

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ANTAGONISTAS COM POTENCIAL PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS HABITANTES DO SOLO.

Lara Rezek Rocha (Bolsista PIBIC/CNPq-UNIDERP), e-mail: lara_rezek@hotmail.com. Laís Mayara Melo Duré (Colaboradora), e-mail: laisdure@gmail.com. Clara de Andrade Medina (Colaboradora), e-mail: clara_andmedina@hotmail.com. Bianca Obes Corrêa (Orientador), e-mail: bianca.obescorreia@yahoo.com.br.

Universidade Anhanguera – UNIDERP | Programa de Pós-Graduação em Produção e Gestão Agroindustrial

Área: Agronomia**Introdução**

Os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*, agentes causais do mofo branco e podridão da raiz, respectivamente (MICHEREFF *et al.*, 2005), atacam diversas espécies vegetais, além de espécies de importância econômica como plantas do gênero *Crotalaria spp* (FLORES; MIOTTO, 2005) muito utilizadas como adubo verde e muito eficazes como produtoras de massa vegetal e como fixadoras de nitrogênio (SALGADO *et al.*, 1982). No entanto, a incidência e dificuldade de controle dos mesmos, promove o interesse pela busca de métodos alternativos para o controle destes fitopatógenos.

O controle biológico é a redução do inóculo ou dos fatores determinantes da doença que são causados por um patógeno, exercido por microrganismos (COOK; BAKER, 1983). O uso de bactérias antagonistas capazes de produzirem metabólitos tóxicos, como antibióticos e bacteriocinas, por meio de antibiose, é um dos principais mecanismos de ação do controle biológico, causando efeito negativo sobre o fitopatógeno (BETTIOL; GHINI, 2005), e representando uma das estratégias para seleção de micro-organismos para programas de controle de doenças.

O objetivo do trabalho foi selecionar bactérias isoladas de diferentes nichos e avaliar a capacidade das mesmas em inibir o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani in vitro*, por antibiose, utilizando diferentes metodologias, além de testar a capacidade de redução de microrganismos contaminantes de sementes das espécies *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria juncea*.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Campo experimental da Universidade Anhanguera Uniderp Agrárias e no Laboratório de Fitopatologia, no município de Campo Grande – MS.

Coleta e isolamento das bactérias do solo e rizosfera:

Foram coletadas amostras de solo com 20 cm de profundidade nos cultivos de cana-de-açúcar em dois pontos, e um ponto de milho, café, crotalaria e feijão. Após

a coleta, realizou-se o procedimento de diluição seriada das amostras para isolamento dos micro-organismos, em meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar), que foram acondicionadas em BOD por 48 horas a 28 °C.

Antibiose:

Foi realizado confronto direto com os fungos *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, para apurar quais bactérias possuíam capacidade de controle biológico através da antibiose.

Antibiose pelo tratamento dos escleródios com bactérias antagonistas:

Neste ensaio foi realizado o tratamento dos escleródios, de diferentes tamanhos, desinfestados com hipoclorito de sódio a 0,1%, com as bactérias antagonistas ($A_{540}=0,5$) por 30 minutos e os mesmos colocados em placas de Petri meio de cultura BDA e incubados a 25 °C pelo período de 15 dias. Para tanto, foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado para cada uma das bactérias e os diferentes tamanhos de escleródios, com quatro repetições.

Antibiose em meio líquido:

Foi utilizado meio de cultura BD líquido, sem ágar, para avaliar o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, e para isso foram repicados discos de micélio e postos em Erlenmeyers adicionado com as bactérias que se destacaram, no confronto direto, e como testemunha somente o fungo.

*Avaliação do potencial antagonista em sementes de *Crotalaria* sp.:*

As sementes de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis* foram tratadas com suspensão das bactérias Fit-03 e Fit-04, as testemunhas das duas espécies foram embebidas apenas em solução salina. As mesmas, foram submetidas ao Blotter test (BRASIL, 2009) em caixas gerbox, que foram incubadas por 7 dias. A avaliação foi realizada sobre cada semente em microscópio observando os fungos que estavam sobre as mesmas.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 93 bactérias, sendo 46 de solo sob cultivo de milho, 34 sob o cultivo de cana-de-açúcar e 13 bactérias sob cultivo de feijão. Estes isolados apresentaram grande diversidade em suas características morfológicas.

Das 93 bactérias isoladas, 51 apresentaram crescimento, destas, seis possibilitaram inibição dos fungos fitopatogênicos. No confronto com *Fusarium solani*, apenas os isolados bacterianos Fit 03, Fit 04, Fit 05, Fit 07, Fit 12, e Fit 27 apresentaram inibição no crescimento micelial do patógeno. Os isolados Fit 04 e Fit 05 foram os únicos que apresentaram característica inibitória ao desenvolvimento da *Sclerotinia sclerotiorum*, como pode-se observar no Quadro 1.

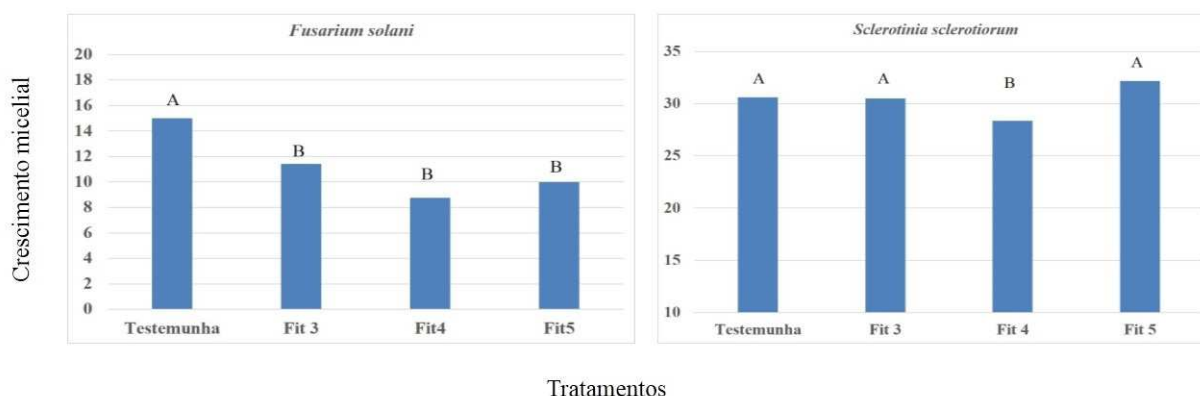
Quadro 1- Antibiose de 51 isolamentos bacterianos isolados de diferentes nichos sobre o confrontamento direto com *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. Campo Grande/MS

Isolados bacterianos	Antibiose
<i>Fusarium solani</i>	
Fit 03 04 05 07 08 09 11 12 13 14 15 16 17 18 19 23 24 27 28 30 31 34 41 42 43 44 45 53 60 62 63 64 66 67 69 71 72 75 76 79 82 83 84 85 86 87 88 89 91 92 93	03 04 05 07 12 27
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
Fit 03 04 05 07 08 09 11 12 13 14 15 16 17 18 19 23 24 27 28 30 31 34 41 42 43 44 45 53 60 62 63 64 66 67 69 71 72 75 76 79 82 83 84 85 86 87 88 89 91 92 93	04 05

Fonte: Dados da pesquisa.

As porcentagens de inibição do crescimento micelial (PIC) dos fungos *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* e das bactérias Fit 03, Fit 04 e Fit 05, estão expressos na Figura 1, onde observa-se que os isolados Fit 03 e Fit 04 tiveram um PIC de 23,3 e 23,7% em relação ao *F. solani*, já nos resultados referentes a *S. sclerotiorum* somente Fit04, reduziu o crescimento do fungo.

Figura 1- Antibiose por confrontamento direto dos isolados bacterianos e os respectivos fungos fitopatogênicos, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fonte: Dados da pesquisa.

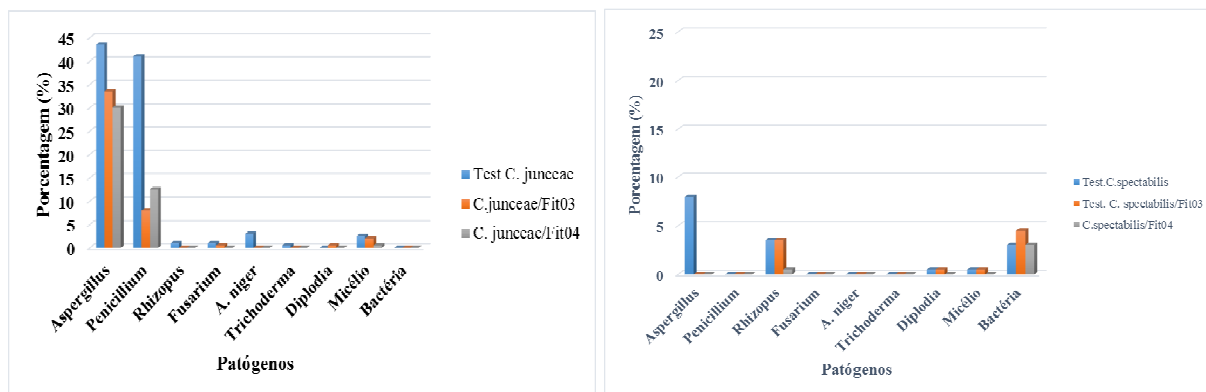
No tratamento dos escleródios com as bactérias Fit 03 e Fit 04, devido à alta contaminação não foi possível realizar avaliação, mas podemos observar no desenvolvimento dos escleródios tratados que os micélios eram mais hialinos e não houve produção de escleródios, diferentemente das testemunhas, que produziram novos escleródios.

Para o teste em meio líquido as bactérias Fit 03 e Fit04 permitiram a inibição do crescimento micelial do fungo, produzindo uma pigmentação verde no meio de cultura (característica comum de bactérias pertencentes a espécie *Pseudomonas fluorescens*).

As habilidades de redução de micro-organismos, foram observadas quando as sementes de *Crotalaria* sp. foram tratadas com suspensão das bactérias Fit03 e Fit04 (Figura 2), que proporcionou redução da incidência de fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* nas duas espécies vegetais, os quais são patógenos que ocasionam

perdas significativas quanto ao valor cultural e nutricional nas plantas (PESKE; ROSENTHAL; ROTA, 2012).

Figura 3 - Microbiolização de sementes das duas espécies de *Crotalaria* sp. e incidência de patógenos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Conclusão

Pode-se afirmar que as bactérias isoladas Fit03 e Fit04 inibiram, por antibiose, o desenvolvimento dos fungos *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*; reduziram micro-organismos contaminantes de sementes das espécies *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria juncea*, além disso apresentam potencial de uso em programas de controle biológico do mofo branco em *Crotalaria* sp.

Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPQ pela concessão da bolsa, e também a Prof^a Dra. Bianca Obes Corrêa pela orientação, oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Referências

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 2009.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. The Nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: APS, 1983.

FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae – Faboideae) na região Sul do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.19, n.2, p. 245-249, 2005.

MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. Controle biológico de doenças de plantas. Recife. Imprensa Universitária-UFRPE, 1993.

PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.D.; ROTA, G.R.M. Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos. Pelotas: Pelotas, 2012. .

SALGADO, A.L.B. *et al.* Efeito da adubação NPK na cultura da crotalária. *Bragantia*, v.41, p.21-33, 1982.