

CLAUDIA CRISTINA FERREIRA DOS SANTOS

**CONTROLE DA FERRUGEM DO EUCALIPTO (*Puccinia psidii*)
COM *Bacillus subtilis*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, sub-área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador:

Prof. HILÁRIO ANTÔNIO DE CASTRO

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1995

CLAUDE L. BURNETT

1910

1

1910

39263

CLAUDIA CRISTINA FERREIRA DOS SANTOS

**CONTROLE DA FERRUGEM DO EUCALIPTO (*Puccinia psidii*)
COM *Bacillus subtilis*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, sub-área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

CDD-635.96
634.9343
635.452

Orientador:

Prof. HILÁRIO ANTÔNIO DE CASTRO

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1995

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Santos, Claudia Cristina Ferreira dos

Controle da ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*) com *Bacillus subtilis* /
Claudia Cristina Ferreira dos Santos. -- Lavras : UFLA, 1995.
37 p. : il.

Orientador: Hilário Antônio de Castro.
Dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Eucalipto - Ferrugem. 2. Controle biológico. 3. *Bacillus subtilis*.
4. *Puccinia psidii*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

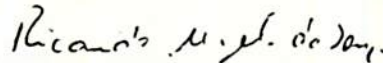
CDD-632.96
634.97342
632.425

CLAUDIA CRISTINA FERREIRA DOS SANTOS


CONTROLE DA FERRUGEM DO EUCALIPTO (*Puccinia psidii*) COM *Bacillus subtilis*.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, sub-área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 23 de fevereiro de 1995


Prof. Ricardo Magela de Souza


Prof. Vicente Paulo Campos


Prof. Hilário Antônio de Castro
(Orientador)

Ao meu pai, Geraldo dos Santos (IN MEMORIAN)

**À minha muito querida mãe, Vera
por tudo que hoje eu tenho e sou**

OFEREÇO

**Ao meu querido Marco Aurélio
e ao neném que vai chegar,
pela alegria de ser mãe**

DEDICO

SUMÁRIO

	página
AGRADECIMENTOS	iii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERENCIAL TEÓRICO	3
A Ferrugem do Eucalipto	3
Controle Biológico	8
SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> DE <i>Puccinia psidii</i> A <i>Bacillus subtilis</i>	13
SENSIBILIDADE <i>in vivo</i> DE <i>Puccinia psidii</i> A <i>Bacillus subtilis</i>	22
CONSIDERAÇÕES FINAIS	36

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao prof. Hilário Antônio de Castro, pelas sugestões, dedicação e orientação.

Ao pesquisador Wagner Bettiol (CNPMA/EMBRAPA), pelo envio dos isolados de *Bacillus subtilis*, pelos ensinamentos, amizade e grande exemplo de competência profissional que muito influenciaram minha formação técnica e pessoal.

Ao amigo Américo Angeli Júnior, pela incansável dedicação prestada em todas as fases deste trabalho.

Às amigas Maria Aparecida (Psida) e Eloísa, pela colaboração na condução dos ensaios e pelo constante apoio, desde os primeiros trabalhos em fitopatologia.

Aos funcionários da Biblioteca Central - UFLA, sempre solícitos em ajudar.

Aos funcionários da Coordenadoria de Pós-Graduação - UFLA, pela prestação de serviços.

Às amigas Neila e Luciane da Associação de Pós-Graduandos - UFLA, pela amizade e serviços prestados.

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), pela doação das sementes de eucalipto utilizadas neste trabalho.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Fitossanidade, especialmente, Gina, Carlos Alberto Oliveira, Valéria, Antônio Tavares, Helga, Wilson, Karen, Soraya, Agenor, Cléber, Lisiane, Ana Maria, D. Cida, D. Zélia e Cleuza, pelo estímulo nos momentos difíceis e alegria nos de descontração.

À amiga Denise Garcia Santana (UFU), pelo auxílio prestado nas análises estatísticas.

À minha mãe Vera que, sempre acreditando em meu entusiasmo pela Agronomia, propiciou-me as condições necessárias para a minha formação profissional.

Ao meu esposo Marco Aurélio, pela dedicação nos trabalhos de digitação e constante carinho manifestado durante esta jornada.

INTRODUÇÃO GERAL

A eucaliptocultura brasileira, ocupando considerável extensão de hectares de terra voltados para produção econômica, é consagrada como uma das mais importantes atividades que contribuem direta ou indiretamente para o aumento de divisas líquidas para o país.

A madeira produzida constitui-se em elemento da maior importância para as empresas do parque siderúrgico, pois o carvão vegetal é um dos componentes indispensáveis à produção do ferro-gusa e aço, além de representar um fator estratégico para a indústria de papel e celulose. O desenvolvimento dessa atividade, coloca o Brasil em quarto lugar no mundo em implantação de maciços florestais homogêneos, com uma área de 5,5 milhões de hectares e um incremento em torno de 400 mil hectares anuais (Afonso Neto, 1986).

Todavia, o rendimento médio nacional da cultura pode ser afetado por vários fatores como as doenças abióticas e/ou bióticas. Dentre estas últimas, a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter é de ocorrência comum em eucaliptais suscetíveis à doença, com até dois anos de idade, em brotações após o

corte ou até o estágio fenológico B, podendo causar severos danos tanto no viveiro como no campo (Ferreira, 1989).

O plantio comercial de espécies e procedências resistentes; o escape, explorando-se a característica de precocidade para crescimento em altura ou evitando-se o corte raso em épocas mais favoráveis à doença; e o emprego de fungicidas protetores têm sido as medidas recomendadas para o controle da ferrugem, juntamente com o controle pela resistência genética (Ferreira, 1986).

Há fungicidas eficientes no controle da ferrugem, entretanto o uso indiscriminado desses produtos pode trazer consequências indesejáveis ao ambiente. Na busca de alternativas para o controle de doenças, espécies e procedências resistentes associadas ao controle biológico podem constituir-se em soluções interessantes.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de isolados de *Bacillus subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii* *in vitro* e *in vivo* e estudar a sua influência sobre alguns componentes epidemiológicos da doença.

REFERENCIAL TEÓRICO

A Ferrugem do Eucalipto

Embora existam vagas menções de ferrugens atacando plantas de eucalipto no Brasil em 1912 (Joffily, 1944), a primeira referência válida a propósito de um representante da ordem Uredinales, parasitando eucalipto, foi apresentada em 1929 (Gonçalves, 1929), onde menciona-se *Uredo* sp. sobre *Eucalyptus* sp., posteriormente reconhecido como *E. citriodora*.

A primeira descrição, no Brasil, da ferrugem do eucalipto foi feita em 1944, por Joffily (1944), no Estado do Rio de Janeiro, em mudas de *E. citriodora*. Todavia, a primeira constatação de que se tem notícia sobre esta ferrugem causando danos preocupantes, ocorreu em 1973, num viveiro e plantações de *E. grandis* - procedência da África do Sul (A. S.), até a idade aproximada de 1,5 anos, na Costa do Estado do Espírito Santo (Ferreira, 1989 e Ferreira, 1983). Na ocasião, os danos mais expressivos deram-se num viveiro, no qual mais de 400.000 mudas foram refugadas para o plantio no campo.

De 1974 a 1979, no Vale do Rio Doce e Zona da Mata de Minas Gerais, e na Costa do Espírito Santo, vários ataques de ferrugem, esporádicos, porém severos, sempre afetando plantas com menos de dois anos de idade, foram registrados em viveiros e principalmente em plantações comerciais de *E. grandis* - A. S. e em parcelas experimentais de *E. phaeotricha* - 9782 e *E. cloeziana* - 9785. Nesse mesmo período, incidência muito leve foi verificada em outras procedências de *E. grandis* e de outras espécies, em ensaios de introdução de espécies (Ferreira, 1983).

De 1979 a 1980, nas regiões do Vale do Rio Doce e Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, nordeste do Espírito Santo e sudeste da Bahia, ocorreram mais de uma dezena de ataques severos da ferrugem do eucalipto afetando *E. grandis* - A. S. e algumas procedências de *E. cloeziana* de origens desconhecidas. Desse período, destacam-se os extensos ataques ocorridos nas regiões de Guanhães e Ipatinga - MG. Nesse último município, mais de 300 hectares de *E. grandis* - A. S., com seis meses de idade, foram varridos pela doença. Em 1981 e 1982, houve reincidência da doença nessas áreas, todavia, sem a expressão dos anos anteriores, visto que a maior parte dos plantios, feitos com material mais suscetível à doença, já se encontrava em idade superior a dois anos, a partir da qual a doença não tem tido importância nas plantações (Ferreira, 1983).

De 1980 até nossos dias, registros de surtos importantes da ferrugem do eucalipto têm sido feitos no sudeste da Bahia, nordeste do Espírito Santo e Vale do Rio Doce no Estado de Minas Gerais, afetando plantações novas ou

brotações novas de tocos de procedências altamente suscetíveis (Ferreira, 1989). Esse histórico de constatações mostra que a ferrugem do eucalipto deixou de ser uma doença cujos danos são consideráveis apenas em raras ocasiões (Krugner, 1980).

Preferencialmente, *P. psidii* infecta as folhas jovens e terminais suculentos dos ramos ou da haste principal do eucalipto e outras mirtáceas. Este patógeno depende de aspectos fenológicos específicos, tais como órgãos tenros em eucalipto, jambeiro e goiabeira e frutos nas jabuticabeiras. Assim, quando esses órgãos são infectados, morrendo posteriormente, um novo ataque somente ocorrerá quando novas brotações surgirem e, além disso, se surgirem condições ambientais propícias às infecções pelo patógeno (Ferreira, 1989).

Em eucalipto, inicialmente, a doença se expressa na forma de pequenas hipertrofias verde-claras que se rompem com o progresso da infecção, constituindo as pústulas de urediniosporos, de coloração amarela. Sob condições favoráveis, o patógeno se desenvolve rapidamente (5 a 7 dias da inoculação à esporulação), as pústulas coalescem e todo o órgão infectado recobre-se de urediniosporos. Nas folhas mais novas, a esporulação aparece em ambas as faces, porém mais profusamente na parte adaxial. Após a liberação dos esporos, restam lesões de coloração marrom a marrom-escuro e o tecido torna-se ressecado. Infecção severa provoca deformação, queda prematura e morte de folhas, além de deformação e morte de porções apicais de ramos e da haste principal. Se a planta provém de brotações, a infecção provoca até mesmo a sua morte (Alfenas, Demuner e Barbosa, 1989).

Além dos uredíniosporos, os quais são unicelulares e mais frequentemente encontrados em condições favoráveis, um outro tipo de esporos (os teliosporos), que apresentam coloração marrom-avermelhada ou castanho-escura e são bicelulares, podem ser esporadicamente encontrados nas épocas mais quentes do ano (Alfenas, Demuner e Barbosa, 1989).

Os principais agentes de disseminação da doença de uma planta a outra, são os ventos e os insetos. Dentro de uma mesma planta, uma vez surgidas as primeiras pústulas, as infecções secundárias ocorrem principalmente pela ação do orvalho, chuva, insetos e ventos, redistribuindo os uredíniosporos pelos órgãos tenros da planta (Ferreira, 1989).

Os fatores temperatura, água livre e luz afetam significativamente o processo inicial de infecção de *P. psidii* em eucalipto (Castro, 1983; Ferreira, 1983 e Ruiz, 1988) e outras mirtáceas (McLachlan, 1938).

Considerando que condições de temperatura relativamente baixas ou moderadas, aliadas a tempo de água livre na superfície foliar maior que seis horas e escuro, permitem e favorecem a germinação de uredíniosporos e o início de penetração e de colonização do patógeno; considerando que tais temperaturas, na presença de luz e independente de umidade, são favoráveis à continuidade da colonização e esporulação uredíniospórica; e considerando também que temperaturas relativamente elevadas (próximas ou superiores a 30°C) impedem o processo de germinação de uredíniosporos e o início de penetração e colonização e desfavorecem a continuidade da colonização e a esporulação uredíniospórica, pode-se concluir que: abril a agosto é o período anual mais favorável à doença no

sudeste brasileiro e que as alternâncias entre dia e noite, nesse período, são muito importantes no contexto geral da enfermidade para propiciar condições de temperatura, água livre e luminosidade específicas para cada uma das etapas vitais do processo repetitivo da doença (Ferreira, 1989).

No sudeste da Bahia, a maior frequência e severidade da ferrugem nos meses de março a julho tem sido relacionada com as condições climáticas (Ruiz, 1988).

Existem produtos químicos eficientes para o controle da ferrugem do eucalipto em viveiro, embora esta seja uma prática dispendiosa. Dentre os ingredientes ativos já testados, o Triadimenol (Bayfidan CE) destacou-se pela eficiência, tanto em aplicações preventivas, quanto em aplicações curativas (Alfenas, Demuner e Barbosa, 1989). Outros produtos que também exercem controle satisfatório da doença em viveiros são maneb e oxiclreto de cobre nas dosagens de 160-200 g/100 litros (Ferreira, 1989). Quando testados para controle desta ferrugem por Ruiz (1988), os fungicidas protetores mancozeb e oxiclreto de cobre protegeram folhas suscetíveis, quando aplicados até 10 dias antes da inoculação do patógeno. Os fungicidas sistêmicos triadimenol e triforine, além de terem propiciado o mesmo efeito protetor citado, foram assimilados pelos limbos a partir de 30 minutos pós-pulverização, translocaram, efetivamente, de um limbo a outro situado do lado oposto da haste ou de um limbo inferior para outro imediatamente acima e exerceram também efeito curativo quando aplicados até seis dias após a inoculação de *P. psidii*.

Controle Biológico

Controle biológico pode ser definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (Baker e Cook, 1974).

O principal objetivo do controle biológico é o de manter, através do emprego de determinadas práticas e da introdução de uma biomassa de antagonistas, todos os componentes do agroecossistema em equilíbrio, constituído pelo hospedeiro cultivado juntamente com os patógenos e os organismos úteis. Tais níveis de equilíbrio poderão ser alcançados através da elaboração de um sistema integrado de produção, com destaque no controle biológico, sem perdas significativas na produtividade agrícola, com as vantagens de se obterem maior economicidade e menores riscos ou impactos ao ambiente (Robbs, 1991).

Patógenos podem ser controlados por microorganismos que ocorrem naturalmente no filoplano (Blakeman e Fokkema, 1982) e/ou por antagonistas estranhos, não residentes na superfície das folhas (Bettiol, 1991).

Se os organismos originários do filoplano, adaptados para sobreviver e crescer neste habitat, possuírem efetiva ação antagônica contra o patógeno, deverão ser preferidos em relação aos de outros habitats, que podem ser

igualmente antagônicos ao patógeno. Possivelmente, os microorganismos de outros habitats são menos adaptados a viverem por um longo período no filoplano, e conseqüentemente, há necessidade de serem reaplicados mais frequentemente na superfície foliar (Blakeman e Fokkema, 1982). Entretanto, a utilização de microorganismos estranhos é técnica comum em biocontrole de doenças do filoplano, alcançando, em muitos casos, grande sucesso (Baker et al., 1983 e Baker, Stavely e Mock, 1985). Uma das vantagens é abreviar o período de seleção de antagonistas nas fases iniciais do trabalho.

Os microorganismos antagônicos do filoplano consistem basicamente de bactérias e fungos (filamentosos e leveduriformes). Neste ambiente são intensas a competição, principalmente por nutrientes, a antibiose, o parasitismo e a indução de resistência, resultando num controle natural de doenças foliares (Bettioli, 1991).

Segundo Baker e Cook (1974), folhas apresentando sintomas de ferrugem, oídios, colonizadas por ácaros e outros organismos, podem apresentar maior população de epífitas residentes do que folhas sadias. Por sua vez, Blakeman e Fokkema (1982) sugerem que, na busca de microorganismos antagônicos a determinado patógeno, causador de doença em parte aérea, deve-se coletar folhas sadias existentes em campos onde se tenham plantas doentes.

A seleção de microorganismos antagônicos sustenta virtualmente todo o programa de controle biológico (Bettioli, 1988). Segundo Wood e Tveit (1955), organismos selecionados como antagonistas não devem ser fitopatogênicos, devem ter propriedades que facilitem a aplicação na superfície

das plantas ou solos e devem ter capacidade de rápido estabelecimento. Seus esporos ou estruturas de sobrevivência devem germinar bem e rapidamente. Os organismos devem apresentar alta taxa de crescimento e capacidade reprodutiva, especialmente de esporos relativamente resistentes. Os antagonistas devem ser facilmente cultivados em meios disponíveis e não devem ser exigentes em seus requerimentos nutricionais, de modo que grandes quantidades de inóculo possam ser facilmente preparadas a baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO NETO, M.J. Eucalipto: uma atividade estratégica. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.12, n.141, p.1, set. 1986.
- ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; BARBOSA, M. DE M. A ferrugem e as opções de controle. **Correio Agrícola**, São Paulo, n.1, p.18-20, 1989.
- BAKER, K.J.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.H. Freeman, 1974. 433p.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, p.770-772, 1985.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.8, p.1148-1152, Aug. 1983.
- BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: _____ (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPDA, 1991. Cap.4, p.33-52.
- BETTIOL, W. Seleção de microorganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba: ESALQ, 1988. 140p. (Tese-Doutorado em Fitopatologia).
- BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.167-192, 1982.

- CASTRO, H.A. **Padronização de metodologia de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus* spp. à ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter.** Piracicaba: ESALQ, 1983. 116p. (Tese-Doutorado em Fitopatologia).
- FERREIRA, F.A. **Enfermidades do eucalipto. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.12, n.141, p.59-70, set. 1986.**
- FERREIRA, F.A. **Ferrugem do eucalipto. Revista Árvore, Viçosa, v.7, n.2, p.91-109, jul./dez. 1983.**
- FERREIRA, F.A. **Patologia florestal; principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.**
- GONÇALVES, S.S. **Lista preliminar das doenças das plantas do Estado do Espírito Santo. Boletim do Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, p.1-12, 1929.**
- JOFFILY, J. **Ferrugem do eucalipto. Bragantia, Campinas, v.4, n.8, p.475-487, ago. 1944.**
- KRUGNER, T.L. **Doenças do eucalipto-*Eucalyptus* spp.. In: GALLI, F. (coord.). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap.18, p.275-296.**
- MCLACHLAN, J.D. **A rust of pimento tree in Jamaica. Phytopathology, St. Paul, v.28, n.3, p.157-170, 1938.**
- ROBBS, C.F. **Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Org.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1991. Cap.8, p.121-133.**
- RUIZ, R.A.R. **Epidemiologia e controle químico da ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto. Viçosa: UFV, 1988. 108p. (Tese-Mestrado em Fitopatologia).**
- WOOD, R.K.S.; TVEIT, M. **Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. The Botanical Review, New York, v.21, p.441-492, 1955.**

**SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE UREDINIOSPOROS DE *Puccinia psidii* A
Bacillus subtilis.***

Claudia C. Ferreira dos Santos¹, Hilário A. de Castro¹, Wagner Bettiol² e Américo Angeli Júnior¹

¹ UFLA, Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

² CNPMA / EMBRAPA, Caixa Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil.

* Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de vinte e quatro isolados de *Bacillus subtilis*, antagônicos à *Pyricularia oryzae*, sobre a ferrugem do eucalipto. Três desses isolados foram provenientes de folhas de eucalipto, enquanto os demais foram procedentes de folhas de arroz. Os isolados foram testados *in vitro*, sob a forma de caldo fermentado, caldo fermentado autoclavado

e sobrenadante, quanto à capacidade de inibição da germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii*. Todos os isolados reduziram a germinação uredíniospórica nas três formas empregadas, demonstrando que os metabólitos produzidos por *B. subtilis* são termoestáveis e independem de células vivas.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, *Puccinia psidii*, ferrugem do eucalipto.

ABSTRACT

SANTOS, C.C.F. dos; CASTRO, H.A. de; BETTIOL, W. e ANGELI JÚNIOR, A.

In vitro sensibility of *Puccinia psidii* to *Bacillus subtilis*.

The present work aimed at evaluating the effect of twenty-four isolates of *Bacillus subtilis*, antagonistic to *Pyricularia oryzae*, upon eucalyptus rust. Three out of these isolates were originating from eucalyptus leaves, while the others were coming from rice leaves. The isolates were tested *in vitro*, under the form of fermented broth, autoclaved fermented broth and supernatant, as to the uredíniosporic germination-inhibiting ability of *Puccinia psidii*. All the isolates lowered uredíniosporic germination in the three forms used, showing that the metabolites produced by *B. subtilis* are heat-stable and independent of living cells.

INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos demonstram o potencial do controle biológico de doenças foliares por meio do manejo de bactérias residentes ou não no filoplano. Dentre estas bactérias, *Bacillus* spp. são frequentemente encontradas no filoplano de muitas espécies vegetais. Bettiol (1988) obteve isolados desta bactéria a partir de folhas de arroz e eucalipto. *B. subtilis* é descrita como bactéria móvel, aeróbia, Gram-positiva, forma de bastonete, com flagelos peritríquios e que ocorre em diversos ambientes, podendo, em condições adversas, produzir esporos que permitam a sua sobrevivência (Sneath, 1986). A capacidade de produção de antibióticos junto a substâncias que atuam como surfactantes, pode ser uma das maneiras pelas quais *B. subtilis* exerce antagonismo a várias espécies de fitopatógenos (Gottlieb e Shaw, 1970).

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de vinte e quatro isolados de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii*, *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliaram-se vinte e quatro isolados de *B. subtilis* antagônicos à *Pyricularia oryzae* (Bettiol e Kimati, 1989), cedidos pelo dr. Wagner Bettiol, CNPMA/EMBRAPA - Jaguariúna-SP, quanto à capacidade de inibição, *in vitro*, da germinação de uredíniosporos de *P. psidii*. Três desses isolados (AP-02, AP-

11 e AP-14) foram provenientes de folhas de eucalipto, enquanto os demais foram procedentes de folhas de arroz. Cultivaram-se os isolados de *B. subtilis* em meio sólido 523 de Kado e Heskett (1970), sob condições normais de laboratório durante 48 horas. Adicionou-se água destilada esterilizada aos tubos, até a altura do meio de cultura, agitando-os manualmente para obtenção de uma suspensão bacteriana. Transferiu-se uma alíquota de 1,5 ml da suspensão preparada para erlenmeyers de 50 ml de capacidade contendo 20 ml de meio 523 de Kado e Heskett líquido, os quais foram a seguir dispostos em agitador, sob condições de ambiente de laboratório, durante 7 dias consecutivos. Após o período de incubação, o caldo obtido foi separado em três partes iguais; permanecendo a primeira parte sem alteração, a qual foi denominada caldo fermentado (CF). A segunda parte foi centrifugada a 10.000 rpm/10 min. para obtenção do sobrenadante (S), e a terceira autoclavada a 120°C/20 min., obtendo-se o caldo fermentado autoclavado (CFA).

Suspensão de uredíniosporos de *P. psidii* na concentração de $2,0 \times 10^4$ esporos/ml, contendo Tween 80 a 1%, foi preparada e sua concentração ajustada com auxílio de hemocitômetro. Dessa suspensão, 5,0 µl foram depositados em lâminas escavadas.

Avaliou-se o efeito do CF, CFA e S de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de *P. psidii*. Cerca de 5,0 µl de CF, CFA ou S foram depositados sobre igual volume da suspensão de uredíniosporos, nas lâminas escavadas.

As lâminas preparadas foram colocadas em “gerboxs” envolvidos com papel alumínio, contendo em seu interior uma camada de algodão umedecida em água sob uma folha de papel de filtro também previamente umedecida em água. Dois tratamentos testemunhas foram empregados: deposição de 5,0 µl da suspensão de uredíniosporos junto a 5,0 µl de água destilada e deposição de 5,0 µl da suspensão de uredíniosporos junto a 5,0 µl de meio 523 de Kado e Heskett líquido.

Após 12 horas de incubação sob temperatura de $\pm 20^{\circ}\text{C}$, determinou-se o número de uredíniosporos germinados e o número total de uredíniosporos, realizando-se dez leituras (10 campos sob aumento de 400X). Considerou-se como uredíniosporo germinado aquele que apresentava o comprimento do tubo germinativo com, no mínimo, duas vezes o seu maior diâmetro.

Todos os tratamentos foram repetidos quatro vezes, sendo cada repetição constituída de uma lâmina escavada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percentagem de germinação *in vitro* de uredíniosporos de *P. psidii* em presença dos 24 isolados de *B. subtilis* foi reduzida significativamente nas três formas empregadas (tabela 1). Apenas nos tratamentos em que se aplicou o CFA dos isolados AP-11, AP-12, AP-14, AP-105, AP-114, AP-339 e AP-420 detectou-se germinação de uredíniosporos, ainda que insignificante quando

comparada com a testemunha. Mesmo assim, neste caso, os uredíniosporos apresentaram germinação rudimentar, exibindo tubos germinativos com comprimento reduzido e extremidades de formato alterado, além de estarem localizados às margens das gotículas, o que provavelmente dificultou um maior contato com o CF, CFA ou S. Similarmente, hifas

de *Eutypa lata*, em contato com *B. subtilis* tiveram as extremidades malformadas, espessas e com número anormal de vacúolos, enquanto os ascosporos do patógeno não germinaram quando em presença da substância tóxica produzida pela bactéria (Ferreira, Matthee e Thomas, 1991).

Neste trabalho utilizamos isolados de *B. subtilis* antagônicos à *Pyricularia oryzae*, o qual é saprófita facultativo, enquanto *Puccinia psidii* é parasita estritamente obrigatório. Se *B. subtilis* reduziu a germinação de esporos de dois fungos distintos, os produtos tóxicos produzidos pela bactéria devem atuar em rotas metabólicas comuns a ambos os patógenos, mas para que tal suposição seja comprovada, seriam necessários testes específicos. Entretanto, a constatação desse efeito deletério sugere que *B. subtilis* possa possuir modo de atuação abrangente e/ou produzir diferentes substâncias antibióticas. Bettiol e Kimati (1989) postularam que *B. subtilis* inibiu *P. oryzae* por antibiose. Normalmente, produtos tóxicos de amplo espectro de ação atuam em vários sítios bioquímicos dentro das células. Possivelmente, *B. subtilis* atue alterando vários processos fisiológicos ou rotas metabólicas comuns a vários organismos. Em decorrência do provável amplo espectro de ação, o surgimento de isolados do

TABELA 1. Percentagem de germinação, em lâmina, de uredíniosporos de *P. psidii* em presença do caldo fermentado, sobrenadante ou caldo fermentado autoclavado de *B. subtilis*.

Tratamentos	% de germ. **	Tratamentos	% de germ. **
AP - 02 CF	0	AP - 137 CF	0
AP - 02 S	0	AP - 137 S	0
AP - 02 CFA	0	AP - 137 CFA	0
AP - 03 CF	0	AP - 165 CF	0
AP - 03 S	0	AP - 165 S	0
AP - 03 CFA	0	AP - 165 CFA	0
AP - 11 CF	0	AP - 181 CF	0
AP - 11 S	0	AP - 181 S	0
AP - 11 CFA	2,00*	AP - 181 CFA	0
AP - 12 CF	0	AP - 183 CF	0
AP - 12 S	0	AP - 183 S	0
AP - 12 CFA	2,78*	AP - 183 CFA	0
AP - 14 CF	0	AP - 203 CF	0
AP - 14 S	0	AP - 203 S	0
AP - 14 CFA	3,18*	AP - 203 CFA	0
AP - 42 CF	0	AP - 336 CF	0
AP - 42 S	0	AP - 336 S	0
AP - 42 CFA	0	AP - 336 CFA	0
AP - 51 CF	0	AP - 339 CF	0
AP - 51 S	0	AP - 339 S	0
AP - 51 CFA	0	AP - 339 CFA	1,59*
AP - 91 CF	0	AP - 365 CF	0
AP - 91 S	0	AP - 365 S	0
AP - 91 CFA	0	AP - 365 CFA	0
AP - 94 CF	0	AP - 401 CF	0
AP - 94 S	0	AP - 401 S	0
AP - 94 CFA	0	AP - 401 CFA	0
AP - 105 CF	0	AP - 420 CF	0
AP - 105 S	0	AP - 420 S	0
AP - 105 CFA	3,98*	AP - 420 CFA	2,39*
AP - 114 CF	0	AP - 429 CF	0
AP - 114 S	0	AP - 429 S	0
AP - 114 CFA	1,19*	AP - 429 CFA	0
AP - 115 CF	0	AP - 471 CF	0
AP - 115 S	0	AP - 471 S	0
AP - 115 CFA	0	AP - 471 CFA	0
Test. água	33,30	Test. Kado e Heskett	35,00

* Germinação rudimentar de uredíniosporos às margens da gotícula.

** Média de 4 lâminas x 10 campos / lâmina

patógeno resistentes aos antibióticos produzidos por *B. subtilis* pode ser menos frequente. Dessa forma, além da redução no uso de fungicidas, o controle biológico de *P. psidii* com *B. subtilis* pode reduzir a possibilidade de surgimento de isolados resistentes aos seus antibióticos.

O sobrenadante de *B. subtilis* reduziu a germinação de uredíniosporos de *P. psidii*. O(s) princípio(s) ou substância(s) ativa(s) causador(es) da inibição estava(m) difundido(s) no meio de cultura e seu efeito é independente da presença de células bacterianas. Algum composto produzido por *B. subtilis* e liberado no meio de cultura é o responsável pela redução da germinação dos uredíniosporos. Conforme indicação de Baker et al. (1983), essa substância seria uma glicoproteína (95% de proteína e 5% de carboidratos) com peso molecular de 5-10 Kdaltons.

Os resultados obtidos com o caldo fermentado autoclavado de *B. subtilis* demonstram que os metabólitos produzidos pela bactéria são termoestáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, St. Paul, v.73, n.8, p.1148-1152, Aug. 1983.
- BETTIOL, W. Seleção de microorganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba: ESALQ, 1988. 140p. (Tese-Doutorado em Fitopatologia).
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microorganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.15, n.3-4, p.257-266, jul./dez. 1989.
- FERREIRA, J.M.S.; MATTHEE, F.N.; THOMAS, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, v.81, 283-287, 1991.
- GOTTLIEB, D.; SHAW, P.D. Mechanisms of action of antifungal antibiotics. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.8, p.371-402, 1970.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, p.969-976, 1970.
- SNEATH, P.H. Endospore - forming Gram - Positive Rods and Cocci. In: SNEATH, P.H.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.1104-1207.



SENSIBILIDADE *IN VIVO* DE *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*

Claudia C. Ferreira dos Santos¹, Hilário A. de Castro¹, Wagner Bettiol² e Américo Angeli Júnior¹

¹ UFLA, Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

² CNPMA / EMBRAPA, Caixa Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil.

* Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

RESUMO

Em ensaio conduzido em câmara de crescimento, estudou-se o efeito da aplicação do caldo fermentado de vinte e quatro isolados de *Bacillus subtilis* sobre a redução no número de pústulas de ferrugem por cm² de folhas jovens de eucalipto. Apesar de não se ter constatado diferença significativa entre os tratamentos empregados, verificou-se maior número de pústulas nas plantas testemunhas e naquelas tratadas com o isolado AP-137. Ressalta-se que foi baixa

a frequência de pústulas/cm² , provavelmente em consequência do nível de resistência do material empregado. Em teste para se determinar a viabilidade de uredíniosporos presentes em folhas de plantas tratadas com o caldo fermentado, verificou-se efeito inibitório de *B. subtilis* sobre a germinação dos esporos, excetuando-se o tratamento constituído pelo isolado AP-03. Tal comportamento pode ser justificado pela baixa adaptabilidade do isolado em habitat diferente de seu local de origem. Em vista dos resultados obtidos, constata-se o potencial de *B. subtilis* para o controle da ferrugem do eucalipto. Entretanto, mais estudos são necessários para se adotar tal prática em escala comercial, visando o sistema de manejo integrado de doenças.

ABSTRACT

SANTOS, C.C.F. dos; CASTRO, H.A. de; BETTIOL, W. e ANGELI JÚNIOR, A.

In vivo sensibility of *Puccinia psidii* to *Bacillus subtilis*.

In trial conducted in growth chamber, the effect of applying fermented broth of twenty-four isolates of *Bacillus subtilis* on the decrease of number of rust pustules per cm² of eucalyptus young leaves. In spite of not having found significant difference among the treatment employed, an increased number of pustules on the check plants and those treated with the isolate AP-137 was verified. It is denoted that the frequency of pustules per cm² was low, probably due to the level of resistance of the material utilized. In test to find the viability

of urediniospores present on leaves of plants treated with the fermented broth, inhibitory effect of *B. subtilis* on the spore germination was noticed, excepting the treatment made up of the isolate AP-03. Such behavior can be accounted for by the poor adaptability of the isolate in a habitat different from its native site. Owing to the results obtained, the potential of *B. subtilis* is found for the control of eucalyptus rust. However, further investigation is needed to adopt such practice on a commercial scale, aiming at the integrated sickness system.

INTRODUÇÃO

A execução de testes *in vivo*, sob condições controladas, constitui-se em importante etapa na seleção de antagonistas em um programa de controle biológico (Andrews, 1985).

A bactéria *B. subtilis* vem sendo avaliada para o controle de diferentes doenças, dentre estas as ferrugens de culturas de grande importância econômica. Bettiol et al. (1989) verificaram intensa inibição da germinação de urediniosporos de *Hemileia vastatrix* por *B. subtilis*, resultando num menor número de lesões em discos de folhas de cafeeiro. A ação principal de *B. subtilis* é na germinação dos esporos (Bettiol, 1991).

Baker et al. (1983) verificaram que um isolado de *B. subtilis*, originário de solo, reduziu em 95% o número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, quando aplicado em cultura líquida nas plantas em casa-de-vegetação, 2

a 120 horas antes da inoculação de uredíniosporos de *U. phaseoli*. Em condições de campo, durante os anos de 1982 e 1983, Baker, Stavely e Mock (1985) observaram redução de no mínimo 75% na ocorrência de ferrugem com três aplicações semanais. Mizubuti (1992) trabalhando com isolados de *B. subtilis*, provenientes de folhas de feijoeiro em campos de produção, verificou que a aplicação do caldo fermentado e o sobrenadante desta bactéria inibiram o desenvolvimento da ferrugem (*U. appendiculatus* var. *appendiculatus*), sugerindo o envolvimento de antibiose. Também Bettiol, Brandão e Saito (1992), utilizando as formulações pó molhável e extratos a partir de *B. subtilis*, na concentração de 1.000 ppm, obtiveram inibição total na germinação dos uredíniosporos de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*.

Marsiglio e Moraes (1990), objetivando verificar a ação inibitória de dez isolados bacterianos na germinação de uredíniosporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e da ferrugem do gerânio (*Puccinia pelargonii-zonalis*), verificaram que três dos isolados mostraram ação inibitória variando de 70 a 100% para uredíniosporos de ambas as ferrugens; dois isolados inibiram em cerca de 50% e os cinco isolados restantes não apresentaram ação inibitória.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de vinte e quatro isolados de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de *P. psidii in vivo*, bem como determinar a viabilidade de uredíniosporos presentes em plantas tratadas com o caldo fermentado de *B. subtilis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Em sacos plásticos pretos com capacidade de 1,0 Kg contendo mistura solo-esterco na proporção 3:1, semearam-se sementes de *Eucalyptus cloeziana* cedidas pelo IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais) e identificadas como Anhembi SP T16A73 AN 311. Quinze dias após a emergência das plântulas, procedeu-se ao desbaste, deixando-se três as por vaso. Quando estavam com 45 dias de idade, contados a partir da emergência, foram utilizadas no ensaio.

Testaram-se os caldos fermentados (CF) de vinte e quatro isolados de *B. subtilis* antagônicos à *Pyricularia oryzae* (Bettiol e Kimati, 1989), cedidos pelo dr. Wagner Bettiol, CNPMA/EMBRAPA - Jaguariúna-SP. Para tal, cultivaram-se os isolados em meio sólido 523 de Kado e Heskett (1970), sob condições ambientais durante 48 horas. Adicionou-se água destilada esterilizada aos tubos, até a altura do meio de cultura, agitando-os manualmente para obtenção da suspensão bacteriana. Transferiu-se uma alíquota de 1,5 ml da suspensão preparada para erlenmeyers contendo 50 ml de meio 523 de Kado e Heskett líquido, os quais foram mantidos em condições normais de laboratório durante 24 horas. Os CF obtidos foram ajustados para 50% de transmitância a 625 nm (Centurion, 1991).

Suspensão de uredíniosporos de *P. psidii* contendo $2,0 \times 10^4$ esporos/ml foi atomizada sobre a superfície adaxial de folhas jovens de eucalipto, utilizando-se atomizador De Vilbiss. Após secagem das gotículas da suspensão, os CF foram igualmente atomizados sobre a superfície adaxial das folhas. O

atomizador foi mantido a aproximadamente 10 cm da folha, atomizando-se por aproximadamente dez segundos em cada folha. Como tratamento testemunha, atomizou-se água destilada esterilizada. Nesse experimento empregaram-se quatro repetições. Cada repetição foi constituída por um saco plástico contendo três plantas com duas folhas jovens cada.

Após a inoculação, as plantas foram envolvidas, durante 12 horas, em sacos plásticos pretos borrifados internamente com água, permanecendo em câmara de crescimento à temperatura de 20°C. Vinte e um dias após a inoculação, determinou-se o número de pústulas por cm² de folha, colocando-se um quadrado de 1 cm², confeccionado em cartolina, em três regiões escolhidas aleatoriamente na superfície adaxial das folhas. Calculou-se, em seguida, a média aritmética das três leituras efetuadas.

Para se determinar a viabilidade de uredíniosporos presentes em plantas tratadas com o caldo fermentado de *B. subtilis*, plantas de *Eucalyptus cloeziana* Anhembi SP T16A73 AN 311 foram cultivadas e inoculadas com *P. psidii* conforme descrito anteriormente.

Vinte e um dias após a inoculação, pulverizou-se CF dos isolados AP-02, AP-03, AP-11 e AP-14 de *B. subtilis* sobre os uredíniosporos de *P. psidii* produzidos na superfície adaxial das folhas inoculadas. Utilizaram-se quatro vasos contendo três plantas cada, por tratamento. Nesse ensaio, os CF dos isolados foram obtidos como descrito anteriormente. Como tratamento testemunha foi atomizada água destilada sobre os esporos de *P. psidii*.

Cinco dias após a aplicação do CF, coletaram-se os esporos de *P. psidii* com auxílio de um estilete, depositando-os em lâminas escavadas contendo 5,0 µl de água destilada esterilizada. As lâminas preparadas foram colocadas em "gerboxs" envolvidos com papel alumínio, contendo em seu interior uma camada de algodão umedecida em água sob uma folha de papel de filtro também previamente umedecida em água.

Após 12 horas de incubação sob temperatura aproximada de 20°C, determinou-se o número de uredíniosporos germinados e o número total de uredíniosporos, realizando-se dez leituras (10 campos sob aumento de 400X). Considerou-se como uredíniosporo germinado aquele que apresentava o comprimento do tubo germinativo com, no mínimo, duas vezes o seu maior diâmetro.

Para cada vaso foram preparadas quatro lâminas escavadas, constituindo cada conjunto de quatro lâminas, uma repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de não se ter constatado diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos empregados, observou-se que as plantas testemunhas e aquelas tratadas com o isolado AP-137 apresentaram um maior número de pústulas quando comparadas às demais (figura 1). Possivelmente, a baixa

frequência de pústulas/cm² de folhas seja uma consequência do nível de resistência do material empregado.

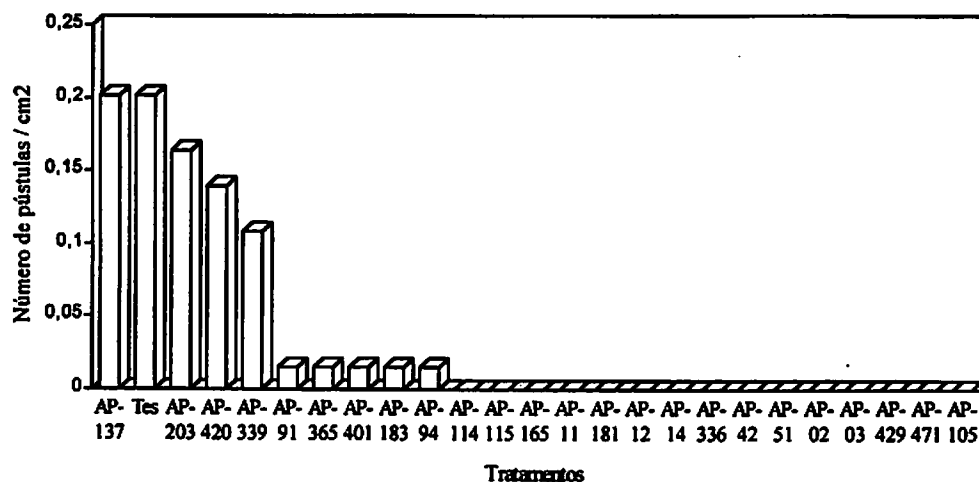


FIGURA 1. Número de pústulas de ferrugem por cm² de folhas jovens de eucalipto tratadas com o caldo fermentado de *Bacillus subtilis*.

D.M.S. 5%=0,07829

No ensaio de determinação da viabilidade de uredíniosporos presentes em folhas de plantas tratadas com o caldo fermentado, verificou-se efeito inibitório de *B. subtilis* sobre a germinação dos esporos, excetuando-se o tratamento no qual utilizou-se o isolado AP-03. Neste caso, observou-se uma percentagem de germinação de uredíniosporos semelhante àquela observada no tratamento testemunha. É interessante observar que nos demais tratamentos,

constituídos pelos isolados provenientes de folhas de eucalipto, constatou-se diferença significativa em termos de germinação de uredíniosporos com relação aos tratamentos AP-03 e testemunha (figura 2). Provavelmente, os isolados AP-02, AP-11 e AP-14, por serem provenientes do filoplano de eucalipto, adaptaram-se melhor em seu habitat de origem, apesar do AP-02 ter possibilitado maior percentagem de germinação quando comparado aos demais isolados.

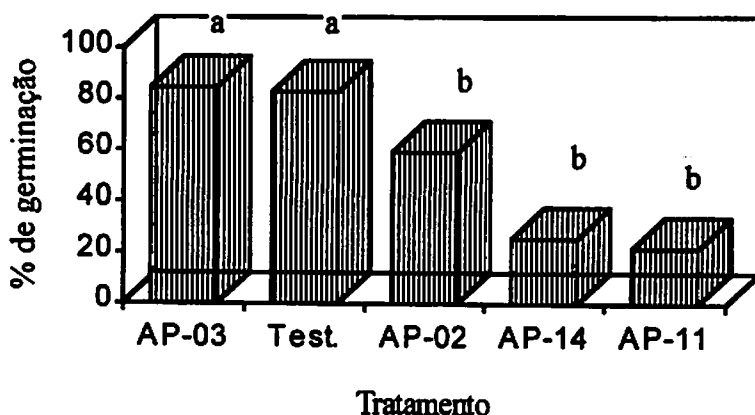


FIGURA 2. Percentagem de germinação, em lâmina, de uredíniosporos de *Puccinia psidii* provenientes de folhas jovens de eucalipto tratadas com o caldo fermentado de *Bacillus subtilis*.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

D.M.S. 5% = 45,49069

Segundo Blakeman e Fokkema (1982), no controle biológico de fitopatógenos da parte aérea, o uso de microorganismos antagônicos, isolados do filoplano, deve ser preferido, mesmo que se tenham outros, também eficazes, porém provenientes de habitat distinto. A adaptação do antagonista no local de atuação deve ser considerada quando se procura controle a nível satisfatório. Interações mais complexas estão envolvidas quando determinado agente de controle é introduzido em locais diferentes do seu habitat natural. Um dos fatores que dificultam a sua sobrevivência é a própria resistência exercida pelos microorganismos pré-existentes. Por essas razões, procurou-se encontrar organismos antagonistas capazes de sobreviverem no filoplano de eucalipto.

A aplicação de *B. subtilis* no controle da ferrugem do eucalipto poderia resultar em efeitos direto e indireto. O efeito direto seria a redução da intensidade da doença, devido ao menor número de pústulas formadas, com conseqüente menor produção de esporos em um ciclo da doença. O efeito indireto envolveria o efeito direto pela redução do inóculo inicial para os ciclos secundários, associado à redução da germinação de uredíniosporos. Considerando-se que a ferrugem do eucalipto é doença tipicamente policíclica, a redução da germinação dos uredíniosporos, presentes em plantas tratadas com *B. subtilis*, exerceria efeito marcante nos ciclos secundários da doença. Esse efeito subsequente obtido seria muito importante ao se considerar o manejo da epidemia como um todo.

Espera-se que o controle exercido por *Bacillus subtilis* seja refletido pela redução da taxa de progresso da ferrugem. Havendo redução do inóculo

inicial e do secundário, pela diminuição do número de pústulas e da viabilidade de uredíniosporos, a redução na taxa de progresso da doença seria prevista de ocorrer.

O sucesso de muitos agentes de controle depende de sua viabilidade comercial (Scher e Castagno, 1986). Esses agentes são organismos vivos, requerendo manuseio cuidadoso, podendo perder suas características devido a mutações e podem não ser compatíveis com produtos químicos. *B. subtilis* tem potencial para o controle biológico da ferrugem do eucalipto, assim como verificado por Mizubuti (1992) para a ferrugem do feijoeiro, por satisfazer importantes requisitos. Algumas características desejáveis são: capacidade de sobrevivência em condições adversas conferida pela produção de endosporos (Sneath, 1986), produção de substâncias tóxicas ou mesmo de antibióticos, importantes para a sobrevivência no meio onde se encontram (Fravel, 1988), além do efeito sobre o patógeno que se deseja controlar, rápida multiplicação, adaptabilidade a diferentes habitats e a possibilidade de desenvolvimento de formulações.

Para viabilizar o emprego de *B. subtilis* como agente de controle da ferrugem do eucalipto, há necessidade de obter isolados mais eficientes, assim como desenvolver formulações para facilitar a aplicação. Seu papel seria importante no manejo integrado de doença. Atualmente, a associação de controle biológico/químico seria objetivo mais facilmente alcançável. Alguns trabalhos mostram a compatibilidade de *Bacillus* spp. com determinados fungicidas e inseticidas (Mercier e Reeleder, 1986, Ferreira, Matthee e Thomas, 1991). Baker

e Scher (1987) sugerem que no manejo integrado, fungicidas específicos e não tóxicos aos antagonistas podem oferecer maiores possibilidades de sucesso. Para o controle da ferrugem do eucalipto, espera-se que a associação *B. subtilis* - fungicidas, seja possível, o que poderia contribuir para reduzir a quantidade desses produtos químicos.

Para se estabelecer o espectro de ação de *B. subtilis* sobre diferentes doenças do eucalipto seriam necessários testes *in vitro* envolvendo maior número de fitopatógenos, e, se possível ensaios posteriores a nível de campo. Algum isolado de *B. subtilis* que porventura exerça efeito antagônico a maior número de patógenos, muito provavelmente poderia ser aproveitado para o desenvolvimento de produto biológico a nível comercial. Com os testes aqui realizados, espera-se que essa possibilidade exista, em vista de se ter trabalhado com isolados antagônicos à *Pyricularia oryzae*, o qual é patógeno de natureza de parasitismo completamente distinta de *P. psidii*.

Mais estudos devem ser realizados para que o controle da ferrugem do eucalipto com *B. subtilis* seja técnica economicamente viável. Pesquisas mais aplicadas, com a busca por isolados mais eficientes devem continuar, assim como o desenvolvimento de formulações do agente de controle biológico, para que se possa reduzir o uso de fungicidas e as perdas decorrentes da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. (eds.). **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. 169p.
- BAKER, R.; SCHER, F.M. Enhancing the activity of biological control agents. In: CHET, I. (ed.). **Innovative approaches to plant disease control**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p.1-17.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, p.770-772, 1985.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.8, p.1148-1152, Aug. 1983.
- BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: ____ (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPDA, 1991. Cap.4, p.33-52.
- BETTIOL, W.; BRANDÃO, M.S.B.; SAITO, M.L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.18, n.2, p.153-159, abr./jun. 1992.
- BETTIOL, W.; GALVÃO, J.A.H.; GHINI, R.; MENDES, M.D.L. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, n.1, p.43, jan./mar. 1989.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microorganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, n.3-4, p.257-266, jul./dez. 1989.
- BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.167-192, 1982.
- CENTURION, M.A.P.DA 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.

- FERREIRA, J.M.S.; MATTHEE, F.N.; THOMAS, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, v.81, 283-287, 1991.
- FRAVEL, D.R. Role of antibiosis in the biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.26, p.75-91, 1988.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, p.969-976, 1970.
- MARSIGLIO, A.F.; MORAES, W.B.C. Ação inibitória de alguns isolados bacterianos sobre a germinação de uredíniosporos das ferrugens do café e do gerânio. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.16, n.1, p.37. jan./mar. 1990.
- MERCIER, J.; REELEDER, R.D. Effects of the pesticides maneb and carbaryl on the phylloplane microflora of lettuce. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.33, p.212-16, 1986.
- MIZUBUTI, E.S.G. Controle da ferrugem do feijoeiro com *Bacillus subtilis*. Viçosa: UFV, 1992. 87p. (Tese-Mestrado em Fitopatologia).
- SCHER, F.M.; CASTAGNO, J.R. Biocontrol: a viem from industry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, v.8, p.222-224, 1986.
- SNEATH, P.H. Endospore - forming Gram - Positive Rods and Cocci. In: SNEATH, P.H.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wickins, 1986. v.2, p.1104-1207.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1- Todos os isolados de *B. subtilis*, nas três formas empregadas, reduziram a germinação urediniospórica de *P. psidii*, em lâmina.
- 2- Os metabólitos antagônicos produzidos por *Bacillus subtilis* são termoestáveis e independem de células vivas.
- 3- O caldo fermentado dos isolados provenientes do filoplano de eucalipto foram eficientes na inviabilização de urediniosporos presentes em folhas jovens, provavelmente devido à sua maior capacidade de adaptação em seu habitat de origem.
- 4- Apesar de não se ter constatado diferença significativa entre os tratamentos empregados no ensaio *in vivo*, observou-se que plantas testemunhas e aquelas tratadas com o isolado AP-137 apresentaram maior número de pústulas quando comparadas às demais. Provavelmente, a baixa frequência de pústulas/cm² de folhas seja consequência do nível de resistência do material empregado.

5- Em vista dos resultados obtidos, constata-se o potencial de *Bacillus subtilis* para o controle da ferrugem do eucalipto. Entretanto, mais estudos são necessários para se adotar tal prática a nível comercial, visando o sistema de manejo integrado de doenças.