

XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

CONTROLE BIOLÓGICO DA ANTRACNOSE POR BACTÉRIAS FIXADORAS DE N₂ NO FEIJOEIRO

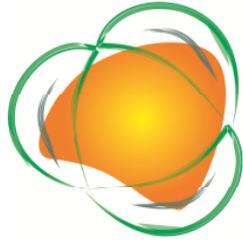
Tatiane Cristina Braga⁽²⁾; Maria de Lourdes Resende⁽¹⁾; Ligiane Aparecida Florentino⁽¹⁾; Tayla Évellin de Oliveira⁽²⁾; Evandro Israel Resende⁽²⁾; Anderson Romão Dos Santos⁽²⁾; Gabriel Garcia da Fonseca⁽²⁾;

(1) Professora do Dep. Agronomia da Universidade José do Rosario Vellano-UNIFENAS, campos Alfenas-MG.

(2) Estudante de graduação da Universidade José do Rosario Vellano-UNIFENAS, campos Alfenas-MG.

RESUMO– O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de bactérias fixadoras de N₂ no fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose, em condições de laboratório e em plantas de feijão. Na primeira etapa, foram utilizadas dez estirpes de bactérias fixadoras de N₂ pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UNIFENAS, cultivadas em meio de cultura 79, também denominado YMA, 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. 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 da colônia fúngica. O controle foi constituído dos micélios, porém sem a presença das bactérias. As placas foram incubadas em câmaras tipo BOD por dez dias a uma temperatura de 24 ± 2°C com 16 horas de luz e oito horas no escuro. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e quatro repetições. Os resultados foram avaliados pelo crescimento micelial do fungo, medido com o auxílio de um paquímetro. No experimento in vitro, as estirpes UNIFENAS 02-10, UNIFENAS 03-12 e UNIFENAS 03-17 foram as que apresentaram maior capacidade de inibir o fungo *C. lindemuthianum*, por isso, foram selecionadas para inoculação no feijoeiro em casa de vegetação. Utilizou-se vasos com capacidade de 8 dm³ de solo e areia na proporção de 3:1. Foram utilizadas sementes do cultivar Pérola, as quais foram inoculadas com suspensão bacteriana e semeadas (quatro) por vaso e ao décimo dia houve desbaste ficando apenas duas plantas por vaso. Observou-se nas plantas que as bactérias foram eficientes no controle do patógeno causador da antracnose. Esse estudo sugere que o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) pode ser uma alternativa viável no controle da antracnose.

Palavras-chave: Inoculação. Fungo. Estirpes. *Trichoderma*.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the antifungal potential of N₂-fixing bacteria in *Colletotrichum lindemuthianum*, which causes anthracnose in laboratory conditions and bean plants. In the first stage, we used ten strains of N₂-fixing bacteria belonging to the collection of Agricultural Microbiology Laboratory of UNIFENAS grown in culture medium 79, also called YMA, until the appearance of isolated colonies. *C. lindemuthianum* fungus was isolated in Petri dishes containing the medium of whole pod culture - MVI. They were then removed from the fungus 6 mm discs and transferred at the center of another plate containing PDA medium. The colonies of bacteria were picked forming a square measuring 3 x 3 cm around the drive of the fungal colony. The control consisted of mycelia, but without the presence of bacteria. The plates were incubated in BOD chambers for ten days at a temperature of 24 ± 2 ° C with 16 hours light-eight hours in the dark. We used a completely randomized design (CRD) with four treatments and four replications. The results were evaluated by mycelial growth, measured using a caliper. In vitro experiment, strains UNIFENAS 02-10, 03-12 and UNIFENAS UNIFENAS 03-17 showed the greatest ability to inhibit the fungus *C. lindemuthianum*, so we were selected for inoculation in common bean in the greenhouse. It was used with vessels 8 dm³ capacity of soil and sand in the ratio 3: 1. Seeds were used cultivar Pearl, which were inoculated with bacterial suspension and plated (four) per pot and thinned to the tenth day there being only two plants per pot. It was observed in plants that bacteria were efficient in controlling the causative pathogen of anthracnose. This study suggests that the use of plant growth promoting bacteria (BPCV) may be a viable alternative to control anthracnose.

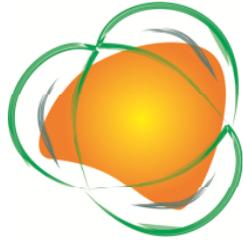
Keywords: Inoculation. Fungus. Trichoderma. Strains.

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*, destaca-se entre as principais doenças. Pode ser transmitida pelo vento, por respingos de água (chuva e irrigação), (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.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

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, dentro do contexto econômico, social e político de cada região.

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). As 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, objetivou-se com esta pesquisa avaliar o potencial antifúngico de bactérias fixadoras de N₂ no fungo *C. lindemuthianum* em condições de laboratório e em plantas de feijão.

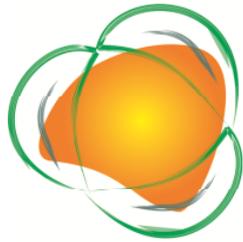
Material e Métodos

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

Na primeira etapa, foram utilizadas dez 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 ou YMA (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 foi retirado discos de 6 mm do fungo e transferido para o 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 dos micélios, porém sem a presença das bactérias. As placas foram incubadas em câmaras tipo BOD por dez dias a uma temperatura de 24 ± 2°C sob alternância de luz (16 horas de luz e oito horas no escuro).

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e quatro repetições. Os resultados foram avaliados pelo crescimento micelial do fungo, medido com o auxílio de um paquímetro.

As estirpes UNIFENAS 02-10, UNIFENAS 03-12 e UNIFENAS 03-17 foram as que apresentaram maior capacidade de inibir o fungo *C. lindemuthianum*, por isso, foram selecionadas para inoculação no feijoeiro em casa de vegetação.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

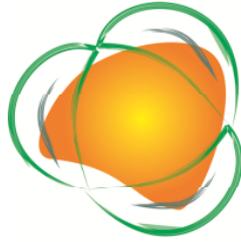
O experimento in vivo foi realizado em vasos com capacidade de 8 dm³, contendo solo e areia na proporção de 3:1, respectivamente. Foram utilizadas sementes do cultivar Pérola, em cada vaso foram semeadas quatro sementes as quais foram inoculadas com suspensão bacteriana e ao décimo dia houve desbaste ficando apenas duas plantas por vaso. O inóculo de *C. lindemuthianum* foi produzido em placas contendo o meio de vagem inteira - MVI (DALLA PRIA *et al.*, 1997). As placas com as culturas fúngicas foram incubadas por 15 dias à temperatura de 24°C ± 2 sob alternância de luz. Após este período foi realizada suspensão de conídios das colônias fúngicas os quais foram lavados com água destilada, acrescida de Tween 20 (uma gota para cada 100 ml), com o auxílio de um pincel de cerdas macias, para facilitar a liberação dos conídios. A suspensão de esporos foi calibrada com ajuda da câmara de Neubauer para 2,0 x 10⁶ conídios/ml, pré-estabelecida por meio de testes preliminares.

A inoculação com a suspensão do fungo foi efetuada aos 25 dias após o plantio quando a primeira folha trifoliolada estava completamente expandida, utilizando borrifador manual, até o ponto de escorrimento. Em seguida as plantas permaneceram em câmara úmida por 24 h com foto período (12 h de luz e 12 horas de escuro) com temperatura de 25°C. Após este período as plantas foram levadas novamente para casa de vegetação. As pulverizações com os respectivos tratamentos foram efetuadas no décimo e vigésimo dias após a inoculação do fungo. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial x 2, sendo cinco tratamentos (Estirpes UNIFENAS 02-10, UNIFENAS 03-12 e UNIFENAS 03-17, e controle) e inoculadas com e sem fungo em quatro repetições

As características avaliadas foram: Peso seco das plantas, número de nódulos e peso seco dos nódulos

Resultados e Discussão

Os resultados médios do crescimento dos fungos na presença das bactérias, pode ser observado na Tabela 1 No experimento *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).



XIII Congresso Nacional de
MEIO AMBIENTE
de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

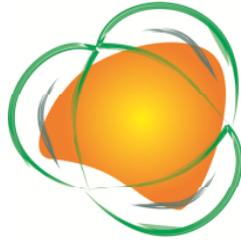
Tabela 1: Os resultados médios do crescimento dos fungos na presença das bactérias

TRATAMENTOS	MÉDIAS 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% probabilidade.

Os resultados médios da matéria seca da parte aérea, número de nódulos e matéria seca de nódulos do experimento em casa de vegetação pode ser observado na Tabela 2

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 controle e UNIFENAS 03-12 obtiveram os melhores resultados seguidos de UNIFENAS 02-10 e demonstrando resultados inferiores os tratamentos E UNIFENAS 03-17. A interação (inoculados X não inoculados) não apresentou significância para o tratamento com a estirpe UNIFENAS 03-17, porém os demais tratamentos se diferiram apresentando melhores valores para não inoculados .



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

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

INOCULAÇÃO					
TRATAMENTOS	MSPA Nº		NÓDULOS MSN		
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM
NÃO					
CONTROLE	5,43 Ab	8,74 Aa	30,25 Ab	281,25 Aa	4,75 Ab 221,25 Aa
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	9,64 Aa	43,00 Ab	292,00 Aa	9,75 Ab 175,50 Ba

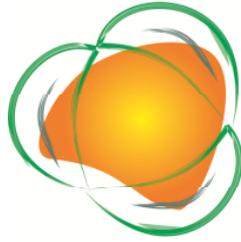
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na avaliação de número de nódulos não houve diferença nos tratamentos quando inoculados, e para não inoculados os tratamentos CONTROLE, UNIFENAS 02-10 e UNIFENAS 03-12 apresentaram número de nódulos superior aos demais. Os tratamentos controle, 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 o tratamento controle, seguido dos tratamentos UNIFENAS 02-10 e UNIFENAS 03-12 e apresentando resultados inferiores ao tratamento com a bactéria UNIFENAS 03-17.

Conclusões

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) é uma alternativa viável no controle da antracnose. Com fonte ARIAL tamanho 12, espaçamento simples, justificado.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Agradecimento(s) FAPEMIG

Referências Bibliográficas

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

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.

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.

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

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.

Paulitz, C.T. & Belanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39: 103-133. 2001.