

EFEITO *In vitro* E *In vivo* DE FILTRADOS DE RIZOBACTÉRIAS SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. do cafeeiro¹

In vitro and *In vivo* effect of rhizobacteria filtrates on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from coffee plants

Gilvane Aparecida de Carvalho², Mário Sobral de Abreu³, Denilson Ferreira de Oliveira⁴,
Mário Lúcio Vilela de Resende⁵, Maria Floriana Esteves de Abreu⁶

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de filtrados derivados de culturas de rizobactérias na inibição da germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* e confirmar sua ação antifúngica em relação à mancha manteigosa em mudas de cafeeiro. Foram conduzidos ensaios *in vitro* para testar 42 filtrados, identificando-se os de maior capacidade de inibir a germinação de esporos do fungo. Plântulas de café foram submetidas à inoculação com *Colletotrichum* e pulverização com quatro dos filtrados mais promissores. Os tratamentos constituíram um fatorial 4x4+2, combinando a aplicação de quatro filtrados com quatro modos de inoculação do fungo (ausência de inoculação e inoculação dois dias antes, junto, ou dois dias depois da aplicação dos filtrados). Uma testemunha absoluta e outra que recebeu somente o inóculo do fungo constituíram tratamentos adicionais. Após 35 dias, foram avaliados o crescimento do cafeeiro e a severidade da mancha manteigosa. Os filtrados apresentaram ampla variação quanto à atividade antifúngica *in vitro* e cinco deles inibiram completamente a germinação dos esporos. No experimento com planta, os filtrados tiveram eficácia similar contra a mancha manteigosa, com controle parcial da doença (35%). A aplicação dos filtrados teve efeito depressivo ao crescimento do cafeeiro, proporcionando menor produção de matéria seca em relação à testemunha absoluta.

Termos para indexação: Mancha manteigosa, biocontrole, antibiose, doença fúngica, substâncias naturais.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of rhizobacteria metabolites on *Colletotrichum gloeosporioides* spores germination and to confirm their antifungal activity against the buttery spot disease in coffee seedlings. *In vitro* bioassays, carried out with 42 rhizobacteria filtrates, allowed the identification of filtrates able to completely inhibit the spore germination. Coffee seedlings were inoculated with *Colletotrichum* and sprayed with four of the most promising filtrates. The treatments were organized in a 4x4+2 factorial scheme, combining the application of the four filtrates with four procedures of *Colletotrichum* inoculation (inoculation absence, inoculation two days before, together, or two days after the filtrates application). A check treatment (1) without filtrate or pathogen and other check (2) that received only the pathogen inoculation constituted the additional treatments. After 35 days, the vegetative growth of the seedlings and the severity of the buttery spot were assessed. All four filtrates showed similar effectiveness in the control of the buttery spot. The disease control was partial (35%). The filtrates application was harmful to coffee growth, providing less dry matter production in relation to the check treatment (1).

Index terms: Buttery spot, biocontrol, antibiosis, fungic disease; natural substances.

(Recebido para publicação em 10 de maio de 2004 e aprovado em 22 de março de 2005)

INTRODUÇÃO

A ocorrência de espécies de *Colletotrichum* tem sido relatada nas regiões cafeeiras brasileiras com certa frequência (ALVES & CASTRO, 1998; FIQUEIREDO & MARIOTTO, 1978; OROZCO MIRANDA, 2003). No início da década de 1990, Dorizzoto & Abreu (1993) constataram a presença de “mancha manteigosa” em

lavouras de *Coffea arabica* L. do município de Cristais MG, causando manchas nas folhas e morte dos cafeeiros. Na maioria das regiões produtoras do país, tem aumentado a incidência dessa doença provocada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, a qual pode causar perdas significativas de produtividade. Nechet & Abreu (2002) relatam, como sintomas da mancha manteigosa em folhas jovens,

1. Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora, Departamento de Fitopatologia – DFP da Universidade Federal de Lavras/UFLA – Caixa Postal 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG.

2. Engenheira Agrônoma, Mestre em Fitopatologia – Rua Dr. João Lacerda, 79 – 37200-000 – Lavras, MG.

3. Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Professor Titular, DFP/UFLA – msabreufla@bol.com.br

4. Químico., Ph.D., Professor Adjunto, Departamento de Química/UFLA – denilson@ufla.br

5. Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Professor Adjunto, DFP/UFLA. – mlucio@ufla.br

6. Engenheiro Florestal, D.Sc. DFP/UFLA.

a presença de manchas circulares de 2-10 mm de diâmetro, não-necróticas, de coloração verde-clara a amarela, ligeiramente deprimidas e menos brilhante que a superfície normal da folha. Em estágio avançado, uma necrose apresenta-se no centro das manchas que coalescem e a folha cai. Em ramos e frutos, surgem lesões menores, deprimidas e necróticas, de cor marrom-clara e bordas irregulares. Folhas e ramos novos são objeto de ataques mais intensos. As folhas caem, os ramos secam progressivamente e dá-se a morte da planta. Em lavouras adultas, com mais de 4 anos, as plantas muito susceptíveis já estão mortas.

É crescente a busca por técnicas de biocontrole de doenças na agricultura. Pesquisas têm sido realizadas para identificar substâncias naturais bioativas que possam ser empregadas no manejo fitossanitário, com menos efeitos negativos no ambiente (CASTRO, 1989). A rizosfera é um ambiente na interface solo-raiz onde proliferam numerosos microrganismos, os quais normalmente apresentam alguma relação com a planta, em maior ou menor grau de interação, podendo resultar em efeitos maléficos, nulos ou benéficos para o desenvolvimento vegetal (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Entre os fatores pelos quais certas rizobactérias favorecem o crescimento das plantas, tem-se o potencial de supressão de fitopatógenos por meio de diferentes processos, os quais podem envolver antibiose por produtos do metabolismo secundário (antibióticos) e a ativação de mecanismos de defesa da própria planta (CATTELAN & HARTEL, 2000). As rizobactérias do gênero *Bacillus* são promissoras no controle de diversos fitopatógenos e são conhecidas pela sua capacidade de produção de compostos antibióticos com ação antifúngica (BATISTA JÚNIOR et al., 2002; BETTIOL et al., 1997; KUPPER et al., 2003; MELO & VALARINI, 1995;). Freitas (1989) verificou que plântulas de café inoculadas com isolados de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* foram beneficiadas, apresentando maior peso de matéria seca em relação àquelas não inoculadas. Contudo, os processos envolvidos nesse estímulo do crescimento não foram caracterizados.

Quando cultivadas em laboratório, em meios apropriados, algumas rizobactérias realizam a exocitose, processo pelo qual diversos compostos metabólicos são liberados para o meio, permitindo que sua extração e purificação venham a ser feitas com relativa facilidade. O potencial do uso de substâncias derivadas do metabolismo de rizobactérias no controle de doenças fúngicas tem sido evidenciado em alguns trabalhos (BETTIOL et al., 1997; CATTELAN, 1994; KUPPER

et al., 2003). O pressuposto básico é que, uma vez colocadas em contato com as plantas de interesse, as substâncias presentes em extratos de culturas de rizobactérias são capazes de desencadear processos naturais de supressão de fitopatógenos, reduzindo a severidade ou eliminando o risco de infecção por fungos.

Com este trabalho teve-se por objetivo avaliar o efeito de filtrados derivados de culturas de rizobactérias na inibição da germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* e confirmar sua ação antifúngica em relação à mancha manteigosa em mudas de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Inicialmente, foi realizado um experimento *in vitro* visando a selecionar filtrados de rizobactérias com ação antimicrobiana contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da mancha manteigosa do cafeeiro. Posteriormente, os filtrados mais promissores foram testados num experimento *in vivo*, no qual plântulas de café foram submetidas a tratamentos combinando a aplicação dos filtrados e inoculação com *C. gloeosporioides*.

As rizobactérias utilizadas nos experimentos foram obtidas de raízes de plantas de capuchinha (*Tropaolum majus* L.), planta medicinal de flores comestíveis, café (*Coffea arabica* L.), tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.), pimentão (*Capsicum annum* L.) e de cacau (*Theobroma cacao* L.). As raízes foram lavadas, trituradas em liquidificador com sulfato de magnésio 0,1 M. A suspensão foi coada e transferida para meio de cultura TSA ("Tryptic Soy Agar", meio de cultura comercial utilizado na proporção de 40g/L de água) sólido. Após 24 horas, as colônias formadas foram repicadas para o meio de cultura TSB ("Tryptic Soy Broth", meio de cultura comercial utilizado na proporção de 40g/L de água) líquido, permanecendo em agitadores a 100 rpm por dez dias. Nesse período, as bactérias realizaram a exocitose, liberando compostos metabólicos para o meio. As soluções resultantes de cada cultura foram centrifugadas e os sobrenadantes, filtrados. Os filtrados foram mantidos a -10°C até o momento de sua utilização nos testes *in vitro* e *in vivo*.

O inóculo de *C. gloeosporioides* foi isolado de folhas colhidas de plantas de café com sintomas da mancha manteigosa. Os esporos (conídios) foram obtidos de uma cultura do fungo em meio de cultura MEA (extrato de malte) 2%. Após a esporulação, foi

feita lavagem das colônias com 5 mL de água esterilizada, retirando-se os conídios com auxílio de um pincel. As concentrações das suspensões foram ajustadas para 10^4 e 10^6 esporos mL^{-1} , para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

No experimento *in vitro*, avaliaram-se 42 filtrados de rizobactérias, testados na sua concentração original (100%) e em outras quatro concentrações, sendo feitas diluições com água destilada a fim de se obter 50%; 25%; 12,5% ou 6,25% do filtrado na solução resultante. Os testes foram feitos em lâminas escavadas com três cavidades. Cada cavidade representou uma repetição. Os tratamentos foram aplicados colocando-se, nas cavidades das lâminas, 40 μl da solução contendo o filtrado e 40 μl da suspensão de esporos do fungo. Utilizou-se ainda uma testemunha contendo apenas a suspensão de esporos, sem a adição de filtrados. A atividade antifúngica dos filtrados foi avaliada mediante análise microscópica aleatória de 200 esporos, verificando a ocorrência de inibição da germinação deles.

Quatro dos filtrados mais promissores, identificados pelos códigos D1-5411, D1-5628, D1-5825 e D1-5729 (referenciados no texto como F1, F2, F3 e F4, respectivamente), foram estudados para confirmação de sua ação antifúngica contra *C. gloeosporioides* e controle da mancha manteigosa em mudas de cafeeiro. As plantas de café utilizadas no experimento *in vivo* foram da cultivar Icatu Amarelo IAC-3282, considerada moderadamente suscetível ao *Colletotrichum gloeosporioides* (OROZCO MIRANDA, 2003). As sementes foram desinfestadas com álcool e com hipoclorito de sódio, sendo então colocadas em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e incubadas a 25°C por cinco dias, no intuito de eliminar aquelas que apresentassem desenvolvimento de patógenos em sua superfície. As sementes

aparentemente isentas de patógenos foram postas a germinar em papel de filtro umedecido. No momento do surgimento da radícula, foram transferidas para substrato comercial Bioplant[®] em copos plásticos de 200 mL, dispostas em número de cinco por recipiente, permanecendo por 30 dias em câmara de crescimento a 25°C .

Quando as plântulas apresentavam hipocótilos na fase de “palito de fósforo”, com cerca de três centímetros de altura, foram aplicados os tratamentos. O experimento foi instalado em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, num esquema fatorial $4 \times 4 + 2$, combinando a pulverização com cada um dos quatro filtrados de rizobactérias (F1, F2, F3 e F4) e quatro modos de inoculação com o *C. gloeosporioides*: 1- ausente (sem inoculação do patógeno), 2- antes (inoculação do patógeno dois dias antes da aplicação do filtrado), 3- junto (inoculação do patógeno no momento da pulverização com filtrado) e 4- depois (inoculação do patógeno dois dias depois da aplicação do filtrado). Em dois tratamentos adicionais, foram empregadas uma testemunha absoluta, que recebeu pulverização com água pura, e uma outra, que somente recebeu inoculação com *C. gloeosporioides*. Cada parcela experimental foi constituída de dez copos plásticos com cinco plantas cada um (50 plantas por repetição). Nos tratamentos pertinentes, a inoculação foi realizada com pulverizador manual, sendo as plântulas de cafeeiro colocadas em câmara úmida 24 horas antes. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro e umidade relativa próxima ao ponto de saturação (100%).

Aos 35 dias após a aplicação dos filtrados, avaliou-se a severidade da mancha manteigosa nos tratamentos. Foi usada uma escala de notas adaptada e modificada de Vossen et al. (1976) (Tabela 1).

TABELA 1 – Critérios de avaliação do espectro de reação a *Colletotrichum* sp. apresentado por plantas de café.

Nota (grau de sintomas)	Severidade / Sintomas
1	Ausência de reação visível
2	Lesões iniciais nas folhas
3	Lesões acentuadas nas folhas
4	Lesões com início de estrangulamento no hipocótilo
5	Lesões acentuadas no hipocótilo
6	Planta morta

Considerando-se esses dados, foi determinado o índice de doença (ID) (CIRULLI & ALEXANDER, citados por LIMA, 1981), aplicando-se a fórmula $ID = \frac{\sum (F \times V)}{(N \times X)} \times 100$, em que F é o número de plantas com determinado grau de sintomas; V representa o grau de sintomas; N é número total de plantas inoculadas; e X corresponde ao grau máximo de sintomas. Foram determinadas também a altura das plantas e a matéria seca da parte aérea e das raízes.

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análises de variância. Para os filtrados testados no experimento *in vitro*, foram ajustados modelos de regressão para germinação de esporos de *C. gloeosporioides* em função das concentrações de filtrado no meio. Para cada variável avaliada no experimento *in vivo*, as médias relacionadas aos tratamentos que constituíram o fatorial foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os tratamentos adicionais foram comparados à média do fatorial pelo teste de Scheffé ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Filtrados de rizobactérias com ação antifúngica *in vitro*

Houve interação significativa entre filtrados e concentrações na inibição da germinação dos esporos de *C. gloeosporioides*. Verificaram-se distintos níveis de atividade antifúngica dos filtrados, e alguns apresentaram efetiva capacidade inibitória do fungo. Dos 42 filtrados testados, cinco chegaram a impedir completamente a germinação dos esporos, o que ocorreu quando o filtrado foi utilizado sem diluição alguma (Figura 1). Desse modo, definiu-se que 100% seria a concentração ótima a ser utilizada no experimento *in vivo*.

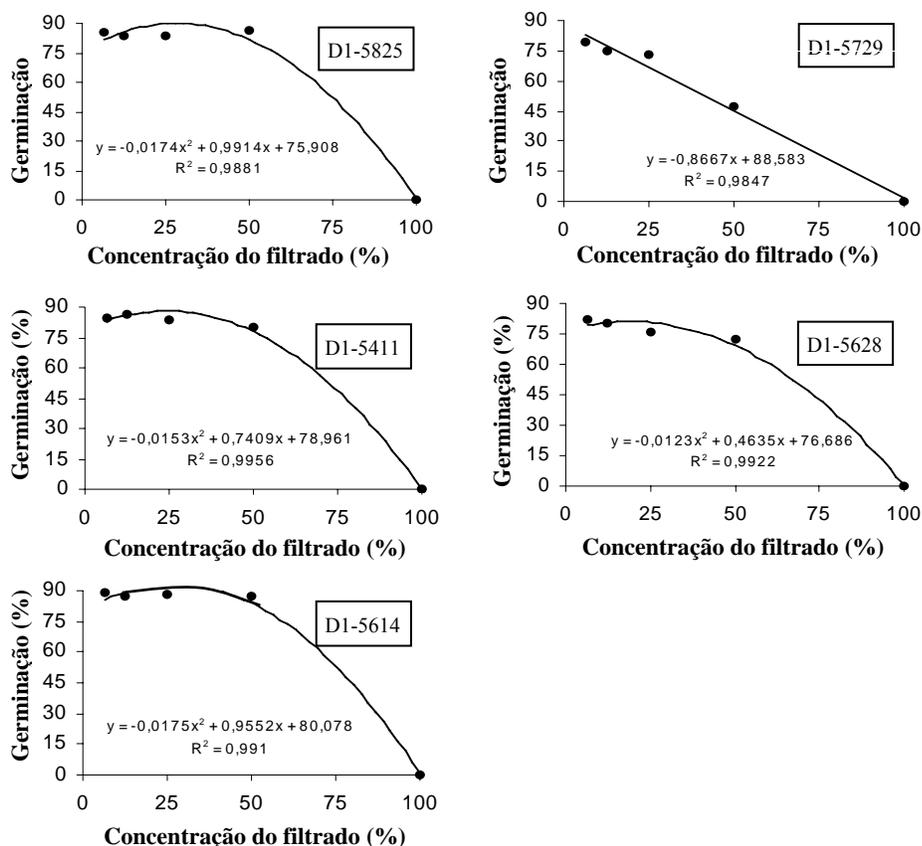


FIGURA 1 – Germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de filtrados de rizobactérias em concentrações crescentes.

Em outros trabalhos também se evidencia grande variabilidade de resultados em estudos de antagonismo de rizobactérias a fungos fitopatogênicos de diversas culturas. Diferentes isolados, mesmo que pertencentes a um único gênero ou espécie de rizobactéria, apresentam efeitos variáveis no controle de um dado patógeno (BATISTA JÚNIOR et al., 2002; FREITAS & PIZZINATTO, 1997; KUPPER et al., 2003; WEI et al., 1991). Entre os mecanismos de antagonismo, a antibiose, possivelmente, é o que está mais relacionado aos efeitos observados no presente estudo. Substâncias com propriedades antimicrobianas produzidas durante o cultivo estariam presentes nos extratos dessas culturas (BETTIOL et al., 1997; CATTELAN, 1994; KUPPER et al., 2003) e exerceriam efeito antifúngico quando em contato com os esporos do *C. gloeosporioides*.

Efeito de filtrados de rizobactérias no controle da mancha manteigosa

Houve interação significativa dos fatores, filtrados de rizobactérias e modos de inoculação do *C. Gloeosporioides*, para as variáveis de crescimento do cafeeiro. Quanto à altura de planta, na média, os tratamentos do fatorial não diferiram significativamente da testemunha absoluta ou da testemunha inoculada com o fungo (Tabela 2). Na ausência do *C. gloeosporioides*, as plantas que receberam os filtrados F1 e F3 apresentaram tendência de maior crescimento em relação à testemunha absoluta. Esse fato é indicativo de que esses filtrados podem ter algum efeito estimulador do crescimento em altura, o qual não estaria ligado a mecanismos de bioproteção.

Quando a inoculação com o fungo foi realizada juntamente com a aplicação dos filtrados (modo de inoculação “junto”), não se observou diferença entre esses (Tabela 2). Esse resultado confirma a similaridade dos resultados obtidos com os quatro filtrados no experimento *in vitro*, no qual o contato dos produtos com os esporos de *Colletotrichum* também se deu de forma direta e imediata. Já quando a inoculação foi feita antes ou depois da pulverização dos filtrados, os tratamentos com F4 apresentaram menor altura, ao passo que F2 foi o produto que proporcionou maior crescimento (Tabela 2). Em valores absolutos, o filtrado F4 tendeu a ocasionar menores alturas para todos os modos de inoculação, o que pode ser indicativo de sua menor eficácia, além de um possível efeito fitotóxico, visto que esse filtrado também proporcionou menor altura na ausência do patógeno.

Em termos de produção de matéria seca, os principais efeitos de tratamentos foram observados tanto no peso seco total (Tabela 3), quanto isoladamente, na parte aérea e nas raízes. A testemunha absoluta foi estatisticamente superior à média do fatorial. Na realidade, nenhum dos tratamentos do fatorial proporcionou produção de matéria seca numericamente equiparável à da testemunha absoluta, evidenciando que quando a planta recebeu aplicação de filtrado, na presença ou não do inóculo de *C. gloeosporioides*, houve efeito depressivo para a acumulação de matéria seca nas plantas. A ausência de diferença significativa da testemunha *Colletotrichum* em relação ao fatorial é indicativa de que um eventual controle do patógeno parece não ter resultado em maior crescimento das plantas.

TABELA 2 – Altura (cm) de plantas de cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	4,66 a A	4,32 a AB	4,63 a A	3,92 a B	4,38
Antes	3,88 b AB	4,32 a A	3,89 b AB	3,47 a B	3,89
Junto	3,87 b A	3,61 b A	3,74 b A	3,75 a A	3,74
Depois	3,84 b AB	3,99 ab A	3,87 b AB	3,48 a B	3,79
Média	4,06	4,06	4,03	3,65	
Testemunha absoluta			4,37 ns		
Testemunha <i>Colletotrichum</i>			3,33 ns		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffê ($p < 0,05$).

TABELA 3 – Matéria seca (g) total de plantas de cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	3,79 a A	3,14 a B	3,78 a A	3,69 a AB	3,60
Antes	3,38 ab AB	3,26 a AB	3,61 a A	2,94 b B	3,30
Junto	3,02 b AB	2,93 a B	3,55 a A	3,45 ab AB	3,24
Depois	3,74 a A	3,07 a B	2,25 b C	3,49 ab AB	3,14
Média	3,48	3,10	3,30	3,39	
Testemunha absoluta			4,50 *		
Testemunha <i>Colletotrichum</i>			3,33 ns		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* = a testemunha em questão difere (>) da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffê ($p < 0,05$).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffê ($p < 0,05$).

Por ocasião das avaliações do experimento, observou-se que as plantas de todos os tratamentos que foram pulverizados com filtrados apresentavam manchas cloróticas nas folhas, sintoma não presente nos dois tratamentos testemunha. Isso sugere que, na concentração em que foram utilizados, os filtrados podem ter provocado algum distúrbio fisiológico ou fitotoxidez ao cafeeiro. Bettiol et al. (1997) obtiveram menor peso fresco de plantas quando uma solução com concentração mais elevada de metabólitos de *Bacillus subtilis* foi aplicada em pepino.

Na avaliação da severidade da mancha manteigosa, por meio do índice de doença, a resposta aos tratamentos foi dependente do modo de inoculação, não havendo efeito de filtrados ou interação dos fatores. Desse modo, considerando a média dos quatro filtrados, na ausência do *C. gloeosporioides*, o índice de doença foi menor em relação à presença do fungo inoculado antes, junto ou após a aplicação dos filtrados (Tabela 4). Na média do fatorial, o índice de doença não foi significativamente diferente em relação à testemunha absoluta, mas foi menor em relação à testemunha *Colletotrichum*. Além disso, pode-se verificar que, numericamente, o índice de doença determinado para cada tratamento do fatorial sempre ficou abaixo do valor obtido para a testemunha *Colletotrichum* (Tabela 4). Portanto, depreende-se que os metabólitos presentes nos filtrados rizobacterianos proporcionaram redução na severidade da mancha manteigosa.

Não há diferenças nítidas entre os filtrados em relação à capacidade de controle da mancha manteigosa (Tabela 4), o que está coerente com a eficácia similar dos quatro produtos, obtida no experimento *in vitro*. Entretanto, é preciso observar que, no experimento com plantas, o controle da doença pela pulverização dos filtrados foi apenas parcial, ou seja, cerca de 35%. A eficácia de alguns isolados de rizobactérias ou de seus metabólitos no biocontrole pode ser restringida se as condições do ambiente forem altamente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (KUPPER et al., 2003). No caso da mancha manteigosa, as condições experimentais de alta umidade (câmara úmida), a temperatura próxima de 25°C e a idade do tecido (muito tenro) no momento da inoculação podem ter favorecido uma maior severidade da doença.

O uso de substâncias derivadas do metabolismo de rizobactérias tem se mostrado promissor no controle de doenças fúngicas em diversos patossistemas como *Hemileia vastatrix* em cafeeiro, *Sphaerotheca fuliginea* em pepino (*Cucumis sativus* L.) e abóbora (*Curcubita pepo* L.) (BETTIOL et al., 1997), *Colletotrichum acutatum* em citros (*Citrus* spp.) (KUPPER et al., 2003) e vários fungos em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (CATTELAN, 1994). No caso específico da rizobactéria *Bacillus subtilis*, a antibiose parece ser o principal mecanismo de supressão de fungos (BETTIOL et al., 1997; KUPPER et al., 2003). Contudo, diversos autores têm relatado dificuldades associadas às

pesquisas com rizobactérias (CATTELAN, 1994; CHET et al., 1990; FREITAS & PIZZINATTO, 1997; HOWIE & ECHANDI, 1983; LUZ, 2001; WILLIAMS & ASHER, 1996;). A não-confirmação *in vivo* dos resultados obtidos *in vitro* e a enorme variação das respostas observadas em estudos com diferentes plantas, patógenos e condições experimentais, bem como em diferentes locais e épocas de avaliação, representam grandes obstáculos ao desenvolvimento de tecnologias de biocontrole aplicáveis.

Embora a determinação do índice de doença não tenha evidenciado maiores diferenças entre os tratamentos (Tabela 4), verificou-se uma tendência de maior mortalidade de plantas (aproximadamente 3%) no tratamento com F4 e *C. gloeosporioides* aplicados no mesmo dia, e nos tratamentos em que o fungo foi inoculado dois dias após a aplicação dos filtrados (Figura 2).

Uma menor atividade antifúngica de compostos rizobacterianos aplicados com grande antecedência em relação à inoculação com o patógeno também foi observada por Bettioli et al. (1997). Os autores detectaram menor percentual (90%) de redução das

lesões nas folhas quando pulverizaram metabólitos de *Bacillus subtilis* 24 horas antes da inoculação de *Sphaerotheca fuliginea* em pepino. Quando a pulverização foi feita uma hora antes, uma hora depois ou 24 horas depois da inoculação, o controle das lesões foi em torno de 99%.

No presente estudo, é possível que quando a inoculação de *Colletotrichum* foi feita 48 horas depois da pulverização das plantas de café com os filtrados, tenha ocorrido alguma degradação das substâncias antifúngicas presentes, reduzindo sua eficácia em proteger as plantas. Por esse raciocínio, deduz-se que esses filtrados devem ter efeito principalmente curativo, e não preventivo, da mancha manteigosa. Além disso, o mecanismo pelo qual os filtrados atuam no controle da doença deve estar relacionado à ação direta de substâncias antimicrobianas, provavelmente antibióticos, sobre o desenvolvimento do fungo.

A atuação dos filtrados sobre processos fisiológicos das plantas justifica o desenvolvimento de pesquisas adicionais para extração, purificação e identificação de compostos, visando a elucidar a natureza química dos metabólitos contidos nos filtrados testados.

TABELA 4 – Índice de doença (%) da mancha manteigosa do cafeeiro em resposta à aplicação de filtrados de rizobactérias e inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Inoculação	Filtrados				Média
	F1	F2	F3	F4	
Ausente	16,77	16,78	16,95	17,04	16,88 b
Antes	19,57	19,75	20,52	20,50	20,09 a
Junto	19,65	19,14	19,29	21,45	19,88 a
Depois	19,56	20,39	22,70	20,01	20,67 a
Média	18,89 A	19,01 A	19,75 A	19,86 A	
Testemunha absoluta					16,67 ns
Testemunha <i>Colletotrichum</i>					29,85 *

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* = a testemunha em questão difere (>) da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ($p < 0,05$).

ns = a testemunha em questão não difere da média dos tratamentos do fatorial pelo teste de Scheffé ($p < 0,05$).

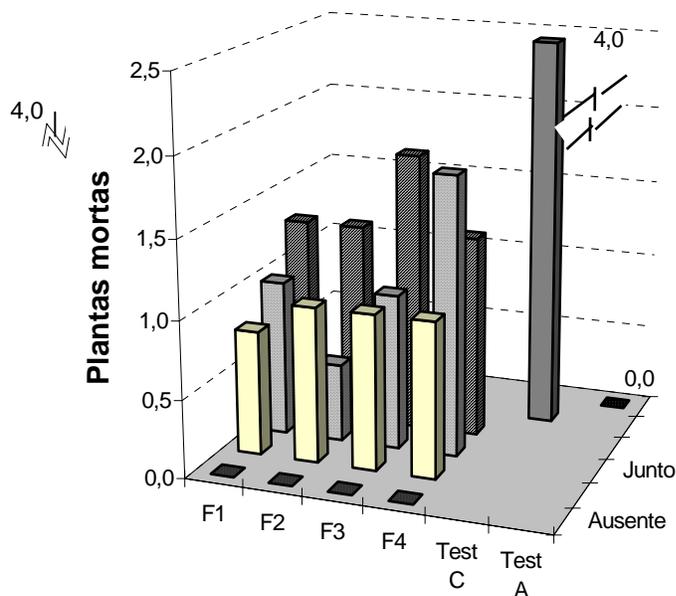


FIGURA 2 – Número médio de plantas mortas nos tratamentos do experimento com o cafeeiro.

CONCLUSÕES

Os filtrados de rizobactérias apresentaram ampla variação quanto à atividade antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo cinco mais promissores, chegando a inibir totalmente a germinação de esporos do fungo.

Os quatro filtrados avaliados em plântulas de café tiveram eficácia parcial no controle da mancha manteigosa. A aplicação dos filtrados resultou em efeito depressivo ao crescimento do cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.; CASTRO, H. A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 4-7, jan./mar. 1998.

BATISTA JÚNIOR, C. B.; ALBINO, U. B.; MARTINES, A. M.; SARIDAKIS, D. P.; MATSUMOTO, L. S.; AVANZI, M. A.; ANDRADE, G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, ago. 2002.

BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 281-287, 1997.

CASTRO, A. G. **Defensivos agrícolas como um fator ecológico**. Jaguariúna: EMBRAPA- CNPDA, 1989. 20 p. (Documento, 6).

CATTELAN, A. J. Antagonismo de *Pseudomonas* do grupo fluorescente a fungos fitopatogênicos de solo e de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 37-42, jan./abr. 1994.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Tópicos em Ciência do Solo**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 213-234, jan./abr. 2000.

CHET, I.; ORDENTLICH, A.; SHAPIRA, R.; OPPENHEIM, A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 129, n. 1, p. 85-92, Dec. 1990.

DORIZZOTTO, A.; ABREU, M. S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum coffeanum* Noack e *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 26., 1993, Aracajú. **Suplementos...** Brasília: SBF, 1993. v. 18, p. 306.

- FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P. R. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz atacando frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **O Biológico**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 25-26, jan. 1978.
- FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 31-34, jan./abr. 1989.
- FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 23, n. 1, p. 36-41, jan./mar. 1997.
- HOWIE, W. J.; ECHANDI, E. Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 127-132, 1983.
- KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, set. 2003.
- LIMA, E. F. **Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *Cephalosporioides* A. S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose**. 1981. 47 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, viçosa, 1981.
- LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 16-20, mar. 2001.
- MELO, L. S.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 326-330, maio/ago. 1995.
- MOREIRA, M. S. F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.
- NECHET, K. L.; ABREU, M. S. Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1135-1142, nov./dez. 2002.
- OROZCO MIRANDA, E. F. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- VOSSEN, H. M. van der; COOK, R. T. A.; MURAKURU, G. N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noak (sensu Hindorf) in *Coffea arabica* L. I. Methods of preselection for resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 3, p. 733-745, 1976.
- WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, Dec. 1991.
- WILLIAMS, G. E.; ASHER, M. J. C. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. **Crop Protection**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 479-486, Oct. 1996.