



CONTROLE BIOLÓGICO de *Colletotrichum lindemuthianum* POR BACTÉRIAS FIXADORAS DE N₂ NO FEIJOEIRO

BRAGA, T. C.; MESQUITA, A. C.; FLORENTINO, L. A.; RESENDE, M. L.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de três estirpes bacterianas fixadoras de N₂ no fungo *Colletotrichum lindemuthianum* em condições de laboratório e em plantas de feijão. No teste *in vitro* as estirpes UNIFENAS 03-12 e UNIFENAS 03-17 apresentaram melhor resultado inibindo o patógeno causador da antracnose e em vasos se destacou UNIFENAS 03-12.

INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de alto consumo pela população brasileira. Sua importância social e econômica pode ser facilmente evidenciada, constituindo a principal fonte de proteínas para a população de baixa renda (Borém & Carneiro, 1998), além de ser rico em Fe, carboidratos e fibras.

Das doenças que atacam o feijoeiro, a antracnose, cujo agente etiológico é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, se destaca entre as principais que interferem na produtividade do feijoeiro. Esse patógeno sobrevive em restos culturais e principalmente em sementes contaminadas externamente por conídios, ou internamente, pelo micélio dormente, o que possibilita sua transmissão de um plantio para outro e para longas distâncias. Pode também ser transmitido pelo vento e por respingos de água de chuva, (KIMATI et al. 1997), homem, insetos, animais e máquinas agrícolas (VIEIRA et al., 1993).

É desejável que a principal medida de controle da antracnose seja a resistência genética, por minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente. Porém, devido à resistência de muitas raças do patógeno, este método de controle torna-se extremamente difícil, o que faz necessário intervenções químicas.

Apesar da eficiência comprovada e da facilidade de aplicação, o uso contínuo de fungicidas pode resultar no aparecimento de problemas sócio-ambientais. Uma agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e saúde.

Uma das alternativas potenciais para atingir este objetivo é o uso das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que podem atuar no controle de fitopatógenos (Peix et al., 2001), as quais podem pertencer à classe dos rizóbios (Oliveira, 2009).

Estas bactérias, consideradas agentes de biocontrole, podem atuar sobre o fungo comprometendo algum processo fisiológico cujo efeito pode ser fungistático ou fungicida (BERNARDES, 2010). Estas bactérias são nativas nos solos ou plantas, não interferindo no equilíbrio ecológico e, portanto enquadrando-se plenamente na realidade da agricultura orgânica e sustentável.

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de bactérias fixadoras de N₂ no fungo *C. lindemuthianum* em condições de laboratório e em plantas de feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada na Faculdade de Agronomia na Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas- MG.

Na primeira etapa, foram utilizadas três estirpes de bactérias fixadoras de N₂ pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UNIFENAS (UNIFENAS 02-10, UNIFENAS 03-12 e UNIFENAS 03-17). Estas bactérias foram cultivadas em meio de cultura 79 (FRED; WAKSMAN, 1928), até o aparecimento de colônias isoladas.

O fungo *C. lindemuthianum* foi isolado em placa de Petri contendo o meio de cultura de vagem inteira - MVI (DALLA PRIA *et al.*, 1997). Em seguida foram retirados discos de 6 mm do fungo e transferido no centro de outra placa, contendo o meio BDA. As colônias das bactérias foram repicadas formando um quadrado

medindo 3 x 3 cm ao redor do disco. O controle foi constituído pela inoculação do fungo sem a presença de bactéria.

As placas foram incubadas em câmaras tipo BOD por dez dias a uma temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob alternância de luz. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e quatro repetições. Os resultados foram avaliados pelo crescimento micelial do fungo, comparando com o controle.

Posteriormente essas estirpes foram inoculadas no feijoeiro em casa de vegetação. Nesse experimento o feijão foi cultivado em vasos com capacidade de 8 dm³ solo e areia na proporção de 3:1, respectivamente. Foram utilizadas sementes da cultivar Pérola e estas foram inoculadas no plantio com um mL de suspensão bacteriana, contendo aproximadamente 10^9 células mL⁻¹, das estirpes UNIFENAS 02-10, UNIFENAS 03-12 e UNIFENAS 03-17.

O inóculo de *C. lindemuthianum* foi produzido em placas contendo o meio de vagem inteira - MVI (DALLA PRIA *et al.*, 1997. Após 15 dias de incubação foi realizada suspensão de conídios das colônias fúngicas. A suspensão de esporos foi calibrada com ajuda da câmara de Neubauer para $2,0 \times 10^6$ conídios mL⁻¹, pré-estabelecida por meio de testes preliminares.

As plantas foram inoculadas com o patógeno quando a primeira folha trifoliolada estava completamente expandida, ao décimo dia após a inoculação do fungo foram feitas pulverizações com bactérias e químico nos respectivos tratamentos. Ao vigésimo dia após inoculação repetiu-se as pulverizações.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro tratamentos (controle químico, inoculação com três estirpes bacterianas), associado ou não à inoculação do patógeno fúngico. Avaliou-se a matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN), os quais foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística Sisvar (Ferreira, 2011), versão 5.3. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes *in vitro* observou-se diferença do crescimento micelial quando em presença das bactérias em relação ao controle, sendo as estirpes bacterianas UNIFENAS 03-12 e UNIFENAS 03-17 apresentaram maior efeito inibidor do patógeno *C. lindemuthianum* seguido pela estirpe UNIFENAS 02-10 (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de crescimento do fungo *C. lindemuthianum* em presença das estirpes bacterianas.

TRATAMENTOS	Diâmetro micélio fúngico (mm)
Controle	41,876 a
UNIFENAS 02-10	31,876 b
UNIFENAS 03-12	12,75 c
UNIFENAS 03-17	14,25 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No experimento em vasos, os tratamentos que foram inoculados com o fungo *C. lindemuthianum* não apresentaram diferença estatística para matéria seca da parte aérea e quando não inoculados, o tratamento UNIFENAS 03-12 obteve o melhor resultado seguido de UNIFENAS 02-10 e demonstrando resultados inferiores os tratamentos QUÍMICO e UNIFENAS 03-17. A interação (inoculados X não inoculados) não apresentou significância para os tratamentos QUÍMICO e UNIFENAS 03-17 e os demais tratamentos se diferiram apresentando melhores valores para não inoculados .

Na avaliação de número de nódulos não houve diferença nos tratamentos quando inoculados, e para não inoculados os tratamentos UNIFENAS 02-10 e UNIFENAS 03-12 apresentaram número de nódulos superior aos demais tratamentos. Os tratamentos UNIFENAS 02-10, UNIFENAS 03-17 e UNIFENAS 03-12 obtiveram maior número de nódulos quando não inoculados com o fungo.

Avaliando a matéria seca dos nódulos, não houve diferença estatística nos tratamentos quando inoculados, mas quando não inoculados obteve resultado significativo os tratamentos UNIFENAS 02-10 e UNIFENAS 03-12 e apresentando resultados inferiores os tratamentos QUÍMICO E UNIFENAS 03-17.

Tabela 2. Matéria Seca Parte Aérea (MSPA), Número de Nódulos (NN), Matéria Seca de Nódulos (MSN)

TRATAMENTOS	INOCULAÇÃO					
	MSPA		Nº NÓDULOS		MSN	
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
QUÍMICO	4,61 Aa	5,51 Ca	56,50 Aa	93,00 Ba	27,50 Aa	72,25 Ca
UNIFENAS 02-10	4,69 Ab	7,46 Ba	56,50 Ab	228,50 Aa	9,00 Ab	153,50 Ba
UNIFENAS 03-17	4,83 Aa	5,94 Ca	36,75 Ab	132,50 Ba	3,00 Ab	92,75 Ca
UNIFENAS 03-12	4,55 Ab	9,64Aa	43,00 Ab	292,00 Aa	9,75 Ab	175,50 Ba

De acordo com CHATERMOON (2004) a capacidade de controle de patógenos por bactérias é proporcionada por vários mecanismos como: produção de compostos tóxicos aos patógenos, como as enzimas hidrolíticas, biosurfactantes e antibióticos, competição por espaço e nutrientes, indução de resistência, produção de sideróforos, entre outros. Os resultados deste trabalho sugerem que as bactérias atuaram utilizando algum mecanismo de forma inibidora do patógeno.

Os estudos com BPCP no Brasil tem sido direcionados para as áreas de controle biológico e promoção de crescimento, sendo integrados num sistema de manejo sustentável MARIANO(2013).

CONCLUSÕES

O uso das estirpes UNIFENAS 03-12, UNIFENAS 02-10 e UNIFENAS 03-17 pode ser alternativa viável no controle da antracnose .No entanto outros estudos serão realizados para verificação do comportamento no campo.

REFERÊNCIAS

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E. de S.A Cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais. Viçosa: Editora UFV, 1998. p.13-17.

BERNARDES, F. S. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathol**, v. 36, n. 2, p. 115-121, 2010.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. In: Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas, 2ª edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo/SP, v. 2, p. 383-385, 1997.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A.. Yeast Extract – Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw Hill, 1928, 145p.

DALLA PRIA, M. Quantificação de parâmetros monocíclicos da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) do feijoeiro. 1997. 82p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PEIXOTO, N. 2001. Interação genótipo x ambiente e divergência genética em feijão-vagem de crescimento indeterminado. Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias de Jaboticabal. 66p.(Tese de doutorado).

OLIVERIA, D. R. F.; ALVIN, K. R.; SANTANA, D. G. Avaliação de genótipos de feijoeiro comum do grupo comercial carioca cultivados nas épocas das águas e do inverno em Uberlândia, estado de Minas Gerais. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 31, n. 1, 2009.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

VIEIRA, S.A.; ALVES, S.B.; STIMAC, J.L. ; ESTAVAM, R.C. Seleção de isolados de *Metharhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para o controle de *Periplaneta americana* (L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 5., Piracicaba, 1993. **Anais**. Piracicaba: FEALQ. 1993.

MARIANO, R. D. L. R., DA SILVEIRA, E. B., DE ASSIS, S. M. P., GOMES, A. M. A., NASCIMENTO, A. R. P., & DONATO, V. M. T. S. (2013). Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*.