

INDUTORES DE RESISTÊNCIA E A MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO¹

Victor de Haidar e Bertozzo², Bianca Cristina de Deus³, Karina Elaine de Moura⁴, Kamila Ellen de Moura⁵, Flávia Rodrigues Alves Patricio⁶

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Café

² Bolsista de Iniciação Científica PIBIC, Instituto Biológico, Campinas-SP, victor_haidar@hotmail.com

³ Aluna de Mestrado UNESP Rio Claro, Rio Claro, SP, bianca.c.deus@hotmail.com

⁴ Bolsista do Consórcio Pesquisa Café, Instituto Biológico, Campinas-SP, kah.rox@hotmail.com

⁵ Bolsista do Consórcio Pesquisa Café, Instituto Biológico, Campinas-SP, mila.rox@hotmail.com

⁶ Pesquisador Científico DSc Instituto Biológico, Campinas, SP, flavia@biologico.sp.gov.br

RESUMO: A mancha aureolada, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, tornou-se uma das mais relevantes doenças do cafeeiro nos últimos anos no Brasil. Visando a oferecer mais alternativas para auxiliar no manejo dessa doença, neste estudo foram avaliados os compostos: Fertilizante foliar a base de ácidos húmicos e cobre, um Produto biológico formulado com *Bacillus* spp. (PB), o Acibenzolar-s-metil (ASM) e o Ácido Fosforoso (AF), além do antibiótico Casugamicina, usado como controle, compostos com possível ação de indução de resistência. Os produtos foram avaliados na inibição da formação de colônias de *P. syringae* pv. *garcae* quando adicionados a meio de cultura, e na redução dos sintomas da mancha aureolada, quando aplicados em mudas da cultivar Mundo Novo, tanto no substrato quanto na parte aérea. Os compostos Acibenzolar-S-methyl e o Produto biológico não tiveram efeito *in vitro* sobre a redução de colônias de *P. syringae* pv. *garcae* nos experimentos realizados em microplacas. O Ácido fosforoso e a casugamicina inibiram a formação de colônias de *P. syringae* pv. *garcae* a partir das doses de 500 µg.L⁻¹ e de 50 µg.L⁻¹, respectivamente. Todos os produtos testados tiveram pouco efeito sobre a redução na severidade da mancha aureolada quando aplicados no substrato, mas o Produto biológico, o Fertilizante foliar e o Acibenzolar-S-methyl reduziram a severidade da doença. Quando os produtos foram aplicados na parte aérea, o tratamento que mais reduziu a severidade da mancha aureolada foi com a casugamicina, seguido pelos tratamentos com o Fertilizante foliar e o Acibenzolar-S-methyl, seguidos pelo tratamento com o Produto biológico. A comparação entre os resultados *in vitro* e nas mudas de cafeeiro indica que o Fertilizante foliar deve estar agindo por indução de resistência, com efeito equivalente ao do indutor padrão Acibenzolar-S-methyl.

PALAVRAS-CHAVE: indução de resistência, mancha aureolada, *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, café, *Coffea arabica*.

INDUCERS OF RESISTANCE AND BACTERIAL HALO BLIGHT OF COFFEE

ABSTRACT: Bacterial halo blight, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, became one of the most relevant coffee diseases in Brazil in the last years. Aiming to offer more alternatives for the management of the disease, this study was carried out with the probable resistant inducers: a Foliar fertilizer, formulated with humic acids and copper, a Biological product formulated with *Bacillus* spp., Acibenzolar-s-metil and a Phosphoric acid, as well as the antibiotic Kasugamycin, used as a positive control. The products were evaluated in relation to the inhibition of the formation of colonies of *P. syringae* pv. *garcae* in microplates, and in the reduction of bacterial halo blight symptoms in Mundo Novo cultivar seedlings, in experiments carried in a greenhouse. The chemical Acibenzolar-S-methyl and the Biological product did not inhibit the formation of *P. syringae* pv. *garcae* colonies of in the microplates. The Phosphoric acid and Kasugamycin inhibited the formation of colonies in the doses of 500 µg.L⁻¹ and 50 µg.L⁻¹ of active ingredient, respectively. All the products exhibited a small effect over the reduction of the severity of the disease when applied in the substrate, but the Biological product, the Foliar fertilizer and Acibenzolar-S-methyl reduced the severity of the disease. When the products were applied in the aerial parts of the seedlings, the treatment that was more effective was Kasugamycin, followed by the treatments with the Foliar fertilizer and Acibenzolar-S-methyl, and these were followed by the treatment with the Biological product. The comparison between the results *in vitro* and *in vivo* shows that the Foliar fertilizer must be acting through induction of resistance and exhibited an effect equivalent to Acibenzolar-S-methyl in the control of the disease.

KEY WORDS: induction of resistance, bacterial halo blight, *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, coffee, *Coffea arabica*.

INTRODUÇÃO

A mancha aureolada, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, tornou-se uma doença muito importante nos últimos anos no Brasil (Patricio & Oliveira, 2014; Almeida et al., 2013). A mancha aureolada é mais relevante em lavouras com até quatro anos de idade. sujeitas a ventos frios (Almeida et al., 2013). As condições climáticas que favorecem a mancha aureolada são temperaturas amenas, especialmente à noite, chuvas e elevada umidade relativa (Patricio & Oliveira, 2014). As lesões nas folhas são de coloração parda, e podem ser acompanhadas por um halo

amarelado. Também são encontradas lesões nas rosetas, inflorescências e frutos novos. Plantas atacadas pela mancha aureolada também podem exibir seca de ramos e desfolha. (Patricio & Oliveira, 2014).

Entre as medidas preconizadas para o manejo dessa doença encontra-se o plantio de quebra-ventos, uso de mudas sadias, cultivares resistentes e o controle químico, que é mais difícil que o controle químico de outras doenças da cultura do cafeeiro. Além dos produtos convencionais contendo cobre, alternativas como o uso de indutores de resistência, como o Acibenzolar-S-metil, já foram testadas para o manejo da mancha aureolada (Patricio et al., 2006). Produtos formulados com microrganismos também têm sido estudados com relação à indução de resistência, destacando-se as rizobactérias, como espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, PGPR (plant growth promoting rhizobacterium) (Pal et al., 2011).

Considerando o aumento de relevância da mancha aureolada na cafeicultura em geral, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar o efeito de indutores sobre o manejo da mancha aureolada, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, em duas cultivares de cafeeiro, uma moderadamente resistente e outra suscetível.

MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira fase do estudo foram avaliados em condições de laboratório os compostos: um Fertilizante foliar a base de ácidos húmicos e cobre (FF), um Produto biológico formulado com *Bacillus* spp.(PB), o Acibenzolar-s-metil (ASM) e o Ácido Fosforoso (AF), além do antibiótico Casugamicina, usado como controle.

Foram preparadas placas contendo meio NA ao qual os produtos a serem testados foram adicionados nas concentrações de 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do produto comercial por litro de meio. Dois isolados de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 1664 e IBSBF 2840) foram multiplicados em meio nutriente ágar (N.A.). Alíquotas de 0,01 mL da suspensão bacteriana foram adicionadas a microplacas contendo 48 células preenchidas com meio NA misturado às diferentes concentrações dos produtos. As placas permaneceram em incubação a 28°C por 48 horas, avaliando-se, em seguida, a presença de colônias viáveis da bactéria.

Todos os experimentos desta etapa foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na segunda etapa do estudo, foram realizados dois experimentos. No primeiro os produtos foram aplicados apenas no substrato e no segundo apenas na parte aérea. No primeiro experimento foram utilizadas mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo, com 3 ou mais pares de folhas verdadeiras. Os produtos aplicados e suas concentrações foram: Fertilizante foliar - 200 $\mu\text{l/L}$, Acibenzolar-S-methyl- 0,2103g/L, Produto biológico- 400 $\mu\text{l/L}$, e Ácido fosforoso - 265 $\mu\text{l/L}$. Cada tratamento possuía 16 repetições, sendo cada repetição representada por uma muda. A aplicação foi realizada no substrato com uma seringa, sendo aplicados 10 ml de solução por muda. Seis dias após a aplicação dos tratamentos, todas as mudas foram colocadas por 24 horas em câmara úmida, no escuro. Antes da inoculação as folhas das mudas foram feridas levemente com areia e em seguida inoculadas com uma suspensão contendo 10^8 ufc dos isolados de *P. syringae* pv. *garcae* (IBSBF 1664) e (IBSBF 2884). As mudas foram colocadas em câmara úmida, no escuro, por 3 dias e depois transferidas para casa de vegetação. Dez a quatorze dias após a inoculação foram realizadas as avaliações, em intervalos semanais, de severidade da mancha aureolada (estimada pela área foliar afetada pela doença).

No segundo experimento as mudas foram tratadas com os produtos 24 horas antes da inoculação, mantendo-se um tratamento testemunha, utilizado como padrão. Os produtos foram aplicados nas mesmas concentrações do experimento anterior e para o controle positivo foi utilizado o antibiótico Casugamicina - 500 $\mu\text{l/L}$. Cada tratamento foi realizado em 8 repetições, sendo cada repetição representada por uma muda de cafeeiro da cultivar Mundo Novo. A aplicação foi realizada na parte aérea das mudas com um pulverizador costal manual. Antes da inoculação as folhas das mudas foram levemente feridas com areia e em seguida inoculadas com uma suspensão contendo 10^8 ufc de *P. syringae* pv. *garcae*. Após a inoculação as mudas foram colocadas em câmara úmida, no escuro, por 3 dias e depois transferidas para casa de vegetação. Dez a quatorze dias após a inoculação foram realizadas avaliações de severidade da mancha aureolada, mantendo-se intervalos semanais entre as avaliações.

Os experimentos foram efetuados em delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições, sendo cada repetição representada por uma muda de cafeeiro. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos que mais inibiram a formação de colônias em meio de cultura foram a Casugamicina, que inibiu a partir da dose de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de princípio ativo e o Ácido Fosforoso, inibindo totalmente a formação de colônias a partir de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de princípio ativo. O Acibenzolar-S-Methyl não inibiu a formação de colônias de *P. syringae* pv. *garcae* e o Produto biológico teve pouco efeito in vitro (Tabela 1).

Tabela 1. Presença (+) ou ausência (-) de unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em microplacas contendo meio N.A. acrescido de indutores de resistência e do antibiótico Casugamicina para os isolados IBSBF1664 e IBSBF 2840.

Compostos	Isolados	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)							
		0	50	100	250	500	750	1000	2000
ASM ¹	IBSBF 1664	+	+	+	+	+	+	+	+
	IBSBF 2840	+	+	+	+	+	+	+	+
PB ²	IBSBF 1664	+	+	+	+	+	+	+	+
	IBSBF 2840	+	+	+	+	+	+	+	+
AF ³	IBSBF 1664	+	+	+	+	-	-	-	-
	IBSBF 2840	+	+	+	+	-	-	-	-
FF ⁴	IBSBF 1664	+	+	+	+	-	-	-	-
	IBSBF 2840	+	+	+	+	+	+	+	-
Casugamicina	IBSBF 1664	+	+	-	-	-	-	-	-
	IBSBF 2840	+	+	-	-	-	-	-	-

¹ Acibenzolar-S-methyl, ² Produto biológico formulado com *Bacillus spp.*, ³ Ácido Fosforoso, ⁴ Fertilizante Foliar formulado com ácidos húmicos e cobre.

Os indutores tiveram pequeno efeito sobre a redução na severidade da mancha aureolada quando foram aplicados no substrato, especialmente na primeira avaliação. Na segunda avaliação os tratamentos com o produto biológico, o fertilizante foliar e o Acibenzolar-S-methyl reduziram significativamente a severidade da mancha aureolada nas mudas inoculadas (Figura 1).

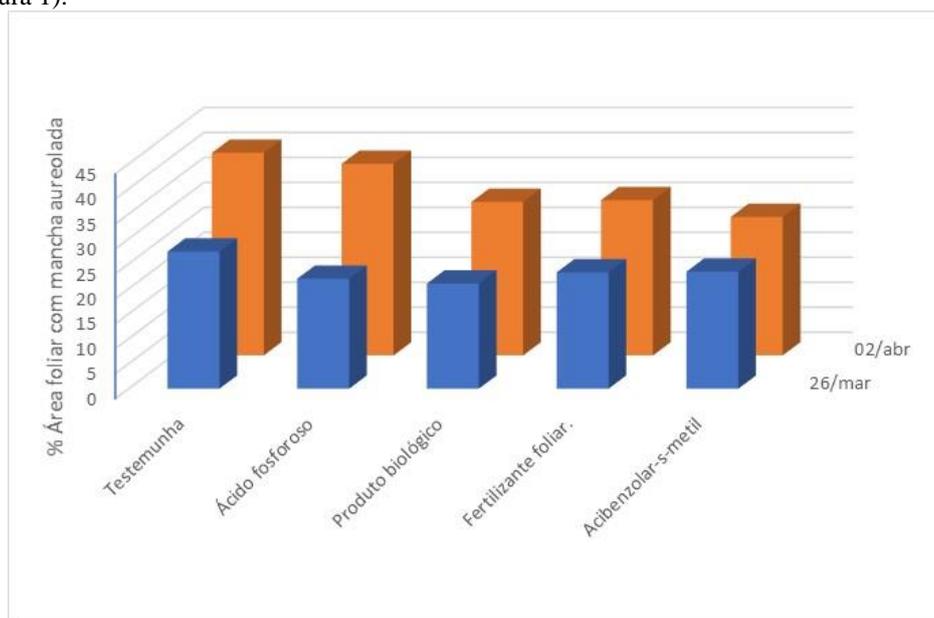


Figura 1. Severidade, avaliada pela porcentagem de área foliar afetada pela mancha aureolada em mudas de café tratadas no substrato, com indutores de resistência.

No segundo experimento, com exceção do ácido fosforoso, os demais tratamentos reduziram a severidade da mancha aureolada nas mudas de café. O tratamento mais eficiente foi com a casugamicina, sendo seguido pelos tratamentos com o Fertilizante Foliar e o Acibenzolar-S-methyl, que foram mais eficientes que o tratamento com o produto biológico (Figura 2).

Assim como observado no presente estudo, a Casugamicina e o Acibenzolar-S-Methyl já haviam reduzido a severidade da mancha aureolada em estudo realizado anteriormente (Patricio et al., 2006). O fato de o Acibenzolar-S-methyl não ter demonstrado efeito tóxico à bactéria nas microplacas, até quando aplicado na concentração de $2000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de princípio ativo indica que esse produto está agindo como indutor de resistência, como observado anteriormente (Patricio et al., 2006).

Como o Fertilizante foliar demonstrou pequeno efeito quando aplicado no solo, reduziu significativamente a severidade da doença quando aplicado na parte aérea e foi pouco tóxico quando testado nas microplacas, pode estar havendo uma ação do produto por indução de resistência, um mecanismo pouco estudado para este tipo de composto.

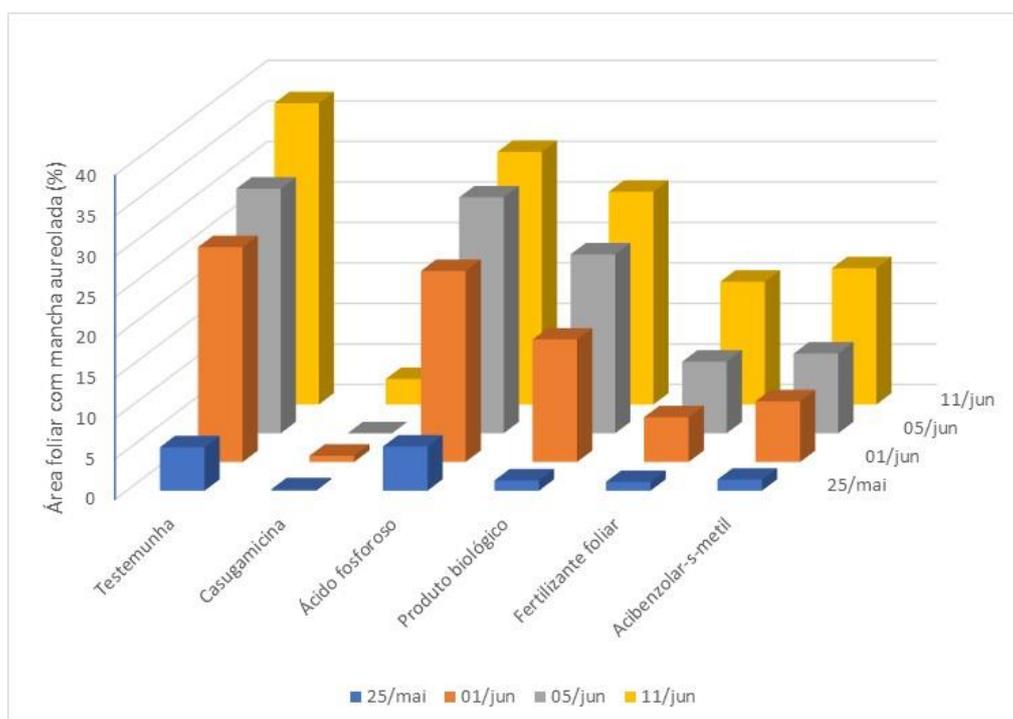


Figura 2. Severidade, avaliada pela porcentagem de área foliar afetada pela mancha aureolada, em mudas de café da cultivar Mundo Novo, tratadas na parte aérea com indutores de resistência e o antibiótico casugamicina.

CONCLUSÕES

1. Os compostos Acibenzolar-S-methyl e o Produto biológico formulado com *Bacillus* spp. tiveram pouco ou nenhum efeito sobre a redução de colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em microplacas.
2. O Ácido fosforoso e a Casugamicina inibiram a formação de colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* a em meio de cultura a partir das doses de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente.
3. Os produtos testados tiveram pouco efeito sobre a redução na severidade da mancha aureolada quando aplicados no substrato, mas o Produto biológico, o Fertilizante foliar e o Acibenzolar-S-methyl reduziram a severidade da doença.
4. Na aplicação na parte aérea o tratamento que mais reduziu a severidade da mancha aureolada foi com a Casugamicina, seguido pelos tratamentos com o Fertilizante foliar e o Acibenzolar-S-methyl, seguidos pelo tratamento com o Produto biológico.
5. A comparação entre os resultados in vitro e nas mudas de café indica que o Fertilizante foliar deve estar agindo por indução de resistência, com efeito equivalente ao do indutor Acibenzolar-S-methyl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I. M. G.; MACIEL, K. W.; BERIAM, L. O. S.; RODRIGUES, L. M. R., DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES-NETO, J.; PATRÍCIO, F. R. A. Increase in Incidence of Bacterial Halo Blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Coffee Producing Areas in Brazil. *ASIC – Costa Rica, ANAIS, CD-ROM*. p.1080-1084, 2012.
- PAL, K. K. AND B. MCSPADDEN GARDENER, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02. Updated 2011
- PATRÍCIO, F.R.A.; ALMEIDA, I.M.G.; BARROS, B.C.; SANTOS, A.S.; FRARE, P.M. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. *Annals of Applied Biology*, n. 152, p. 29-39, 2007. Doi/10.1111/j.1744-7348.2007.00187
- PATRÍCIO, F.R.A.; OLIVEIRA, E.G. Desafios no manejo de doenças do café. *Visão Agrícola*, v.12, p.51-54, 2014.