7-II b	8,93	9,89 defgh		26,78	9,98 abcdef		-31,50	14,11 abcdefgh		-11,10	13,61 abcd		2,09	14,03 abc	
T F7-III a	-23,66	13,43 abcde		14,53	11,65 abcd		-59,74	17,14 ab		3,35	11,84 abcdef		3,21	13,87 abcd	
T F7-III b	-34,71	14,63 abcd		47,32	7,18 bcdefg		-18,08	12,67 abcdefgh		40,08	7,34 def		10,75	12,79 abcd	
T F8-I a	-21,73	13,22 abcde		23,18	10,47 abcd		-65,51	17,76 a		16,73	10,20 abcdef		7,75	13,22 abcd	
T F8-II a	-29,74	14,09 abcd		18,42	11,12 abcd		-32,15	14,18 abcdefgh		3,67	11,80 abcdef		35,10	9,30 abcd	
T F9-I a	31,68	7,42 hi		55,91	6,01 cdefg		78,10	2,35 no		-0,57	12,32 abcde		30,01	10,03 abcd	
T F9-I a F	16,11	9,11 efgh		14,38	11,67 abcd		-50,89	16,19 abcd		4,82	11,66 abcdef		27,29	10,42 abcd	
T F9-I b F	24,86	8,16 fghi		15,70	11,49 abcd		-47,44	15,82 abcde		-6,29	13,02 abcde		9,84	12,92 abcd	
T F9-I c F	-8,01	11,73 bcdefgh		34,41	8,94 abcdefg		6,15	10,07 fghijk		-18,78	14,55 ab		9,49	12,97 abcd	
T F9-I d F	3,22	10,51 cdefgh		48,35	7,04 bcdefg		2,42	10,47 fghijk		13,55	10,59 abcdef		35,10	9,30 abcd	
T F10-I a	-12,52	12,22 bcdefgh		28,32	9,77 abcdef		-12,49	12,07 bcdefghi		-3,10	12,63 abcde		17,93	11,76 abcd	
T F10-II a	-15,01	12,49 bcdefg		8,88	12,42 abcd		3,35	10,37 fghijk		-36,90	16,77 a		24,84	10,77 abcd	
T F10-III a	-8,01	11,73 bcdefgh		7,12	12,66 abcd		-5,31	11,30 cdefghij		-19,10	14,59 ab		24,28	10,85 abcd	
T F11-III a	-0,82	10,95 bcdefgh		-4,70	14,27 a		-41,01	15,13 abcdef		-17,39	14,38 abc		6,70	13,37 abcd	
T F12-I a	-41,71	15,39 abc		11,30	12,09 abcd		-10,53	11,86 cdefghi		18,04	10,04 abcdef		36,64	9,08 abcd	
A F2-I b	-13,81	12,36 bcdefg		4,99	12,95 abc		4,29	10,27 fghijk		22,53	9,49 bcdef		41,80	8,34 bcd	
A F7-II b	2,67	10,57 cdefgh		26,41	10,03 abcdef		-10,90	11,90 cdefghi		6,04	11,51 abcdef		45,57	7,80 cd	
A F7-III a	-4,88	11,39 bcdefgh		36,61	8,64 abcdefg		28,15	7,71 ijklm		18,53	9,98 abcdef		46,41	7,68 d	
T G4-I a	63,81	3,93 i		76,74	3,17 efg		85,00	1,61 no		38,53	7,53 cdef		41,94	8,32 bcd	
T G4-II a	3,31	10,50 cdefgh		-1,03	13,77 ab		-8,01	11,59 cdefghij		28,08	8,81 bcdef		20,73	11,36 abcd	

T G5- II b	8,38	9,95 defgh	56,49	5,93 cdefg	14,07	9,22 hijkl	12,08	10,77 abcdef	28,75	10,21 abcd
T G5- III c	-6,63	11,58 bcdefgh	43,87	7,65 abcdefg	8,29	9,84 ghijk	23,02	9,43 bcdef	16,89	11,91 abcd
T G6- I b	-4,05	11,30 bcdefgh	32,87	9,15 abcdefg	-12,86	12,11 bcdefghij	9,96	11,03 abcdef	16,19	12,01 abcd
T G7- I c	-26,70	13,76 abcde	12,69	11,90 abcd	-8,48	11,64 cdefghij	-5,14	12,88 abcde	23,03	11,03 abcd
T G7- III c	-28,83	14,10 abcd	27,73	9,85 abcdef	-37,28	14,73 abcdefg	4,24	11,73 abcdef	25,54	10,67 abcd
T G8- II a	-43,00	15,53 ab	28,17	9,79 abcdef	-14,26	12,26 bcdefghij	10,53	10,96 abcdef	33,01	9,60 abcd
T G8- III b	-39,22	15,12 abc	38,08	8,44 abcdefg	-10,25	11,83 cdefghij	20,33	9,76 bcdef	18,56	11,67 abcd
T G8- III c	-23,48	13,41 abcde	9,24	12,37 abcd	-2,05	10,95 efghij	18,78	9,95 abcdef	19,75	11,50 abcd
T G10- II d	-41,90	15,41 abc	26,19	10,06 abcdef	2,14	10,50 fghij	47,84	6,39 ef	16,12	12,02 abcd
T G10- III c	-34,07	14,56 abcd	57,59	5,78 defg	64,96	3,76 mno	24,65	9,23 bcdef	25,54	10,67 abcd
T G11- II a	-11,88	12,15 bcdefgh	77,92	3,01 fg	79,31	2,22 no	59,27	4,99 f	19,89	11,48 abcd
T G11- II b	-23,85	13,45 abcde	20,03	10,90 abcd	-11,46	11,96 bcdefghij	31,02	8,45 bcdef	30,15	10,01 abcd
T G12- II c	-4,60	11,36 bcdefgh	34,92	8,87 abcdefg	-4,47	11,21 cdefghij	19,59	9,85 bcdef	29,17	10,15 abcd
T G12- III a	-14,82	12,47 bcdefg	27,00	9,95 abcdef	4,57	10,24 fghijk	29,80	8,60 bcdef	20,38	11,41 abcd

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Waller-Duncan 5%). Os valores são médias de três repetições, com nove discos cada.

4.3. Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em folhas destacadas da cv. Mundo Novo.

No tratamento em que as folhas destacadas de cafeeiro foram pulverizadas com suspensões de diferentes isolados de bactérias endofíticas, aplicadas 72 horas antes da suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, foi verificado que os isolados T G4-I a, T F3-II a, T F7-II a, T F2-II c, T F7-I b, T G10-III c e T F9-I a proporcionaram um controle da ferrugem do cafeeiro acima de 50%, com 53,92%, 58,43%, 58,74%, 60,59%, 60,99%, 61,40% e 61,76% , respectivamente. Apenas o isolado T G11-II a não se mostrou eficaz em controlar a doença, com comportamento estatístico semelhante à testemunha. Apesar disso, não foram verificadas diferenças entre todos os isolados testados (Tabela 4) (Figura 6).

Para os tratamentos em que os isolados endofíticos foram aplicados sobre as folhas destacadas de cafeeiro 24 horas antes da suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, assim como no tratamento anterior, apenas o isolado T G11-II a não diferiu significativamente da testemunha. Os demais isolados, T G4-II a, T F3-II a, T F2-II c, A F7-III a, T F7-II a, T F9-I a e T G10-III c controlaram a ferrugem do cafeeiro, com valores superiores a 50% (51,51%, 55,43%, 55,88%, 56,45%, 58,56%, 58,61%, 58,67% e 62,82%, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si.

Quando aplicados concomitantemente à suspensão de uredíniosporos, os isolados T F9-I a, T F7-I b, T F3-II a e T F7-II a controlaram a doença com valores acima de 50%, com 54,83%, 55,88%, 55,94% e 63,04% de controle, respectivamente. Os isolados T G4-II a, A F7-III a, T G11-II a, T G4-I a e T F2-II c não diferiram significativamente da testemunha ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

No tratamento em que os isolados endofíticos foram aplicados 24 horas após à suspensão de uredíniosporos, apenas os isolados T F3-II a, T G4-I a, T F7-I b, T F7-II a e A F7-III a se mostraram eficazes em controlar a ferrugem do cafeeiro, com valores acima de 50%, com 51,68%, 52,25%, 54,01%, 56,72% e 58,09% de controle, respectivamente. Os isolados T G4-II a, T G11-II a, T G10-III c, T F2-II c, T F9-I a, T F3-II a e T G4-I a não diferiram significativamente da testemunha.

No tratamento com a aplicação dos isolados endofíticos realizado 72 horas após à suspensão de uredíniosporos, os isolados T F2-II c, T F3-II a e T F7-II a, apresentaram controle superiores a 50% (52,29%, 56,55% e 58,03%, respectivamente), sem, contudo, se diferirem dos isolados T G10-III c, T F7-I b, A F7-III a e T F9-I, que também se mostraram eficazes em controlar a doença, com 39,53%, 40,82%, 42,02% e 48,61% de controle, respectivamente.

É interessante observar que o isolado T G4-I a, que se destacou nos testes em discos de folha, controlando a doença em todos os períodos antes e após a inoculação da suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, não se destacou nos testes em folhas destacadas. O mesmo ocorreu com o isolado T G11-II a, que foi eficiente em inibir a germinação de uredíniosporos e a porcentagem de área foliar lesionada em testes de discos de folhas. Entretanto, estes resultados estão de acordo com Lopes (1986), que não verificou correlação entre os testes realizados *in vitro* e *in vivo*.

De um modo geral, as aplicações de suspensões com endófitas realizadas antes da inoculação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, foram mais eficientes que as aplicações realizadas após. Os isolados T F3-II a e T F7-II a podem ser considerados os mais eficientes nesse grupo de teste.

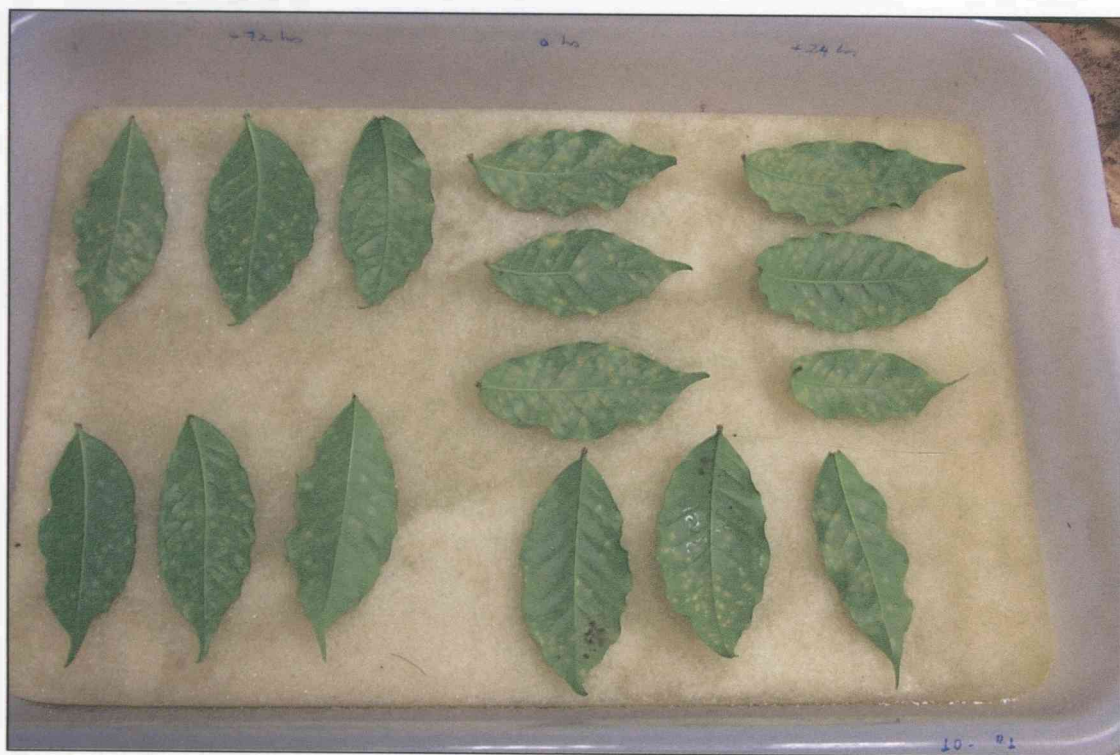


Figura 6: Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em folhas destacadas da cv. Mundo Novo.

Tabela 4 – Número de lesões de ferrugem por folha destacada de cafeeiro da cv. Mundo Novo, submetidas à suspensões de isolados de bactérias endofíticas 72 horas antes e após, 24 horas antes e após e concomitantemente à inoculação de *H. vasiatatrix*.

Tratamentos	- 72 horas				- 24 horas				0 horas				+ 24 horas				+ 72 horas			
	% de controle		Nº de lesões/ folha ¹		% de controle		Nº de lesões/ folha ¹		% de controle		Nº de lesões/ folha ¹		% de controle		Nº de lesões/ folha ¹		% de controle		Nº de lesões/ folha ¹	
Agua	0,00	216,78 a	0,00	195,44 a	0,00	200,22 a	0,00	234,11 a	0,00	234,11 a	0,00	232,44 a	0,00	232,44 a	0,00	232,44 a	0,00	232,44 a	0,00	232,44 a
T F2-II c	60,59	84,78 b	55,88	86,22 b	45,23	109,67 ab	45,23	109,67 ab	30,80	162,00 abcd	30,80	110,89 c	52,29	110,89 c	52,29	110,89 c	52,29	110,89 c	52,29	110,89 c
T F3-II a	58,43	90,11 b	55,43	87,11 b	55,43	88,22 b	55,43	88,22 b	51,68	113,11 bcd	51,68	101,00 c	56,55	101,00 c	56,55	101,00 c	56,55	101,00 c	56,55	101,00 c
T F7-I b	60,99	84,56 b	62,82	72,67 b	62,82	88,33 b	62,82	88,33 b	54,01	107,67 cd	54,01	137,56 bc	40,82	137,56 bc	40,82	137,56 bc	40,82	137,56 bc	40,82	137,56 bc
T F7-II a	58,74	89,44 b	58,56	81,00 b	58,56	74,00 b	58,56	74,00 b	56,72	101,33 cd	56,72	97,56 c	58,03	97,56 c	58,03	97,56 c	58,03	97,56 c	58,03	97,56 c
T F9-I a	61,76	82,89 b	58,61	80,89 b	58,61	90,44 b	58,61	90,44 b	44,95	128,89 bcd	44,95	119,44 bc	48,61	119,44 bc	48,61	119,44 bc	48,61	119,44 bc	48,61	119,44 bc
A F7- III a	49,10	110,33 b	56,45	85,11 b	56,45	124,56 ab	56,45	124,56 ab	58,09	98,11 d	58,09	134,78 bc	42,02	134,78 bc	42,02	134,78 bc	42,02	134,78 bc	42,02	134,78 bc
T G4-I a	53,92	99,89 b	42,47	112,44 b	42,47	113,22 ab	42,47	113,22 ab	52,25	111,78 bcd	52,25	228,00 a	1,91	228,00 a	1,91	228,00 a	1,91	228,00 a	1,91	228,00 a
T G4- II a	39,93	130,22 b	51,51	94,78 b	51,51	152,33 ab	51,51	152,33 ab	11,34	207,56 ab	11,34	197,11 ab	15,20	197,11 ab	15,20	197,11 ab	15,20	197,11 ab	15,20	197,11 ab
T G10- III c	61,40	83,67 b	58,67	80,78 b	58,67	102,11 b	58,67	102,11 b	29,47	165,11 abcd	29,47	140,56 bc	39,53	140,56 bc	39,53	140,56 bc	39,53	140,56 bc	39,53	140,56 bc
T G11- II a	26,04	160,33 ab	25,70	145,22 ab	25,70	114,11 ab	25,70	114,11 ab	15,90	196,89 abc	15,90	234,00 a	-0,67	234,00 a	-0,67	234,00 a	-0,67	234,00 a	-0,67	234,00 a

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Os valores são médias de três repetições, com três folhas cada.

4.4. Efeito de bactérias endofíticas do cafeeiro sobre a ferrugem, avaliado em mudas da cv. Mundo Novo.

Nos tratamentos em que as plantas de cafeeiro foram pulverizadas com suspensões de diferentes isolados de bactérias endofíticas 72 horas antes e após, 24 horas antes e após e concomitantemente à suspensão de uredíniosporos de *H. vastatrix*, foi verificado controle da ferrugem do cafeeiro nos períodos em que os isolados endofíticos foram aplicados antes e concomitantemente ao agente causal da ferrugem. Os resultados mostram ter havido maior eficiência no controle da doença pelos isolados T F2-II c, T G4-I a e T F7-Ib, com reduções superiores a 50% e/ou em mais de um período de aplicação. Os períodos de aplicação posteriores à aplicação dos propágulos de *H. vastatrix*, não surtiram efeito sobre o patógeno (Tabela 5).

Os resultados mais representativos de controle da ferrugem em discos de folha, em folhas destacadas e em plantas de cafeeiro, mostram que a eficiência de determinados isolados de bactérias endofíticas em controlar a ferrugem do cafeeiro, pode variar, de acordo com a época de aplicação do agente de biocontrole. De uma maneira geral, quando os endofíticos foram aplicados 72 e 24 horas antes e concomitantemente à aplicação de suspensão contendo propágulos do patógeno, os resultados foram superiores aos apresentados, quando da aplicação do endofítico 24 e 72 horas após o agente causal da ferrugem. Resultados semelhantes foram obtidos por Bettiol et al. (1994) e Bettiol e Várzea (1992), que, pulverizando diferentes concentrações de produtos à base de *Bacillus subtilis* 72 e 24 horas antes da aplicação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, em plantas de café da variedade Catuaí, obtiveram redução na porcentagem de folhas lesionadas e número de lesões por folha

entre 60% e 100%. Os resultados apresentados neste trabalho apresentam, também, correlação com os resultados apresentados por Bettiol e Várzea (1992), com redução da efetividade no controle do patógeno, quando o desafiante foi aplicado 24 horas após à suspensão com propágulos de *H. vastatrix* em discos de folhas de cafeeiro.

Deve-se destacar, também, a ação controladora da ferrugem por isolados endofíticos em mais de um tratamento, sugerindo que estes isolados podem estar agindo de outras maneiras, além da produção de metabólitos deletérios à doença, como indução de resistência sistêmica no hospedeiro e por competição por espaço e nutrientes ou pela ação de substâncias promotoras de crescimento.

Entre os isolados testados em discos de folhas, folhas destacadas e em plantas, os endofíticos T F2-II c, T F7-II a e T G4-I a podem ser considerados como os mais promissores e devem ser testados em condições de campo. É importante destacar, também, a propriedade de alguns isolados endofíticos em aumentar a severidade da ferrugem do cafeeiro (Tabela 3). Esse fato tem importância biológica, demonstrando que as interações com endófitas podem ter importância econômica, tanto no controle, como no aumento das doenças de plantas.

Tabela 5 – Número de lesões de ferrugem por folha em plantas de caféiro da cv. Mundo Novo, submetidas à suspensões de isolados de bactérias endofíticas 72 horas antes e após, 24 horas antes e após e concomitantemente à inoculação de *H. vastatrix*.

Tratamentos	- 72 horas			- 24 horas			0 horas			+ 24 horas			+ 72 horas		
	% de controle	Nº de lesões/ folha¹	% de controle	% de controle	Nº de lesões/ folha¹	% de controle	% de controle	Nº de lesões/ folha¹	% de controle	% de controle	Nº de lesões/ folha¹	% de controle	% de controle	Nº de lesões/ folha¹	% de controle
Água	0,00	143,20 abc	0,00	0,00	155,30 a	0,00	0,00	148,30 a	0,00	0,00	130,60 a	0,00	0,00	134,40 a	0,00
T F2-II c	46,37	76,80 ef	38,31	38,31	95,80 c	79,03	79,03	31,10 cd	-12,40	-5,21	146,80 a	-5,21	-5,21	141,40 a	-5,21
T F3-II a	5,94	134,70 abcd	29,04	29,04	110,20 abc	46,66	46,66	79,10 b	-24,12	-1,26	162,10 a	-24,12	-1,26	136,10 a	-1,26
T F7-I b	-21,79	174,40 a	1,22	1,22	153,40 ab	51,52	51,52	71,90 bc	-14,62	0,37	149,70 a	-14,62	0,37	133,90 a	0,37
T F7-II a	38,55	88,00 cdef	49,90	49,90	77,80 c	40,05	40,05	88,90 b	5,05	-3,94	124,00 a	5,05	-3,94	139,70 a	-3,94
T F9-I a	23,18	110,00 bcdef	36,00	36,00	99,40 bc	27,51	27,51	107,50 ab	0,54	1,26	129,90 a	0,54	1,26	132,70 a	1,26
A F7- III a	14,18	122,90 abcde	30,59	30,59	107,80 abc	49,49	49,49	74,90 bc	-2,07	-14,21	133,30 a	-2,07	-14,21	153,50 a	-14,21
T G4-I a	56,91	61,70 f	52,48	52,48	73,80 c	85,03	85,03	22,20 d	9,95	10,57	117,60 a	9,95	10,57	120,20 a	10,57
T G4- II a	15,85	120,50 abcde	26,85	26,85	113,60 abc	22,05	22,05	115,60 ab	-16,23	-7,59	151,80 a	-16,23	-7,59	144,60 a	-7,59
T G10- III c	-7,61	154,10 ab	48,29	48,29	80,30 c	38,10	38,10	91,80 b	-2,68	-7,51	134,10 a	-2,68	-7,51	144,50 a	-7,51
T G11- II a	41,90	83,20 def	48,74	48,74	79,60 c	39,72	39,72	89,40 b	2,60	-0,60	127,20 a	2,60	-0,60	135,20 a	-0,60

Coefficiente de variação = 33,60

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Os valores são médias de dez repetições, com duas folhas cada.

4.5. Identificação de bactérias endofíticas

Dos quarenta e quatro isolados testados, quatorze foram identificados através do perfil dos ácidos graxos da membrana celular, pelo cromatógrafo gasoso (MIDI) e pelo sequenciamento de genes, pela amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico em termociclador (Gene AMP PCR System 9700) (Tabela 6).

Tabela 6 - Isolados de bactérias endofíticas do cafeeiro identificadas.

Espécie	Código	Identificação
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> - <i>xylosoxydans</i>	T F4-III a	(PCR)
<i>Pantoea agglomerans</i>	T F5-III a	(82,6%- PCR)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	T F7-I a	(93,9%- MIDI)
<i>Pandoraea</i> sp.	T F7-III a	(91,4%-PCR)
<i>Pseudomonas putida</i> biotipo A	T F7-III b	(72,6%- MIDI)
<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo C	T F8-I a	(88,8%- MIDI)
<i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo A	T F9-I a	(80,0%- MIDI)
<i>Pseudomonas putida</i> biotipo A	T F9-I c F	(77%- MIDI)
<i>Pseudomonas putida</i> biotipo A	T F9-I d F	(90,7%- MIDI)
<i>Serratia liquefaciens</i>	T F11-III a	(70,7% - MIDI)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	T F12-I a	(75,1%- MIDI)
<i>Bacillus lentimorbus</i>	T G4-I a	(90,4%-MIDI)
<i>Bacillus lentimorbus</i>	T G5-II b	(95,8%-MIDI)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	T G10-II d	(80,7%- MIDI)

Dos isolados de bactérias identificadas, os que mais se destacaram nos testes, visando a verificação de sua capacidade em controlar a ferrugem do cafeeiro, foram:

Bacillus cereus (isolado T F9-I a) e *Bacillus lentimorbus* (isolado T G4-I a), que foram

eficientes, tanto nos testes de germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, quanto nos testes em discos de folhas, folhas destacadas e plantas de cafeeiro. Os isolados identificados restantes inibiram a germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, com exceção de *Kluyvera cryocrescens*, *Serratia liquefaciens* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Apesar de não ter apresentado nenhum tipo de controle nos testes realizados em cafeeiro, em pepino, *Kluyvera cryocrescens* se mostrou eficiente no controle do CMV (Cucumber Mosaic Virus), pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro (YAO et al., 1997).

A bactéria endofítica *Bacillus lentimorbus* (isolado T G4-1a), que se destacou nos testes visando o controle da ferrugem do cafeeiro, foi identificada como a responsável pela produção das substâncias antifúngicas alfa e beta-glucosidases, com ação inibidora do desenvolvimento de *Botrytis cinerea* (KIM et al., 2002) e pela liberação de substâncias voláteis que contribuem para a inibição do crescimento de *Fusarium roseum* var. *sambucinum* em tubérculos de batata (SAFDI et al., 2001).

Diversos trabalhos demonstram que *B. cereus* são capazes de promover o crescimento e aumento de biomassa de diversas espécies vegetais como helicônia (ASSIS et al., 2001), batata (SUNAINA et al., 2001; DHANBIR et al., 2000), tomate (SIMON et al., 2001) e trigo (RYDER et al., 1999). Além disso, podem penetrar ativamente nos tecidos e se disseminar inter e intracelularmente em seus hospedeiros, protegendo-os de *Fusarium roseum* var. *sambucinum*, em batatas, pela produção de substâncias fungitóxicas (MOHAMED et al., 2003). Diversos trabalhos demonstram que *B. cereus* são capazes de produzir uma diversidade de quitinases, com consistente ação sobre diversos fitopatógenos, como *Fusarium roseum* var. *sambucinum* (SAFDI et al., 2003), *Rhizoctonia solani* (MUHAMMAD; AMUSA, 2003; PLEBAN et al., 1997; RYDER et al. 1999), *Helminthosporium solani* (MARTINEZ et

al., 2002), *Ralstonia solanacearum* (DHANBIR et al., 2000; PARDEEP et al., 2002), *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* e *Helminthosporium maydis* (MUHAMMAD; AMUSA, 2003). Além do algodão (*Gossypium hirsutum*), *B. cereus* foi relatada como endofítica em milho comum e doce (*Zea mays*) e em plantas cítricas (*Citrus* spp.) por Di Fiore e Del Gallo (1995).

Dessa forma, a ocorrência de mais de uma forma de ação dessas bactérias endofíticas no controle de fitopatógenos, explica o seu destaque nos testes visando o controle da ferrugem do cafeeiro, com ação inibidora do desenvolvimento de *H. vastatrix* nos testes de germinação de uredíniosporos do fitopatógeno e nos testes em discos de folhas, folhas destacadas e em plantas de cafeeiro em diferentes épocas de aplicação do desafiante.

Há necessidade de serem realizados estudos em condições de campo, para se analisar o verdadeiro potencial das bactérias endofíticas no controle da ferrugem. Além disso, são necessários estudos para determinar os mecanismos de ação dessas bactérias e a melhor forma de introdução no hospedeiro. Outro aspecto que merece estudo é a avaliação dos efeitos dos agrotóxicos sobre as bactérias endofíticas, podendo estes, estimular as benéficas no controle da ferrugem, mas, também, podendo selecionar as que aumentam a severidade da doença.

5. CONCLUSÕES

- Isolados de bactérias endofíticas do cafeeiro inibem a germinação de uredíniosporos e/ou o desenvolvimento do tubo germinativo de *Hemileia vastatrix*.
- Isolados de bactérias endofíticas controlam parcialmente a ferrugem do cafeeiro em discos de folhas, folhas destacadas e em plantas. Os isolados endofíticos T G4-Ia (*Bacillus lentimorbus*), T F9-Ia (*Bacillus cereus*), T F2-IIc e T F7-Ib, foram os mais promissores no controle da ferrugem do cafeeiro.
- Isolados de bactérias endofíticas do cafeeiro aumentam parcialmente a severidade da ferrugem.

6. REFERÊNCIAS

- Agrianual 2001: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Argos Comunicação, 2001. 545 p.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR., J. T. Microbial production of plant hormones. **Plant and Soil**, v.113, p.1-8, 1991.
- ASSIS, S.M.P; MARIANO, R.L.R.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R.; MELLO, M.R.F. Eficiência, colonização e sobrevivência de rizobactérias promotoras de crescimento em *Heliconia psittacorum*. **Agrotrópica**, (No prelo), 2001.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.57-94.

BECKER-RATERINK, S.; MORAES, W.B.C.; QUIJANO-RICO, M. **La roya del cafeto: conocimiento y control**. Eschborn: GTZ, 1991. 281p.

BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v.44, p.980-988, 1998.

BETTIOL, W.; SAITO, M.L.; BRANDÃO, M.S.B. Control of coffee leaf rust with products based on *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. v.20, n.2, p.119-122, 1994.

BETTIOL, W.; VARZEA, V.M.P. Biological control of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) by *Bacillus subtilis* under controlled conditions. **Fitopatologia Brasileira**. v.17, n.1, p.91-95, 1992.

BOCK, R. Seasonal periodicity leaf rust and factor the severity of outbreaks in Kenya colony. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.45, n.3, p.289-300, 1962.

CARVALHO, V.L. de. **Influência de níveis de produção sobre a evolução da ferrugem e a composição química das folhas do cafeeiro**. 1991, 85f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.

CARVALHO, V.L. de; CHALFOUN, S.M. Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.193, p.27-35, 1998.

CENTURION, M.A.P.C. Controle biológico da ferrugem (*Uromyces phaseoli*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: CNPDA-EMBRAPA, 1991. p.365-382.

CHALFOUN, S.M. **Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 96p.

- CHALFOUN, S.M.; ZAMBOLIM, L. Ferrugem do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.42-46, 1985.
- DHANBIR, S.; RANA, S.K.; SINGH, D. Biocontrol of bacterial wilt/brown rot (*Ralstonia solanacearum*) of potato. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.30, n.3, p.420-421, 2000.
- DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.169-187.
- DUIJFF, B.J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots of by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v.135, p.325-334, 1997.
- ESKES, A.B. Resistance. In: KUSHALAPPA, A.C., ESKES, A.B. **Coffee rust: epidemiology, resistance, and management**. Boca Ratón: CRC Press, p. 171-291, 1989.
- ESKES, A.B. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.88, p.127-141, 1982.
- FAETH, S.H.; HAMMON, K.E. Fungal endophytes in oak trees: experimental analyses of interaction with leafminers. **Ecology**, v.78, p.820-827, 1997.
- GODOY, C.V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C.L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. **Manual de Fitopatologia: Doenças e seu controle**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.184-200, 1997.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HOLLIS, J.P. Bacteria in healthy potato tissues. **Phytopathology**, St Paul, v.41, p.350-366, 1951.

KIM, K.J.A.; YANG, Y.J.; KIM, J. Production of alpha-glucosidase inhibitor by beta-glucosidase inhibitor producing *Bacillus lentimorbus* B-6. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, n.6, p.895-900, 2002.

KLICH, M.A.; LAX, A.R.; LAND, J.M. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia**, v.116, p.77-80, 1991.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.L.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial Inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-44, 1989.

KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.; FERNANDEZ, C. Plant root bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, v.28, p.21-26, 1999.

KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKHAM, S. S. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* ssp. **Current Science**, v.72, p.331-334, 1997.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Attempts in the biological control of citrus mal secco (*Phoma tracheiphila*) using endophytic bacteria. **Difesa Delle Piante**, Bologna, v.17, n.1-2, p.43-49, 1994.

LOPES, C.A. **Biological control of *Pseudomonas avenae* with epiphytic bacteria isolated from corn plants**. 1986. 103f Tese (Doutorado) – University of Florida, Miami, 1986.

LUCON, C.M.M. **Caracterização de isolados de *Fusarium moniliforme* Sheld. e efeito da bacterização de sementes de milho (*Zea mays* L.) no controle do patógeno**. 1998. 132f Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G.C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. **Biological Control**, v.7, p.30-37,1996.

MARTINEZ, C.; MICHAUD, M.; BELANGER, R.R.; TWEDDELL, R.J. Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, n.12, p.1861-1868, 2002.

MATIELLO, J.B. **O café do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991, 320p.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. **Bulletin Srop**, v.14, p.328-331, 1991.

McKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, v.76, p.136-139, 1986.

MENELEY, J.C.; STRANGHELLINI, M.E. Establishment of an inactive population of *Erwinia carotovora* in healthy cucumber fruit. **Phytopathology**, St Paul, v.65, p.670-673, 1975.

MEZA, C.P.; LEGUIZAMON, J. Evaluation of formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Verticillium lecanii* Zimm (Viegas) in control of coffee rust, *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Fitopatologia Colombiana**. v.19, n.2, p.50-56, 1995.

MIGUEL, A.E.; MATIELLO, J.B.; ALMEIDA, S.R. Estudo de efeitos de doses e épocas de aplicação do fungicida sistêmico triadimefon em aplicações isoladas e associadas com fungicida cúprico no controle da ferrugem do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 13. 1975, Curitiba. **Resumos...**, Rio de Janeiro, p.30-31.

- MIZUBUTI, E.S.G, Controle da ferrugem do cafeeiro com *Bacillus subtilis*. 1992. 87f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.
- MOHAMED, C.; NAJLA, S.; OUELLETTE, G.B. Ultrastructure of in vivo interactions of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *B. thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum*, the causal agent of potato dry rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, n.1, p.41-54, 2003.
- M'PIGA.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, p.301-320, 1997.
- MUHAMMAD, S.; AMUSA, N.A. In vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost-inhabiting microbes. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.6, p.161-164, 2003.
- MUNDT, J.O.; HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied Environment Microbiology**, v.32, p.694-698, 1976.
- MUSSON, G. **Ecology and effects of endophytic bacteria in plants**. 1994. 114f. Thesis (Ms) - Auburn University, Alburn, 1994.
- NARISAWA, K.; TOLUMASU, S.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot formation in chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. **Plant Pathology**, Oxford, v.47, p.206-210, 1998.
- NOBLE, H.M.; LANGLEY, D.; SIDEBOTTOM, P.J.; LANE, S.J.; FISHER, P.J. An echinocandin from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. and *Pezicula* sp. in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, n.12, p.1439-1440, 1991.

- NUTMAN, E.J. Method of uredospore dispersal of the coffee leaf rust fungus *Hemileia vastatrix*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.43, n.3, p.509-515, 1960.
- ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FAVARET Fº, P. Café: (Re)conquista dos mercados. Rio de Janeiro, **BNDES Setorial**, v.10, p.3-56, 1999.
- PAN, M. J.; RADEMAN, S.; KUNERT, K.; HASTINGS, J.W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 by endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology**, v. 145, p.479-486, 1997.
- PARDEEP, K.; SOOD, A.K.; KUMAR, P. Management of bacterial wilt of tomato with VAM and bacterial antagonists. **Indian Phytopathology**, v.55, n.4, p.513-515, 2002.
- PETRINI, O . Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring Verlang, 1991. p.179-197.
- PETTIT, R.E.; TABER, R.A.; FOSTER, B.G. Occurrence of *Bacillus subtilis* in peanut kernis. **Phytopathology**, St Paul, v.58, p.254-255, 1968.
- PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET,I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.284-288, 1997.
- PUSEY, P.L. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. **Pesticide Science**, v.27, p.133-140, 1989.
- QIU, X.; PEI, Y.; WANG, Y.N.; ZHANG, F.X. Isolation of pseudomonads from cotton plants and their effect on seedling diseases. **Acta Phytophylacica Sinica**, Beijing, v.17, n.4, p.303-306, 1990.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1144-1154, 1996.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: localization and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.254-259, 1997a.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.577-582, 1997b.

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p.1158-1164, 1998.

RIBEIRO DO VALE, F.X.; ZAMBOLIM, L. Influência da temperatura e da umidade nas epidemias de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.149-207, 1996.

ROBERTS, F.M. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk & Br. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.46, n.1, p.27-48, 1963.

RYDER, M.H.; YAN, Z.; TERRACE, T.E.; ROVIRA, A.D.; TANG, W.; CORRELL, R.L.; YAN, Z.; TANG, W. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and *Rhizoctonia* root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, n.1, p.19-29, 1999.

SADFI, N.; CHERIF, M.; FLISS, I.; BOUDABBOUS, A.; ANTOUN, H. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. **Journal of Plant Pathology**, v.83, n.2, p.101-118, 2001.

SALGADO, T.J.; FUENTES- RAMIREZ, L.E. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacter*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.9, p.3676-3683, 1997.

SHARMA, V.K.; NOWAK, J. Enhancement of *Verticillium* wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.528-536, 1998.

SIEBER, T.; RIESEN, T.K.; MULLER, E.; FRIEND, P.M. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.122, n.4, p.289-306, 1988.

SILVA-ACUÑA, R. **Fatores que influenciam o progresso da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.)**. 1985 91f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1985.

SIMON, H.M.; SMITH, K.P.; DODSWORTH, J.A.; GUENTHNER, B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the spermosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.514-520, 2001.

SOARES, M.F.P. **Isolamento e seleção de microrganismos endofíticos com potencial para controle de *Crinipellis perniciosa* em cacau (*Theobroma cacao* L.) e monitoramento da atividade β - 1,3 glucanase e quitinase**. 2000. 88f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

STONE, J.K. **Foliar endophytes of *Pseudotsuga menziesli* (Mirb) Franco. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship.** 1986, 124f. Thesis (Ph D.) - University of Oregon, Eugene, 1986.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.162-167, 1998.

SUNAINA, V.; KISHORE, V.; SHEKHAWAT, G.S.; KHURANA, S.M.P.; PANDEY, S.K. Impact of plant growth promoting *Bacillus* bioagents on potato yields in field plot experiments. **Journal of the Indian Potato Association**, v.28, n.1, p.107-108, 2001.

TALAMINI, V. **Progresso da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) irrigado e fertirrigado por gotejamento.** 1999. 89f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

TERRONES, T.A.H. **Avaliação de modelo de previsão da ferrugem do cafeeiro para determinar épocas de aplicação de fungicida.** 1984. 68f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

TERVET, I.W.; HOLLIS, J.P. Bacteria in the storage organs of healthy plants. **Phytopathology**, St Paul, v.38, p.960-967, 1948.

TUZUN, S.; KUC, J.; KOMADA, H.; KIRITANI, K. Plant immunization: an alternative to pesticides for control of plant diseases in the greenhouse and field. 1991, Tsukuba. In: **Proceedings of the International Seminar “Biological Control of Plant Diseases and Virus Vector.** p.30-40.

XIAO, Q.; YAN, P.; YUNING, W.; FENGXIN, A. Isolation of pseudomonads from cotton plants and their effect on seedling diseases. **Acta Phytophylacica Sinica**, v.17, p.303-306, 1990.

YAO, C.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.; KLOPPER, J.W. Evaluation of induced systemic resistance and plant growth promotion in tomato with selected RPCP strains. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, Y.; HOMMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S. (Ed.) **Plant Growth-Promotion Rhizobacteria – Present status and future prospects**. Sapporo: OECD, 1997. p.285-288.

ZAMBOLIM, L.; MARTINS, M.C. P.; CHAVES, G.M. Café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.131, p.64-75, 1985.

ZAMBOLIM, L., RIBEIRO DO VALE, F.X., PEREIRA, A.A., CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: RIBEIRO DO VALE, F.X.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 1997. v.2, p.83-179.



