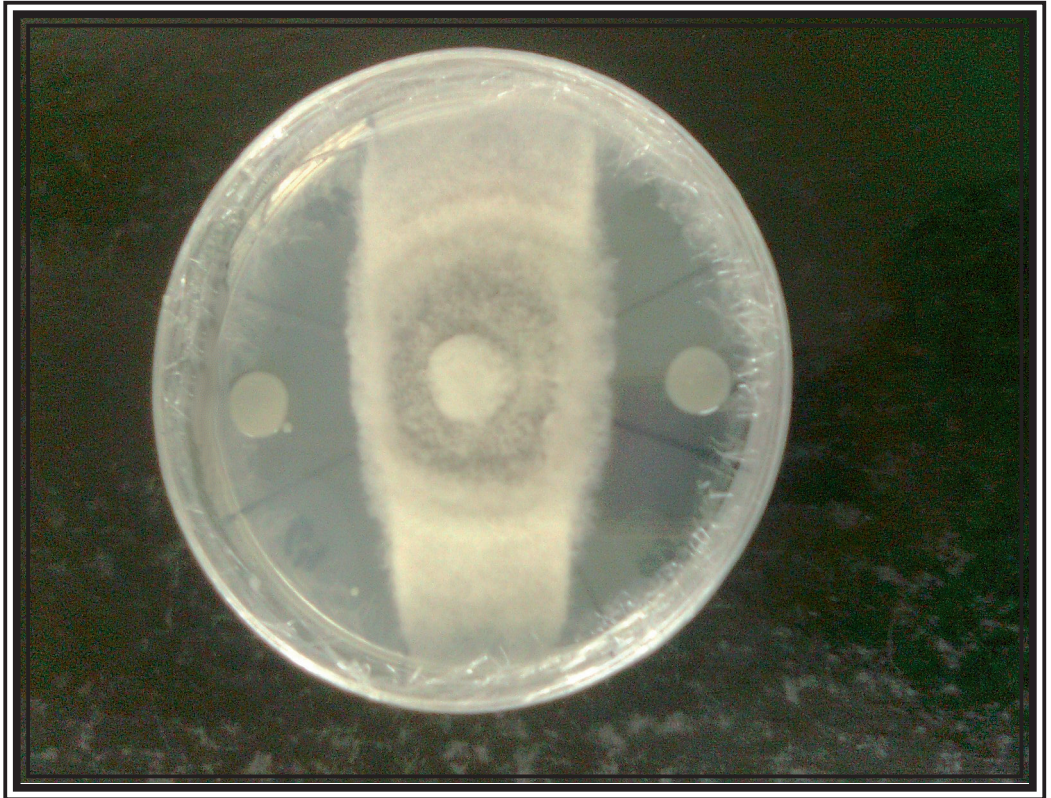


Prospecção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Colletotrichum sublineolum*, Agente Causal da Antracnose do Sorgo



ISSN 1679-0154
Novembro 2013

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 74

Prospecção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Colletotrichum sublineolum*, Agente Causal da Antracnose do Sorgo

Ana Laura Guimarães Verdolin
Ivanildo Evódio Marriel
Christiane Abreu de Oliveira
Luciano Viana Cota
Rodrigo Vêras da Costa
Dagma Dionísia da Silva
Bianca Braz Mattos

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,
Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda
de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Ana Laura Verdolin

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Prospecção de microrganismos antagonistas para biocontrole de
Colletotrichum sublineolum, agente causal da antracnose do
sorgo / Ana Laura Guimarães Verdolin ... [et al.]. - Sete Lagoas:
Embrapa Milho e Sorgo, 2013.
28 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 74).

1. Controle biológico. 2. Fungo. 3. Doença fungica. I.
Verdolin, Ana Laura Guimarães. II. Série.

CDD 632.96 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	15
Conclusões	23
Agradecimentos	23
Referências	23

Prospecção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Colletotrichum sublineolum*, Agente Causal da Antracnose do Sorgo

Ana Laura Guimarães Verdolin¹

Ivanildo Evódio Marrie²

Christiane Abreu de Oliveira³

Luciano Viana Cota⁴

Rodrigo Vêras da Costa⁵

Dagma Dionísia da Silva⁶

Bianca Braz Mattos⁷

Erika Nayara Tomacheski Diniz Alves⁸

Resumo

A antracnose é considerada a doença que mais afeta economicamente a cultura do sorgo no Brasil. Apresenta como agente causal o fungo *Colletotrichum sublineolum*, que ataca todas as partes da planta. O objetivo do trabalho foi selecionar isolados de bactérias e actinobactérias com potencial antagonista para o biocontrole de *C. sublineolum*. Foram testados in vitro 80 microrganismos por meio do método de culturas pareadas. Os maiores índices de inibição foram

¹Graduanda em Engenharia Ambiental no Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Estagiária da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, anneverdolin@yahoo.com.br

²Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ivanildo.marrie@embrapa.br

³Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Microbiologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

⁴Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, luciano.cota@embrapa.br

⁵Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Microbiologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

⁶Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, dagma.silva@embrapa.br

⁷Bióloga, M.Sc. em Microbiologia, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, bianca.mattos@embrapa.br

⁸Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária no Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, erikatomacheski2008@hotmail.com

apresentados pelos isolados B.1433 (85%), Act.9 (80%) e Act.336 (80%). Após a pré-seleção dos isolados, avaliou-se a influência do metabólito desses microrganismos sobre a germinação e o crescimento micelial de *C. sublineolum* em meio sólido e em meio líquido, respectivamente. Em meio sólido, a germinação de esporos foi inibida pelos três isolados, entretanto, a inibição do crescimento em meio líquido não foi significativa. Os isolados B.1433, Act.09 e Act.336 apresentaram potencial *in vitro* quanto à viabilidade de utilização no biocontrole de *C. sublineolum*.

Termos para indexação: *Sorghum bicolor*, antagonismo, controle biológico, antracnose.

Prospecting Antagonist Microorganisms for Biocontrol of *Colletotrichum sublineolum*, Causal Agent of Anthracnose of Sorghum

*Ana Laura Guimarães Verdolin*¹

*Ivanildo Evódio Marrie*²

*Christiane Abreu de Oliveira*³

*Luciano Viana Cota*⁴

*Rodrigo Vêras da Costa*⁵

*Dagma Dionísia da Silva*⁶

*Bianca Braz Mattos*⁷

*Erika Nayara Tomacheski Diniz Alves*⁸

Abstract

Anthracnose is considered the disease that economically more affects the culture of sorghum in Brazil. It presents the fungus *Colletotrichum sublineolum* as **causal agent** that attacks all parts of the plant. The objective of this paper was to select strains of bacteria and actinobacterias that have antagonist potential for biocontrol of *C. sublineolum*. Eighty microorganisms were tested in vitro by the method of paired cultures. The highest rates of inhibition were presented by isolates B.1433 (85%), Act.09 (80%) and Act.336 (80%). After the pre-selection of isolates, we evaluated the influence of their metabolite on germination and mycelial growth of *C. sublineolum* in solid and liquid medium, respectively. In a solid medium, spore germination was inhibited by three isolates, however, inhibition of growth in liquid medium was not significant. Isolates B.1433, Act.09 and Act.336 showed potential in vitro for use in biocontrol of *C. sublineolum*.

Index terms: *Sorghum bicolor*, antagonism, biocontrol, anthracnose.

Introdução

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo a quinta cultura mais importante em termos de área cultivada e produção (SILVA et al., 2010; FAO, 2013). O Brasil está entre os dez maiores produtores deste cereal (SILVA et al., 2010), sendo a região Centro-Oeste, responsável por cerca de 64,2% da produção nacional, caracterizada como a principal de cultivo de sorgo granífero no país (COSTA, 2012). Um dos fatores limitantes dessa cultura está relacionado a problemas fitossanitários, como as doenças, que encontram condições favoráveis a sua ocorrência e disseminação em todas as regiões onde é cultivado o sorgo no Brasil (SILVA et al., 2010).

A cultura do sorgo no País é afetada por doenças como antracnose (*Colletotrichum sublineolum*), míldio (*Peronoscleospora sorghi*), ferrugem (*Puccinia purpurea*), doença açucarada, conhecida também como *ergot* (*Claviceps africana*), e a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) (COTA et al., 2011). Dentre estas doenças, destaca-se a antracnose, que pode causar perdas severas na produção (COSTA et al., 2010).

C. sublineolum pode atacar folhas, pedúnculo, colmo, panículas, grãos e raízes do sorgo (COSTA et al., 2010), podendo sobreviver por até 18 meses na ausência do hospedeiro em forma de micélio e conídios e em restos de cultura na superfície do solo (SILVA, 2006). A disseminação desse fitopatógeno se dá por meio de respingos de chuva e pelo vento (este

último em menor quantidade), sendo por meio de sementes contaminadas a ocorrência da disseminação desse patógeno a longas distâncias (COTA et al., 2011). A medida mais utilizada para o controle da antracnose é o uso de cultivares resistentes, porém, nas principais regiões do Centro-Oeste em que o sorgo é cultivado, torna-se mais comum a utilização de agroquímicos (COSTA, 2012).

Os agroquímicos, muitas vezes utilizados indiscriminadamente no controle de fitopatógenos, por causa da sua alta toxicidade, são prejudiciais ao solo, à água e ao ser humano (REMUSKA; PRIA, 2007). Em decorrência disso, é de grande relevância a busca por práticas naturais que não prejudiquem o homem e o meio ambiente e que podem representar soluções de menor custo para o agricultor.

O controle biológico, por ser uma prática natural, tem se destacado em pesquisas, tornando-se viável do ponto de vista ambiental. Possui os seguintes componentes: patógeno, hospedeiro e antagonista, e a ocorrência da interação entre eles no sistema biológico é influenciada pelo ambiente (MICHEREFF, 2001). O controle biológico apresenta uma alternativa de controle sustentável, contribuindo assim para a redução do uso de agroquímicos.

O conceito de “antagonista” está ligado à interferência de um agente biológico (microrganismo) sobre os processos vitais dos fitopatógenos (MICHEREFF, 2001). Os microrganismos antagonistas podem apresentar um ou mais mecanismos de atuação, fazendo com que aumentem as chances de sucesso do biocontrole, sendo as propriedades antagonísticas, bem como os mecanismos de ação dos microrganismos, fatores

importantes para que haja resultados positivos na utilização do controle biológico (BETTIOL, 1991).

Na rizosfera há microrganismos, que, por causa da sua atividade antagonista, proporcionam às plantas defesas externas contra o ataque de patógenos, com destaque para as bactérias, que constituem o maior grupo de ocorrência no solo. Além da capacidade de produção de antibióticos apresentada por algumas espécies, as bactérias podem apresentar ação antagonista aos patógenos (SIQUEIRA, 1988). Segundo Lanna Filho et al. (2010), alguns microrganismos, como o fungo *Thichoderma* ssp. e a espécie de bactéria *Bacillus subtilis*, têm sido relatados em pesquisas como promissores e excelentes agentes de biocontrole.

Entre as bactérias, têm se destacado as actinobactérias, que são bactérias gram-positivas classificadas atualmente no reino Monera, na ordem *Actinomycetales* (RIBAS et al., 2009). Apesar de representarem uma pequena proporção na microbiota do solo, possuem uma alta capacidade para a produção de antibióticos, controlando, assim, o equilíbrio microbiológico no solo. Importantes agentes de controle biológico de fungos e bactérias fitopatogênicos capazes de produzir antibióticos são os representantes do gênero *Streptomyces* (SIQUEIRA, 1988), amplamente conhecidos na indústria farmacêutica pela imensa capacidade de produção de metabólitos (PEREIRA, 2000).

O presente trabalho teve como objetivos realizar o teste antagonista in vitro com isolados de bactérias e actinobactérias que apresentam potencial antagonista para biocontrole de *C. sublineolum*; selecionar e caracterizar os microrganismos que apresentarem maior atividade antagonista sobre o patógeno;

verificar a influência dos isolados pré-selecionados sobre a germinação do patógeno em meio sólido; avaliar o efeito das diferentes concentrações de metabólito dos microrganismos pré-selecionados sobre o crescimento micelial de *C. sublineolum* em meio líquido.

Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia do Solo e de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Unidade Milho e Sorgo, localizada no município de Sete Lagoas, MG. Os microrganismos avaliados pertencem à Coleção de Cultura de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CCMMMS) e da Coleção de Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CFMS).

Ativação das Culturas de Microrganismos

As culturas dos isolados de bactérias e actinobactérias, conservadas em ágar batata sólido – BDA (Batata 200g L⁻¹, Dextrose 20g L⁻¹, e Ágar 15g L⁻¹) sob óleo mineral esterilizado, foram reativadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Utilizou-se o método de estrias para a obtenção de colônias puras dos isolados. Realizou-se o teste com duas duplicatas em um total de quatro repetições para cada microrganismo.

Foram avaliados 80 isolados sendo 46 bactérias (obtidas de solos sob diversos tipos de cobertura vegetal de uma área de mineração) e 34 actinobactérias obtidos de amostras de solo localizados em áreas distintas do cerrado de Sete Lagoas-

MG, contra o isolado RIII 52.10 de *C. sublineolum*, isolado previamente de plantas de sorgo cultivadas em solo de cerrado de Sete Lagoas-MG.

Avaliação e Seleção de Isolados de Bactérias e Actinobactérias como Agentes Antagonistas contra *C. sublineolum* em Meio Sólido

A avaliação do potencial do controle in vitro das 46 bactérias e 34 actinobactérias contra o isolado RIII 52.10 de *C. sublineolum* foi realizada por meio do método de culturas pareadas, que consiste na confrontação direta dos microrganismos em meio de cultura. Cultivou-se o patógeno em meio aveia-ágar por sete dias a 25 °C. Um disco de 4 mm de diâmetro do micélio de *C. sublineolum* foi inserido no centro da placa de Petri contendo meio BDA. Em quatro pontos equidistantes do disco do micélio foram adicionados 30µl de suspensão de cada isolado de bactérias e actinobactérias testado como prováveis antagonistas. Placas contendo somente o fitopatógeno foram utilizadas como controle. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por dez dias. Após dez dias de incubação, a 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, mediu-se o raio do micélio do fitopatógeno na presença e na ausência dos antagonistas. A zona de inibição (ZI) de cada microrganismo foi calculado de acordo com Campanile et al. (2007), utilizando a seguinte expressão:

$$(ZI)\% = \frac{(N_1 - N_2)}{N_1} \times 100$$

Sendo N1 o raio do micélio encontrado na ausência do antagonista, e N2 o crescimento do micélio na presença do antagonista.

Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Influência do Metabólito de Microrganismos Pré-Selecionados Sobre o Crescimento Micelial de *C. sublineolum* em Meio Líquido

Após a seleção dos microrganismos descritos anteriormente, foi avaliado o efeito dos metabólitos dos isolados B.1433, Act. 9 e Act.336 que apresentaram maior potencial antagonista. Para a obtenção do metabólito foram utilizadas placas de Petri contendo colônias puras isoladas dos microrganismos B.1433, Act. 9 e Act 336. Realizou-se a transferência dessas colônias para meio líquido TSB (Soja tripticaseína – peptona de caseína 15 g L⁻¹, cloreto de sódio 5 g L⁻¹, extrato de levedura 1,5 g L⁻¹, extrato de carne 3 g L⁻¹), e os microrganismos foram mantidos em uma incubadora a 27 °C a 110 rpm durante 4 dias. As colônias dos isolados de bactérias foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos e logo após foram filtradas em membranas esterilizantes de 0,45 mm para a utilização do sobrenadante. Ao mesmo tempo, foram produzidos esporos do fitopatógeno durante sete dias em meio aveia-ágar a 25 °C.

Para a preparação da suspensão de esporos utilizaram-se tubos de ensaios contendo 9 ml de água deionizada e esterilizada em autoclave por 30 minutos a 120 °C e 1 atm. Na câmara de fluxo laminar, com uma alça previamente flambada, foi efetuada a diluição seriada dos esporos até a 10⁻⁴. Para o teste utilizou-se apenas a diluição de esporos a 10⁻¹ (4,32 x 10⁴ conídios/ml⁻¹) do fitopatógeno, que foram quantificados no hemacitômetro de Neubauer (TANAKA, 1987).

No experimento para avaliação do efeito do metabólito foram realizadas quatro repetições para cada microrganismo. Utilizou-se, como controle, erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml de meio de cultura YES (caseína hidrolizada 6 g L⁻¹, sacarose 10 g L⁻¹, extrato de levedura 6 g L⁻¹) e 0,5 ml da diluição a 10⁻¹ de esporos do patógeno. Nos tratamentos, avaliou-se o crescimento micelial de *C. sublineolum* para cada metabólito proveniente dos três isolados pré-selecionados em duas concentrações, 50% e 100%. Utilizou-se erlenmeyer de 250 ml contendo, para a concentração de 100%, 25 ml de metabólito de cada microrganismo antagonista, e para a concentração de 50% utilizou-se 12,5 ml de metabólito com 12,5 ml do meio de cultura YES, ambos com 0,5 ml da diluição a 10⁻¹ dos esporos de *C. sublineolum*.

Durante dez dias os microrganismos foram incubados a 27 °C e a 110 rpm de agitação, permitindo o crescimento micelial do patógeno no teste controle e nos demais. Após 10 dias, a massa micelial foi filtrada utilizando-se papel de filtro de 125 mm, com o objetivo de reter apenas a massa fúngica úmida do fitopatógeno, que foi posteriormente pesada. Para verificar a pureza do metabólito no final do teste, foi realizada a caracterização da densidade dos metabólitos provenientes do sobrenadante de cultura dos isolados. Utilizou-se o espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nanômetros, constatando-se as seguintes densidades moleculares para os isolados: B.1433, Act.09, Act.336 com 0,084 nm, 0,181nm e 0,155 nanômetros, respectivamente, confirmando a pureza dos extratos.

Os dados de crescimento micelial foram analisados estatisticamente pela análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Influência do Metabólito de Isolados de Microrganismos Pré-Selecionados Sobre a Germinação de Esporos de *C. sublineolum* em Meio Sólido

Para avaliação da influência do metabólito dos isolados previamente selecionados sobre a germinação de *C. sublineolum*, tanto a obtenção do metabólito dos isolados pré-selecionados como a preparação da suspensão de esporos foram realizadas conforme descrito no ensaio anterior.

Para cada tratamento em meio sólido foram realizadas três repetições e em cada uma das repetições adicionou-se 0,1 ml de suspensão de esporos obtidos através da diluição em série até 10^{-4} . Por meio da quantificação da concentração de esporos no hemacitômetro de Neubauer (TANAKA, 1987), constatou-se que a concentração a 10^{-2} ($1,62 \times 10^4$ conídios/ml⁻¹) seria a mais adequada para a realização do teste em meio sólido.

Os ensaios foram realizados utilizando placas de Petri contendo meio ágar-água. Na placa controle, adicionou-se 0,1 ml da concentração de esporos a 10^{-2} do fitopatógeno. Para o tratamento 1, utilizaram-se placas de Petri contendo meio ágar-água e adicionou-se 1 ml do metabólito do isolado B.1433. Após a absorção do metabólito pelo meio de cultura espalhou-se 0,1 ml da concentração a 10^{-2} dos esporos de *C. sublineolum* com auxílio da alça Drigalski. Os tratamentos 2 e 3 foram realizados da mesma maneira que o tratamento 1, com os isolados Act. 9 e Act.336, respectivamente. Realizou-se a avaliação após

a observação da presença dos esporos germinados de *C. sublineolum* nas placas controle de cada repetição.

Para as análises estatísticas pelo método de Tukey determinou-se a germinação de esporos de *C. sublineolum* pela UFC (Unidade Formadora de Colônia) por meio da função LOG_{10}

Resultados e Discussão

Avaliação e Seleção de Isolados de Bactérias e Actinobactérias como Agentes Antagonistas Contra *C. sublineolum* em Meio Sólido

Houve diferenças significativas quanto à atividade antagonista a *C. sublineolum* entre os 80 microrganismos testados in vitro por meio do método de culturas pareadas (Figura 1). Vinte isolados de bactérias apresentaram efeitos significativos comparados à testemunha. Os maiores percentuais de inibição sobre o patógeno foram apresentados pelos isolados B.1433 e B.78 em um percentual de 85% de atividade antagonista, seguido pelos isolados B01 e B05, com 77,5% e 70% de inibição, respectivamente (Tabela 1). Dentre os isolados de actinobactérias avaliados, 26 apresentaram diferença significativa perante o controle. Dentre estes os isolados, Act. 9, Act. 336, e Act. 18 diferiram dos demais e apresentaram 80% de atividade antagonista sobre o patógeno. Para os demais microrganismos, foi observada uma variação entre 5% a 75% de inibição sobre *C. sublineolum*.

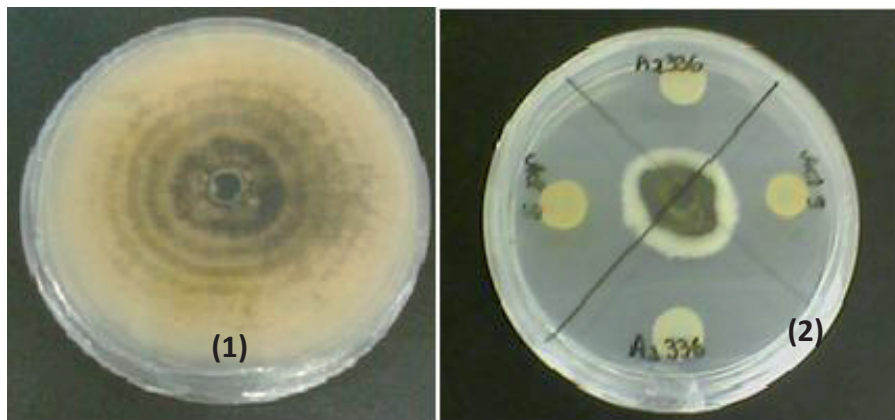


Figura 1. Teste in vitro realizado pelo método de culturas pareadas. *Colletotrichum sublineolum* na ausência (1) e na presença dos antagonistas (2).

Tabela 1. Teste in vitro de culturas pareadas com 46 isolados de bactérias e 34 isolados de actinobactérias com potencial antagonista para biocontrole de *Colletotrichum sublineolum*. Média do raio de crescimento micelial do fitopatógeno (cm) e índice de inibição (%) sobre influência dos isolados testados.

Bactérias	Crescimento micelial *		Índice de Inibição	Actino-bactérias	Crescimento micelial*		Índice de Inibição
	(cm)		(%)		(cm)		(%)
B.1433	0,575	a	85,0	Act.336	0,800	a	80,0
B.78	0,625	a	85,0	Act.09	0,800	a	80,0
B.01	0,925	b	77,5	Act.18	0,800	a	80,0
B.05	1,200	c	70,0	Act.07	1,000	b	75,0
B.C05	1,250	c	67,5	Act.13	1,075	b	72,5
B.BAC	1,375	d	65,0	Act.504	2,025	c	50,0
B.RZ09	1,450	d	62,5	Act.C66	2,125	c	47,5
B.1468	1,775	e	55,0	Act.14	2,200	c	45,0
B.77	1,900	e	52,5	Act.2	2,375	d	40,0
B.1464	2,025	f	50,0	Act. A1	2,375	d	40,0
B.64	2,050	f	47,5	Act.C13	2,400	d	40,0
B.1456	2,075	f	47,5	Act.1358	2,475	e	37,5
B.72	2,325	g	52,5	Act.508	2,500	e	37,5
1090	2,775	h	30,0	Act.1345	2,500	e	37,5
B.RII27	2,975	i	25,0	Act.1	2,600	e	35,0
B.81	3,000	i	25,0	Act.1466	2,600	e	35,0
B.79	3,375	j	15,0	Act.440	2,750	f	30,0
B.76	3,500	j	12,5	Act.1289	2,775	f	30,0
B.1100	3,500	j	12,5	Act.6A1	2,775	f	30,0
B.82	3,500	j	12,5	Act.C12	2,975	g	25,0
B.47	3,825	k	5,0	Act.1402	3,225	h	20,0

Cont. Tabela 1.

Bactérias	Crescimento micelial *		Índice de Inibição		Actino-bactérias		Crescimento micelial*		Índice de Inibição	
	(cm)	(%)	(cm)	(%)	(cm)	(%)	(cm)	(%)	(cm)	(%)
Controle ⁽¹⁾	4,000	k	0,0		Act.1336	3,275	h	17,5		
Outros ⁽²⁾					Act.1342	3,425	i	15,0		
					Act.497	3,500	i	12,5		
					Act.1327	3,625	i	10,0		
					Act.2A1	3,650	i	7,5		
					Act.1462	3,750	j	5,0		
					Controle ⁽¹⁾	4,000	j	0,0		
					Outros ⁽²⁾					

*Médias de quatro repetições, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Análises de variância a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Scott- Knott.⁽¹⁾*Colletotrichum sublineolum* na ausência do antagonista.⁽²⁾Demais isolados de bactérias e actinobactérias testados que não apresentaram halo de inibição sobre o fitopatógeno. (CV %) = 3,29 para bactérias. (CV%) = 5,92 para actinobactérias.

Há registros na literatura quanto a eficiência de microrganismos antagonistas utilizados no controle de patógenos, causadores de doenças responsáveis por causar grandes perdas na produção de diversas culturas. Em sorgo, Bressan e Figueiredo (2003) constataram, por meio do teste in vitro e em inoculação em sementes de sorgo, resultados significativos quanto à eficiência do controle de isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* sobre raças fisiológicas e isolados de *C. sublineolum*.

Influência do Metabólito de Microrganismos Pré-Selecionados Sobre o Crescimento Micelial de *C. sublineolum* em Meio Líquido

Não ocorreram diferenças significativas entre os isolados e o controle quanto ao crescimento micelial de *C. sublineolum*, nas diferentes concentrações de metabólito dos três antagonistas avaliados (Figura 2). Isso pode ter ocorrido em função do baixo crescimento de *C. sublineolum* em meio líquido sem adição de metabólitos (tratamento controle) em relação ao crescimento com a adição de diferentes concentrações de metabólitos, ou seja, o crescimento com e sem metabólito foi pequeno, enquanto que o esperado era que o patógeno crescesse mais na ausência de metabólito. Este fato pode ter ocorrido por três razões: Há registros na literatura quanto a influência de meios de cultura no desenvolvimento de patógenos tanto em meio líquido quanto em meio sólido. Trabalho realizado por Oliveira et al. (2011) constatou que o meio de cultura é determinante para a qualidade e quantidade de crescimento micelial e esporulação de patógenos. A grande frequência de repicagem de alguns patógenos em meios de cultura também é um dos fatores que resulta em problemas tais como: diminuição da capacidade de esporulação, viabilidade, mudanças no aspecto morfológico e fisiológico contribuindo para que haja a redução da quantidade de crescimento micelial (BUENO et al., 2006; MEYER et al., 2006; VECHIATO et al., 2003).

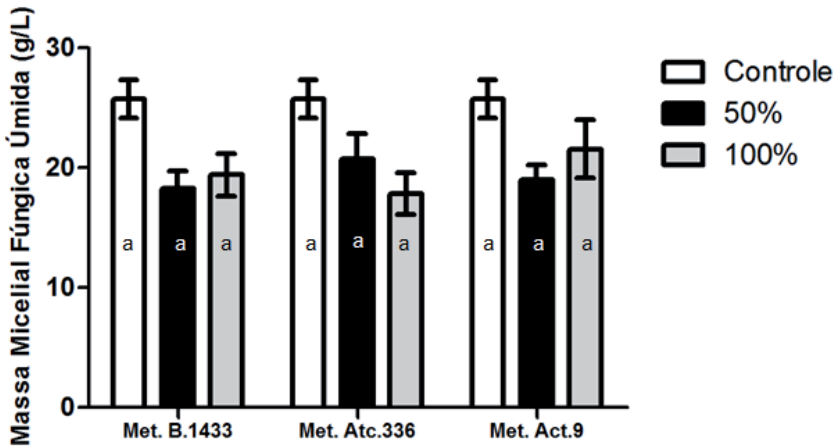


Figura 2. Crescimento micelial de *Colletotrichum sublineolium* (g/L) na presença de metabólito dos isolados B.1433, Act. 9 e Act. 336, em concentrações de 50 e 100%, e na ausência de metabólito (controle). Médias de quatro repetições seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A agitação também é outro fator de grande contribuição para crescimento micelial de patógenos em meio líquido. Espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* ssp. como *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* tem demonstrado um crescimento micelial efetivo sob agitação rápida segundo um estudo realizado por Liu et al. (2012) que submeteu-se o patógeno a uma agitação de 250 rpm. Em um estudo realizado por Nunes et al. (2010) obteve-se o crescimento micelial de *C. sublineolium* em uma agitação de 90 rpm. Portanto, o não crescimento micelial efetivo de *C. sublineolium* no ensaio líquido em meio YES pode ter tido contribuições dos fatores citados acima, visto que, no presente trabalho este foi submetido a uma agitação lenta, uma vez que

a maioria dos autores indicava a agitação lenta, como a mais favorável (BUENO et al., 2006; NUNES et al., 2010).

Influência do Metabólito de Isolados de Microrganismos Pré-Selecionados Sobre a Germinação de Esporos de *C. sublineolum* em Meio Sólido

Os isolados antagonistas pré-selecionados não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do controle (Tabela 2). Observou-se que os isolados da bactéria B.1433 e os actinobactérias Act. 9 e Act.336 apresentaram alta atividade antagonista sobre a germinação de *C. sublineolum*.

Tabela 2. Germinação de esporos de *C. sublineolum* na presença de metabólito dos isolados B.1433, Act.9, Act.336, e ausência de metabólito (controle).

Isolados	Germinação	
	Log _(UFC) /ml	
Controle	3,3943	a
B.1433	0	b*
Act.336	0	b
Act.9	0	b

*Médias de três repetições, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Estudos demonstram a capacidade de inibição da germinação de esporos de patógenos por bactérias e actinobactérias. Segundo Soares et al. (2006), ocorreu inibição em um estudo em que testou-se o efeito da produção de metabólitos por

isolados de actinobactérias sobre a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides*. O mesmo autor também conclui, por meio de testes *in vitro* realizados, quanto à eficiência de actinobactérias da espécie *Streptomyces pulcher* e *S. canescens* por meio da produção de metabólitos em reduzir significativamente a germinação de esporos, crescimento micelial e esporulação de agentes patogênicos como *Verticillium albo-atrum* e *Alternaria solani*.

A utilização de bactérias e actinobactérias no controle de patógenos do gênero *Colletotrichum* foi avaliada por diversos autores como o Kupper e al. (2003), que mostrou a capacidade de produção de substâncias antagônicas sobre *C. acutatum* por isolados de bactérias do gênero *Bacillus* sp., sendo ressaltada a possibilidade do uso dessas substâncias produzidas por esses microrganismos de forma a contribuir para a eficiência no controle biológico. Segundo Pereira (2000), espécies de actinobactérias do gênero *Streptomyces* têm sido amplamente estudadas devido a sua alta capacidade de produção de metabólitos secundários. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram *in vitro* a alta atividade antagonista dos isolados B.1433, Act.9 e Act.336 indicando o potencial desses microrganismos para o controle biológico de *C. sublineolum*. Embora os resultados quanto à eficiência de microrganismos antagonistas *in vitro* nem sempre são garantias de eficiência *in vivo*, os resultados do trabalho são indicativos quanto à viabilidade da utilização desses microrganismos no controle de patógenos, sendo necessários mais estudos para avaliar o comportamento desses isolados pré- selecionados.

Conclusão

1. Há diferença na atividade antagonista entre os isolados de bactérias e actinobactérias avaliados para o biocontrole de *C. sublineolum*.
2. Os isolados B.1433, Act. 9, e Act. 336 apresentam potencial para a formulação de inoculante visando o controle biológico de *C. sublineolum*.

Agradecimentos

À Embrapa Milho e Sorgo pelo apoio financeiro.

Referências

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas.**

Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 338 p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

BUENO, C. J.; AMBROSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 33, n. 1, p. 42-50, 2006.

BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Controle biológico de raças e isolados de *Colletotrichum graminicola* do sorgo por actinobactérias.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 3 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 62). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2003/comunicado/Com_62.pdf>. Acesso em: 17 out. 2012.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 237-246, 2007.

COSTA, R. V. da. Controle químico de doenças na cultura do sorgo. In: PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; DUARTE, A. P.; TSUNECHIRO, A. (Ed.). **Diversidade e inovações na cadeia produtiva de milho e sorgo na era dos transgênicos**. Campinas: Instituto Agrônomo; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012. cap. 28, p. 453-480.

COSTA, R. V. da; COTA, L. V.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. da; PARREIRA, D. F. **Rotação de cultivares como uma estratégia de manejo da antracnose do sorgo**. Sete Lagoas. Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 148).

COTA, L. V.; COSTA, R. V. da; CASELA, C. R. Doenças. In: RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). **Cultivo do sorgo**. 7. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 2). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_7_ed/doencas.htm>. Acesso em: 5 jun. 2012.

FAO. **FAO-STAT**: database: agricultural production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 5 jun. 2013.

KUPPER, K. C.; FERNANDES, N. G.; GOES, A; Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-18, 2010.

LIU, B. L.; LOUWS, F. J.; SUTTON, T. B.; CORRELL, J. C. A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 132, n. 4, p. 593-607, 2012.

MEYER, M. C.; SILVA, J. C. D. A.; MAIA, G. L.; BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. Mancha de irotécio em algodoeiro causada por *Myrothecium roridum*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p. 390-393, 2006.

MICHEREFF, S. J. Fundamentos de fitopatologia. In: MICHEREFF, S. J. **Controle biológico de doenças de plantas**. Recife: UFRPE, 2001. p. 124-129.

NUNES, M. P.; PACCOLA, E. A. S.; NOBREGA, G. M. A.; MEIRELLES, L. D. P. Use of oval conidia as a tool to assess the genetic transfer among *Colletotrichum sublineolum* mutants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 171-178, 2010.

OLIVEIRA, J. T. M. de; BONALDO, S. M.; TRENTO, R. A. Desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. isolados de teca em diferentes meios de cultura. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 1329, 2011.

PEREIRA, J. C. **Interações entre as populações de actinobactérias e outros organismos na rizosfera**. Seropédica

Embrapa Agrobiologia, 2000. 15 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118). Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/serie-documentos/DOC118>>. Acesso em: 18 out. 2012.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publicatio UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 13, n. 3, p. 31-36, dez. 2007.

RIBAS, T. T. Z.; MARCHESAN, E. D.; ONOFRE, S. B. Atividade hemolítica de *Streptomyces* sp. produtores de metabólitos ativos, isolados do solo da região sudoeste do Paraná. **Revista de Biologia e Saúde da UNISEP**, v. 3, n. 1, p. 29-28, 2009.

SILVA; P. C. A. M. M.; CARLONI, M. C.; MEDEIROS, M. I. C.; ERRERA, M. C.; NEMEL, S. N. Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 245-251, 2006.

SILVA, D. D. da; COSTA, R. V. da; COTA, L. V.; CASELA, C. R.; SILVA, E. C. F.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P.; NOLASCO, A. A. R.; ARAUJO, B. H.; LANZA, F. B. Rotação de cultivares para o manejo da antracnose do sorgo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. **Potencialidades, desafios e sustentabilidade**: resumos expandidos... Goiânia: ABMS, 2010. 1 CD-ROM.

SILVA, D. D. da. **Resistência de híbridos de sorgo a *Colletotrichum sublineolum*: Previsibilidade por meio da reação**

de linhagens progenitoras. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SIQUEIRA, J. O. **Biotecnologia do solo:** fundamentos e perspectivas. Brasília. Ministério da Educação, 1988. 118 p.

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S.; PEREZ, J. O.; ALMEIDA, N. S. de. Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 456-461, 2006.

TANAKA, M. A. S. Patologia de sementes. In: WETZEL, M. V. S.; SOAVE, J. (Ed.). **Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 325-327.

VECHIATO, M. H.; MARINGONI, A. C.; MARTINS, E. M. F.; KOHARA, E. Y. Caracterização de isolados de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 161-165, 2003.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

