

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

Fernando Haddad<sup>1</sup>, Luiz Antonio Maffia<sup>2</sup>, Eduardo Seiti Gomide Mizubuti<sup>2</sup>, Reginaldo da Silva Romeiro<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/nº, 44380-000 Cruz das Almas, BA - Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitopatologia 36570-000 Viçosa, MG, Brasil

\* *In memoriam*

## **RESUMO**

O isolado B157 de *Bacillus thurigiensis* foi eficiente no biocontrole da ferrugem do cafeeiro em casa-de-vegetação e em cultivos orgânicos no campo. Para definir estratégias de uso do biocontrole, estudaram-se a dinâmica de sobrevivência do isolado B157 no filoplano de cafeeiro e a influência de diferentes fungicidas a base de cobre na sobrevivência do isolado, em casa-de-vegetação e campo. Para verificar o efeito de fungicidas cúpricos na sobrevivência de B157, pulverizou-se hidróxido de cobre em mudas ou sulfato de cobre em cafeeiros, em casa de vegetação e campo. Após a avaliação da densidade populacional de B157, verificou-se que em ambas as condições experimentais, a aplicação de fungicida, independente da fonte de cobre utilizada, reduziu a população da bactéria ao longo do tempo e o período de sobrevivência de B157. Em casa de vegetação, na primeira semana, a população de B157 reduziu-se, em média, 10 e 52% nas parcelas sem e com fungicida, respectivamente. A pulverização dos fungicidas reduziu o tempo de sobrevivência da bactéria, em casa de vegetação e no campo. Para controle da ferrugem no campo, poder-se-iam adotar duas estratégias: (i) pulverizar apenas o isolado B157 ou (ii) aplicar o isolado nas primeiras pulverizações e fungicidas cúpricos, posteriormente.

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

## **ABSTRACT**

### **Survival of *Bacillus thurigiensis* antagonistic to *Hemileia vastatrix* on coffee phylloplane.**

Isolate B157 of *Bacillus thurigiensis* was efficient in the control of coffee leaf rust in greenhouse and organic crop systems. To set strategies for rust biocontrol in the field, we studied the dynamics of survival of B157 isolate on coffee phylloplane under greenhouse and field conditions and the influence of cupric fungicides. To evaluate the effect of cupric fungicides on survival, we sprayed copper hydroxide or copper sulfate on coffee trees in the greenhouse and field conditions. At both experimental conditions, fungicide application, regardless of source of copper used, reduced the population throughout time and the survival time of B157. At the first week in the greenhouse, average reductions in B157 population were 52 and 10% with and without fungicide spray, respectively. Fungicides sprays reduced the survival time of B157, at both greenhouse and field. To

achieve rust control in the field two strategies could be adopted: (i) just sprays of B157 isolate or (ii) start using the B157 and use cupric fungicides in the next sprays.

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

## INTRODUÇÃO

A ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., é a principal doença do cafeeiro. Em cultivos orgânicos, produtos à base de cobre podem ser usados, entretanto, atualmente há um aumento nas restrições para seu uso (Carvalho et al., 2002). Com intuito de encontrar alternativas ao controle químico da doença, um isolado *Bacillus thuringiensis* (B157) foi selecionado, sendo eficiente no biocontrole da ferrugem do cafeeiro em casa-de-vegetação e em cultivos orgânicos no campo (Haddad et al., 2009). Uma característica importante do agente de biocontrole é sua capacidade de permanecer viável na superfície da planta hospedeira, ou seja, de competir com a microbiota existente e de multiplicar e persistir sob condições adversas (Fokkema, 1990). Assim, a adoção de um agente de biocontrole poderia diminuir a quantidade de fungicidas cúpricos usada, garantindo a eficiência de controle da doença. Para tanto é preciso verificar a compatibilidade entre B 157 e fungicidas cúpricos. Em vista do exposto, este trabalho objetivou definir estratégias de uso do biocontrole, estudar a dinâmica de sobrevivência do isolado B157 no filoplano de cafeeiro e a influência de diferentes fungicidas a base de cobre na sobrevivência do isolado, em casa-de-vegetação e campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Experimento em casa de vegetação:** Em folhas de mudas cultivadas em casa de vegetação, compararam-se os seguintes tratamentos: i- uma aplicação de B157-I+ (isolado B157 de *Bacillus thuringiensis* com insensibilidade a amoxicilina e ampicilina,  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada na concentração de  $\text{Abs}_{540\text{nm}} = 0,2$  em solução salina (0,85%) + Tween 20 (0,05%), no primeiro mês; ii- duas aplicações de B157-I+ (uma no primeiro e outra no segundo mês); iii- uma aplicação de B157-I+, no segundo mês; iv- uma aplicação de B157-I+ (no segundo mês), após 30 dias da aplicação de hidróxido de cobre; v- uma aplicação de B157-I+ (no segundo mês), após 30 dias da aplicação de Calda Viçosa (5g de sulfato de cobre  $\text{L}^{-1}$ ); e vi- aplicação de solução salina (0,85%) + Tween 20 (0,05%). As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24h após a aplicação de B157-I+. Para avaliar a sobrevivência de B157-I+, semanalmente durante 60 dias (nos tratamentos i e ii) ou 30 dias (nos tratamentos iii e iv), coletou-se uma folha planta<sup>-1</sup>, da qual retiraram-se 20 discos (1 cm de diâmetro), que foram transferidos para 40 mL de solução salina (0,85%) em Erlenmeyer, mantendo-se por 60 min em agitador orbital a 150 rpm. De cada lavado, semearam-se 100  $\mu\text{L}$  em meio 523 contendo 100  $\mu\text{g}$  de cada antibiótico selecionado, em placas de Petri, incubando-se a 30°C. Após 24 a 48 h, determinou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC).

**Experimento de campo:** Conduziu-se o experimento em cultivo de ‘Catuaí Vermelho’ com 12 anos, localizado na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. Os tratamentos e avaliações de sobrevivência foram como descrito anteriormente. Os experimentos foram em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições (duas plantas = uma unidade experimental). Para os dois experimentos, descreveu-se o efeito do tempo na sobrevivência de B157-I+ por meio de modelos de regressão linear simples, para cada período estudado e se comparou a taxa de decréscimo na população em função do tempo ( $r$ -pop) e a população inicial (Pop-In). Para ajuste dos modelos, transformaram-se os dados de UFC em  $\log(UFC+1)/cm^2$ . Também calculou-se a área abaixo da curva de sobrevivência de B157-I+ (AACS) para comparação dos tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao contrário do esperado para uma espécie bacteriana que produza endósporos, a densidade populacional de B157 caiu rapidamente já nas primeiras semanas, tanto em casa de vegetação (dados não apresentados) quanto no campo (Figura 1). Em geral, o isolado B157 não sobreviveu mais que 30 dias e, em determinada situação no campo, não sobreviveu além de 21 dias (Figura 1). Dessa forma, não houve acúmulo dos indivíduos de um mês para outro, apesar de se efetuarem pulverizações por dois meses consecutivos. A densidade populacional de um isolado de *B. subtilis*, antagonista de *Cercospora beticola*, declinou acentuadamente, já nos primeiros 4 dias da aplicação. Como houve correlação entre a densidade populacional de B157 e o controle da doença, provavelmente a eficiência do controle dependa da bactéria viva no campo (Collins et al., 2003). Quando a densidade populacional dos antagonistas relaciona-se à eficiência no controle da doença, é necessário manter essa população em nível suficiente para obter um controle efetivo. Dependendo do patossistema, essa densidade pode ser mantida mais facilmente ou não. No patossistema *H. vastatrix* - cafeeiro, a planta permanece exposta a infecções pelo patógeno por longo tempo. Como supõe-se que o antagonista atue inibindo a germinação dos esporos do patógeno pela produção de compostos antifúngicos (Haddad et al., 2007) é necessário que a densidade populacional do antagonista esteja em determinado nível para que esse efeito persista por um longo período de tempo. Assim, estudos futuros deverão focar o binômio concentração e intervalo de aplicação, para garantir a durabilidade da eficiência do agente de biocontrole, apesar de o isolado B157 ter sido tão eficiente quanto o hidróxido de cobre no controle da doença em condições de campo (Haddad et al., 2009). O controle biológico seria uma alternativa viável para reduzir a quantidade de fungicidas cúpricos na agricultura orgânica, apesar de ter-se observado redução na sobrevivência do isolado B157 por fungicidas cúpricos. A sobrevivência foi maior nos tratamentos onde não se aplicou cobre. Houve maior decréscimo da população do antagonista nas mudas em que se pulverizou fungicida cúprico, quando comparou-se  $r$ -pop dos tratamentos, independente do princípio ativo

utilizado (segundo o intervalo de confiança  $\alpha = 95\%$ ). A AACS foi maior nos tratamentos sem a utilização de fungicidas cúpricos (teste Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Para controle da ferrugem, recomendam-se de quatro a cinco pulverizações com fungicidas cúpricos, em intervalos mensais. Assim, aplicar-se-ia o isolado B157 na(s) primeira(s) pulverizações e pulverizar-se-ia um fungicida cúprico nas posteriores, visto que o cobre é importante para a agricultura, principalmente por ser um nutriente relacionado ao aumento da produtividade no cafeeiro. Como observado, o biocontrole da ferrugem do cafeeiro com o isolado B157 é alternativa viável. A disponibilização do isolado para uso comercial depende de resolver algumas questões, como obter um produto formulado. Deve-se, também, manter a procura por novos isolados eficientes para ser obter um manejo adequado da doença, sem agredir o ambiente.

#### **AGRADECIMENTOS:**

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

#### **LITERATURA CITADA:**

BETTIOL W; VÁRZEA VMP. 1992. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. *Fitopatologia Brasileira* 17: 91-95.

CARVALHO, VL; CUNHA, RL; CHALFOUN; SM. 2002. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. *Informe Agropecuário* 23: 101-114.

COLLINS, DP; JACOBSEN, BJ; MAXWELL B. 2003. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26, 224-232.

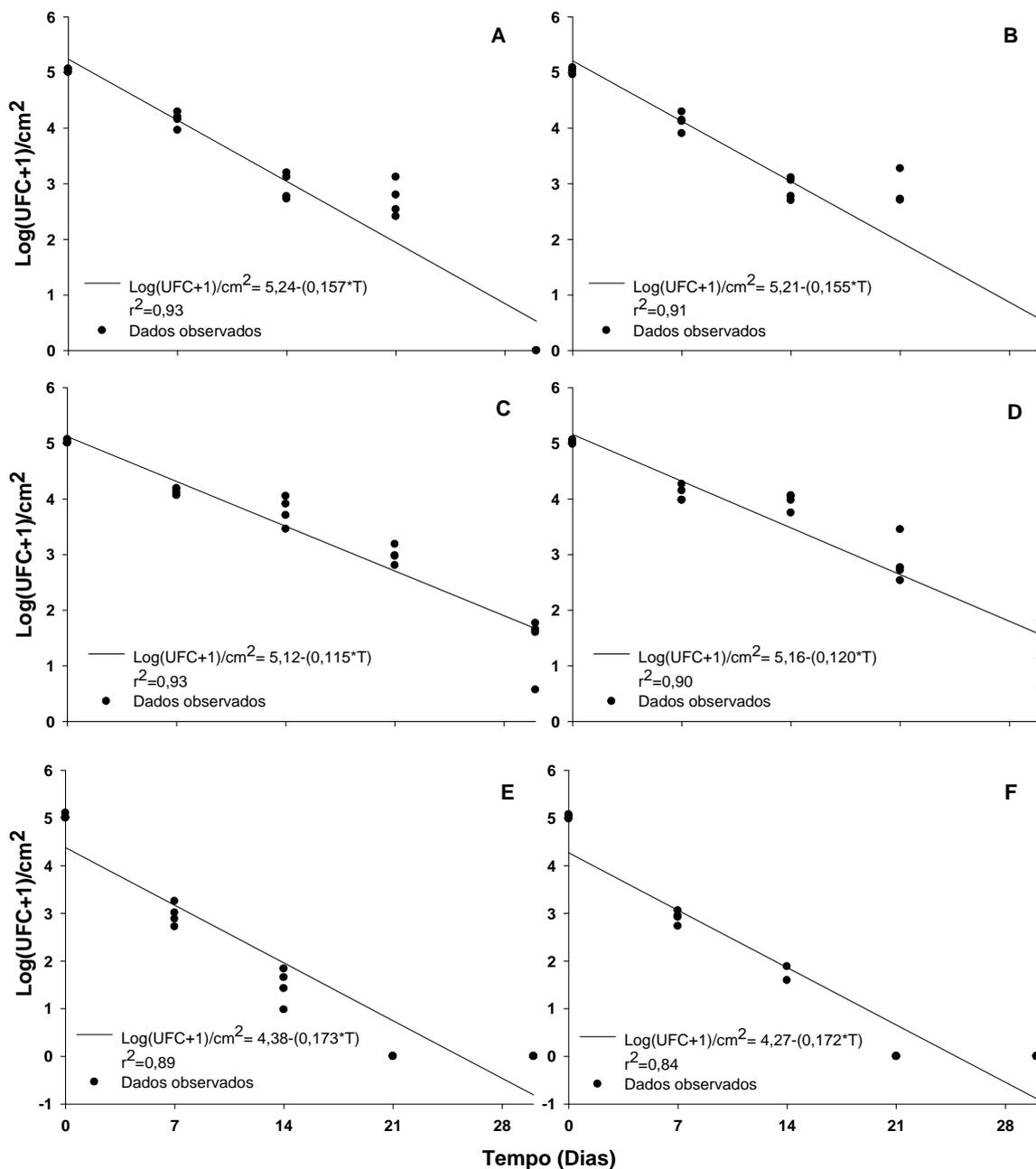
FOKKEMA NJE. 1990. Biological control of aerial plant surfaces. In: KOMADA H; KIRITANI K; BAY-PETERSEN J (eds.). *The biological control of plant diseases*. Taipei, Taiwan: Food & Fertilizer Thecnology Center for the Asian and Pacific Region. p. 41-48.

HADDAD F; MAFFIA LA; MIZUBUTI ESG; TEIXEIRA H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49: 114-119.

HADDAD F; MAFFIA LA; SARAIVA RM; MIZUBUTI ESG. 2007. Mecanismo de ação de bactérias antagonistas a *Hemileia vastatrix*. *Fitopatologia Brasileira* 32: 259.

ROMERO D; PÉREZ-GARCÍA A; RIVERA ME; CAZORLA FM; DE VICENTE A. 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Applied Microbiology Biotechnology* 64: 263–269.

SCHERM H; NGUGI HK; SAVELLE AT; EDWARDS JR. 2004. Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. *Biological Control* 29: 199 – 206.



1

2 Figura 1. Sobrevivência de *Bacillus thuringiensis* (B157-I+) em plantas de cafeeiro em condições de campo (Viçosa-MG). A  
 3 – uma aplicação de B157-I+, no primeiro mês; B – primeira aplicação de B157-I+; C – segunda aplicação de B157-I+; D –  
 4 aplicação de B157-I+ no segundo mês; E – uma aplicação de B157-I+ (no segundo mês), após 30 dias da aplicação de  
 5 hidróxido de cobre; F- uma aplicação de B157-I+ (no segundo mês), após 30 dias da aplicação de Calda Viçosa (5g de  
 6 sulfato de cobre /L).

7 Figure 1. Survival of *Bacillus thuringiensis* (B157-I+) in coffee plants under field conditions (Viçosa-MG). A - one  
 8 application of B157-I+; B - application of B157-I+ in the first month; C - second application of B157-I+; D - application of  
 9 B157-I+ in the second month; E – application of B157-I+ one month after applications copper hydroxide; F - application of  
 10 B157-I+ one month after applications copper sulfate.