

## ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS BACTERIANOS SOBRE FUNGOS HABITANTES DO SOLO PATOGÊNICOS A CULTURA DO FEIJÃO

FÁTIMA GIOVANA TESSMER SANTIN<sup>1</sup>; ISMAIL TEODORO DE SOUZA JÚNIOR<sup>2</sup>; MAURICIO SANGIAGO<sup>2</sup>; RENATA MOCCELLIN<sup>2</sup>; JULIA PELEGREINELI FASOLIN<sup>2</sup>; ANDREA BITTENCOURT MOURA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – santingiovana@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – ismail.teodoro@ufrgs.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – abmoura@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) é afetada por uma ampla gama de fitopatógenos, dentre os quais, destacam-se os fungos habitantes do solo, devido sua dificuldade de controle e potencial de danos. Entre esses estão *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofobranco, *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão parda da haste e *Rhizoctonia solani*, causando damping-off e podridão do caule e raízes (BUENO et al., 2006).

Para o controle desses fitopatógenos, usualmente tem-se lançado mão da aplicação de fungicidas, no entanto, esses têm o inconveniente de serem potenciais contaminantes ambientais e humano. Atualmente a população mundial cada vez mais tem dado preferência por produtos livres de agroquímicos, fazendo com que aumentem as pesquisas em programas de controle biológico (REMUSKA et al., 2007).

Dentre os microrganismos utilizados como agentes de controle biológico, têm-se as actinobactérias. Isolados desse grupo de bactérias têm sido amplamente citados na literatura como potenciais agentes de biocontrole de fungos (MEDINA et al., 2013), bactérias (GAVA et al., 2002) e nematoïdes (SOUSA et al., 2006). Sabe-se que as actinobactérias são um grupo promissor de microrganismos capazes de produzir metabólitos bioativos (BACHIEGA et al. 2005). As actinobactérias estão, naturalmente presentes no solo e, quando testados in vitro, isolados do gênero *Streptomyces* têm mostrado potencial para produzir antibióticos que reduzem ou inibem o crescimento e desenvolvimento de patógenos de plantas comuns no solo (BRESSAN; FIGUEIREDO, 2008). Várias espécies de actinobactérias têm sido amplamente estudadas devido à capacidade de produzir metabólitos secundários, como antibióticos, enzimas extracelulares entre outros (SOARES et al., 2009).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a antibiose de cinco isolados de actinobactérias sobre os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina*.

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão. Os isolados fúngicos e bacterianos foram adquiridos do banco de isolados do laboratório. Os isolados de actinobactérias foram obtidos como contaminantes em placas de Petri apresentando antibiose contra o fungo *S. sclerotiorum*.

A atividade antifúngica dos cinco isolados de actinobactérias foi analisada pelo confrontamento direto em placas de Petri. Para isso foram utilizados os fungos fitopatogênicos *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e os isolados bacterianos biocontroladores, SC1, SC2, SC3, SC4 e SC5. Os isolados bacterianos biocontroladores e os patógenos foram testados individualmente.

Para isso, discos de micélio de quatro mm de diâmetro, dos fungos fitopatogênicos, foram retirados das bordas de colônias fúngicas crescidas previamente a 24°C por sete dias em placas de Petri, e transferidos para placas de Petri com 95 mm de diâmetro contendo meio de cultura NA (nutriente-ágar). Os isolados fúngicos e bacterianos foram dispostos em extremidades opostas em uma distância de 40 mm na placa de Petri. Como testemunhas, foi repicado apenas disco de micélio do fungo.

As placas foram incubadas em câmara de crescimento do tipo BOD, a 24°C, com fotoperíodo de 12h. Diariamente foi feita a mensuração do crescimento dos fungos no lado adjacente ao agente biocontrolador. Também foi avaliada a formação do halo de inibição induzido pelos biocontroladores e o número de escleródios por placa para o fungo *S. sclerotiorum*.

O experimento foi montado em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, em que cada parcela experimental consistiu uma placa de Petri. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de comparação múltipla de medias Tukey, a 5 % de probabilidade de erro.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados encontrados no experimento para o controle biológico de *S. sclerotiorum* foi observado que todos isolados bacterianos diminuiram o crescimento micelial do fungo em relação a testemunha, em média 42,90%. Em relação a taxa de crescimento em mm por dia também observou-se que todos os isolados inibiram o crescimento, em média 43,14%. Para o número de escleródios de *S. sclerotiorum*, observou-se que quatro isolados foram mais eficientes, com uma redução média de 91,46%, já o isolado SC5 apresentou uma redução de 72,6% do número de escleródios (Tabela 1).

**Tabela 1.** Crescimento micelial (C), redução do crescimento (%C), taxa de crescimento em mm dia<sup>-1</sup> (TC), redução da taxa de crescimento (%TC), número de escleródios por placa (E), redução no número de escleródios por placa (%E) e halo de inibição (H) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* confrontado com diferentes isolados de actinobactérias.

Trat.	C	%C	TC	%T	E	%E	H
Test.	42,4 a	--	14,1 a	--	16,4 a	--	--
SC1	23,7 b	44,10	7,9 b	44	0,00 c	100	5,09 ab
SC2	25,0 b	41,03	8,3 b	41,1	1,25 c	92,4	4,20 b
SC3	24,1 b	43,2	8,0 b	43,3	0,50 c	96,9	6,04 a
SC4	24,2 b	41,9	8,0 b	43,3	0,75 c	95,4	5,37 ab
SC5	23,6 b	44,3	7,9 b	44	4,50 b	72,6	1,66 c
p valor	2,5e <sup>-14</sup> ***	--	2,5 e <sup>-14</sup> ***	--	5,6e <sup>-10</sup> ***	--	1,14 e <sup>-4</sup> ***

\*\*\*Tratamentos diferem significativamente a 0,1% de probabilidade de erro, Segundo teste F.

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, Segundo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

No experimento onde foi avaliado o efeito dos isolados bacterianos no controle biológico de *M. phaseolina* observou-se que para o crescimento micelial todos os cinco isolados bacterianos diminuiram o crescimento micelial do fungo em relação a testemunha, com média de 19,66%. Em relação a taxa de crescimento em mm por dia também observou-se que todos os isolados inibiram o crescimento, em média 19,76% (Tabela 2).

Tabela 2. Crescimento micelial (C), redução do crescimento (%C) taxa de crescimento em mm dia<sup>-1</sup> (TC), redução da taxa de crescimento (%TC) e halo de inibição (H), do fungo *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de actinobactérias.

Trat.	C	%C	TC	%T	H
Test.	84,4 a	--	28,1 a	--	--
SC1	66,9 b	20,7	22,3 b	20,6	2,02 abc
SC2	66,3 b	20,6	22,1 b	21,3	1,32 bc
SC3	69,9 b	17,1	23,3 b	17,1	2,90 a
SC4	66,0 b	21,7	22,0 b	21,7	2,25 ab
SC5	69,0 b	18,2	23,0 b	18,1	0,90 c
p valor	1,4 e <sup>-5</sup> ***		1,4 e <sup>-5</sup> ***		1,019 *

Tratamentos diferem significativamente a 5% (\*) e 0,1% (\*\*\*) de probabilidade de erro, Segundo teste F. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, Segundo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

No ensaio de antibiose à *R. solani*, nenhum dos isolados testados no presente trabalho foram capazes de reduzir significativamente o crescimento e taxa de crescimento do fungo, e nem mesmo formaram halo de inibição (dados não mostrados).

As actinobactérias são microrganismos conhecidos por produzirem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Diferentes trabalhos descrevem espécies de actinobactérias com capacidade de inibir fungos fitopatogênicos (HARINDRAN et al., 1999; LEE; HWANG, 2002; SHI et al., 2010). Já existe disponíveis comercialmente produtos para biocontrole (Mycostop, Actinovate e Actinolron) de fitopatógenos como *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Botrytis* sp e *Phytophthora* sp., que são constituídos por esporos de *Streptomyces*, indicando a aceitação deste gênero para o controle biológico (HAMDALI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

Desta forma, os isolados de actinobactérias estudadas neste trabalho apresentam grande potencial para ser usado no controle biológico dos fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, pois se mostraram eficientes no ensaio de antagonismo in vitro. Diferentes análises serão realizadas a partir dos dados deste trabalho, como avaliação dos antibióticos produzidos por cada isolado, identificação molecular dos isolados, antagonismo *in vivo* e efeito na promoção de crescimento de plantas, a fim de melhor esclarecer seu potencial para uso no campo.

#### 4. CONCLUSÕES

Os isolados SC1, SC2, SC3, SC4 e SC5, apresentam atividade antifúngica e fungistática contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina*.

Os isolados bacterianos testados não inibem o crescimento *in vitro* de *R. solani*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACHIEGA, G.L., VILEGAS, W. & UJIKAWA, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.26, n.1, p.29-3, 2005.
- BRESSAN, W. & FIGUEIREDO, J.E. Efficacy and dose-response relationship in biocontrol of Fusarium disease in maize by *Streptomyces* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.120, p.311–316, 2008.
- HAMDALI, H., HAFIDI, M., VIROLLE, M. J. & OUHDOUCH, Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under Green house conditions. **Applied soil ecology**, v.40, p.510-517, 2008.
- HARINDRAN, J., GUPTE, T.E. & NAIK, S.R. HA-1-92, A new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* CDRIL-312: Fermentation, isolation, purification and biological activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15: p.425-430, 1999.
- LEE, J.Y. & HWANG, B.K. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Canadian. **Journal of Microbiology**, v.48, p.407-417, 2002.
- OLIVEIRA, M.F. de., SILVA, M.S. & VAN DER SAND, S.T. Anti-phytopathogen potencial of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Research in Microbiology**, v.161, n.7, p.564-572, 2010.
- SHI, P., YAO, G., YAHG, P., LI, N., LUO, H., BAI, Y., WANG, Y. & YAO, B.. Cloning, characterization, and antifungal activity of a endo-1,3-β-D-glucanase from *Streptomyces* sp. S27. **Microbiology Biotechnology**, v.85: p.1483-1490, 2010.
- SOARES, A.F., SOUSA, C. S. & GARRIDO, M. S. Streptomyces antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1897-1900, 2009.
- REMUSKA, A.C., PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos, UEPG **Exact Earth Sci., Agr. Sci. Eng.**, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007.
- BUENO, C. J., FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n.2, p.1-9, 2006.
- MEDINA, M.D.D.; MORALES, G.G.; CASTILLO, F.D.H.; FUENTE, Y.M.O.; OLIVAS, A.F. Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 4, n. 8, p. 1187-1296, 2013.
- GAVA, C.A.T.; PEREIRA, J.C.; FERNANDES, M.C.; NEVES, M.C.P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, vol.37, n. 10, p.1373-1380, 2002.
- SOUSA, C.D.S.; Soares, A.C.F.; Garrido, M.S.; Almeida, G.M.C.O.. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1759–1766, 2006.