

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO MORANGUEIRO ANTAGÔNICAS AO FUNGO *Pestalotiopsis longisetula*

STRAWBERRY ENDOPHYTIC BACTERIA ANTAGONIC TO *Pestalotiopsis longisetula* FUNGUS

TEIXEIRA, M.A.¹; DIAS, A. N. L.; VIEIRA, R.F.² DE ARAÚJO, E. S.

¹ Universidade do Vale do Sapucaí, CP 13, CEP 37550-000, Pouso Alegre, MG.

² Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP
e-mail:manoel.at@uol.com.br

Resumo

A pestalotiose tem sido, nos últimos três anos, a principal doença da cultura do morango em todas as regiões produtoras do sul de Minas Gerais. A aplicação de fungicidas disponíveis no mercado não tem controlado o fungo *Pestalotiopsis longisetula*. Isolamento de microrganismos endofíticos de plantas cultivadas em sistemas orgânico e convencional da região foi realizado com o objetivo de selecionar bactérias com potencial antagônico ao fungo patogênico. Como resultados desse estudo foram obtidos 25 isolados capazes de inibir o crescimento daquele fungo. Das bactérias isoladas as mais promissoras foram a P2C1-3 e a P2F1-1 que controlaram o crescimento do fungo em aproximadamente 40%.

Abstract

The pestalotiose has been in the last three years the main strawberry disease in all producing regions of south Minas Gerais. The application of fungicides available on the market has not controlled the fungus *Pestalotiopsis longisetula*. Isolation of endophytic microorganisms from plants grown in organic and conventional systems in that region was carried out to select bacteria with antagonistic potential to the pathogenic fungus. As result of this study were obtained 25 isolates able to inhibit the fungus growth. The most promising bacteria were the P2C1-3 and P2F1-1 that controlled the fungus growth in about 40%.

Introdução

O morangueiro é altamente susceptível a doenças causadas por diferentes microrganismos e por esta razão grandes quantidades de agrotóxicos são aplicadas a esta cultura. Recentemente, uma nova doença causada pelo fungo *Pestalotiopsis longisetula* tem causado preocupação aos agricultores, em virtude da ausência de uma forma adequada de controle. Como é difícil prever a disseminação deste fungo nas lavouras de morango e os possíveis danos que ele possa vir a causar, torna-se premente a necessidade de estudos que objetivem o seu controle.

No Brasil, o *P. longisetula* foi isolado de mudas de morango das variedades Camarosa, Oso Grande e Sweet Charlie oriundas da região de Jarinu, SP. Neste estado, a pestalotiose foi também detectada em plantações de morango na região de Atibaia. No Espírito Santo a pestalotiose esta sendo considerada a principal doença do morangueiro (Costa & Ventura, 2006; Costa et al., 2003). A ocorrência deste fungo foi também, recentemente, detectada na região de Pouso Alegre, MG. Ele foi isolado e submetido à identificação no Instituto Biológico, em São Paulo (Dr. Manoel A. Teixeira, comunicação pessoal). Ainda não existem trabalhos que demonstrem formas efetivas para controlar a doença causada por este fungo, embora a sua disseminação venha ocorrendo de maneira preocupante. Em Pouso Alegre, a pestalotiose já foi detectada em 100 % das plantas de uma lavoura, destruindo-as totalmente.

Este trabalho teve como objetivos isolar e fazer uma seleção prévia de bactérias endofíticas do morangueiro com potencial para serem utilizadas no controle biológico da doença pestalotiose. Uma vez selecionados os melhores isolados, trabalhos posteriores serão conduzidos em áreas produtoras de morango ao sul de Minas Gerais com o propósito de avaliar a eficiência dos isolados selecionados, em condições de campo, no controle da pestalotiose.

Material e Métodos

Plantas sadias de morango, variedade Oso Grande, foram coletadas em lavouras do sul de Minas Gerais em áreas de cultivo orgânico e convencional. No laboratório, o processo de eliminação da população epifítica e de outros microrganismos foi iniciado com a lavagem de todo o material coletado, com bucha e sabão. As raízes, caules e folhas do morangueiro foram desinfestadas superficialmente utilizando-se os seguintes produtos químicos em ordem de descrição: álcool 70% (1'), hipoclorito de sódio 40% (2'), álcool 70% (30") e água destilada. Para se ter certeza de que apenas microrganismos endofíticos foram isolados, a última água de lavagem foi distribuída sobre os meios de cultura utilizados e as placas incubadas. Do material desinfestado foram retiradas as extremidades e o restante foi cortado em pequenos pedaços (0,5 – 0,7 cm), que foram distribuídos na superfície dos meios de cultura *tryptone soya agar* (TSA) e batata dextrose ágar (BDA). Ambos os meios de cultura foram suplementados com fungicida para evitar a contaminação por fungos. Para cada parte da planta (raiz, caule e folha) e, para cada planta, foram feitas três placas de cada meio de cultura, cada uma com cinco pedaços do tecido vegetal. As placas foram incubadas a 27°C (\pm 2°C). A avaliação do crescimento bacteriano teve início após 24 h de incubação das placas e prosseguiu por um período de dez dias. As bactérias foram purificadas pela técnica de esgotamento e repicadas para outras placas com o mesmo meio de cultura. Colônias individuais foram conservadas em óleo mineral. Para evitar o excesso de microrganismos que pudesse inviabilizar o trabalho, as bactérias isoladas foram primeiramente agrupadas segundo algumas características macroscópicas das colônias (forma, borda, pigmentação, superfície, consistência, odor, taxa de crescimento) e, microscópica (forma das células).

O fungo *P. longisetula* foi fornecido pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNIVÁS. Antes da sua efetiva utilização nos experimentos a sua patogenicidade foi novamente testada na cultivar de morango a ser estudada. Para tal, o fungo foi cultivado em meio de cultura BDA por 7 dias, a 25°C. Discos foram retirados das extremidades da cultura e inoculados em plantas de morango (cv. Oso Grande). Com o surgimento da doença, pedaços de tecidos infectados foram retirados para o re-isolamento do fungo, que foi utilizado nos ensaios posteriores.

Os testes de antagonismo foram realizados por meio de culturas pareadas, ou seja, de um lado da placa de Petri foi colocada a cultura bacteriana e no meio da placa o fungo patogênico. A avaliação do diâmetro fúngico foi feito durante seis dias consecutivos. Para cada isolado foram feitas três placas.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 281 bactérias endofíticas, sendo 140 em meio BDA e 143 em meio TSA. O número de isolados nos dois meios de cultura utilizados foram praticamente iguais. Esse resultado mostra a importância da utilização de diferentes fontes nutricionais para o isolamento de microrganismos endofíticos. Lacava (2006) citou que a utilização de apenas um meio de cultura pode mascarar os resultados das pesquisas, uma vez que pode inviabilizar o surgimento de outras espécies incapazes de crescer naquela única condição oferecida.

O percentual de microrganismos endofíticos isolados diferiu conforme a parte da planta e o sistema de cultivo (Tabela 1). O maior número de microrganismos foi obtido nas raízes das plantas coletadas na área com cultivo orgânico (39% do total de isolados), seguido do caule (31,5%) e folhas (30%). As bactérias das plantas de morango mostram-se capazes de colonizar todos os tecidos da planta, conforme também observado para a cultura da mandioca (Teixeira, et al 2007). Outros trabalhos como os de Mocali et al. (2003) e Nowak et al. (1997) demonstram flutuações populacionais de bactérias em diferentes órgãos, em função das condições edafoclimáticas.

No teste de antagonismo 25 isolados bacterianos apresentaram resultados considerados promissores à inibição de *P. longisetula* (Figura 1 e 2). Desses 64% foram isolados de plantio orgânico e 34% de plantio convencional. O número de bactérias antagonistas obtido nas raízes e folhas foi igual (Tabela 2).

Os isolados P2C1-3 obtido de plantas de morango cultivadas em sistema orgânico e o P2F1-1 proveniente de plantas cultivadas em sistema convencional foram os isolados que mais inibiram o crescimento do fungo *P. longisetula*, com taxas de inibição próximas aos 40% (Figuras 1 e 2). Outros microrganismos como o MR1-1, P3F1-1, P2C2-1 e P2R1-2, apresentaram taxas expressivas de inibição. No geral, todas as bactérias antagonistas,

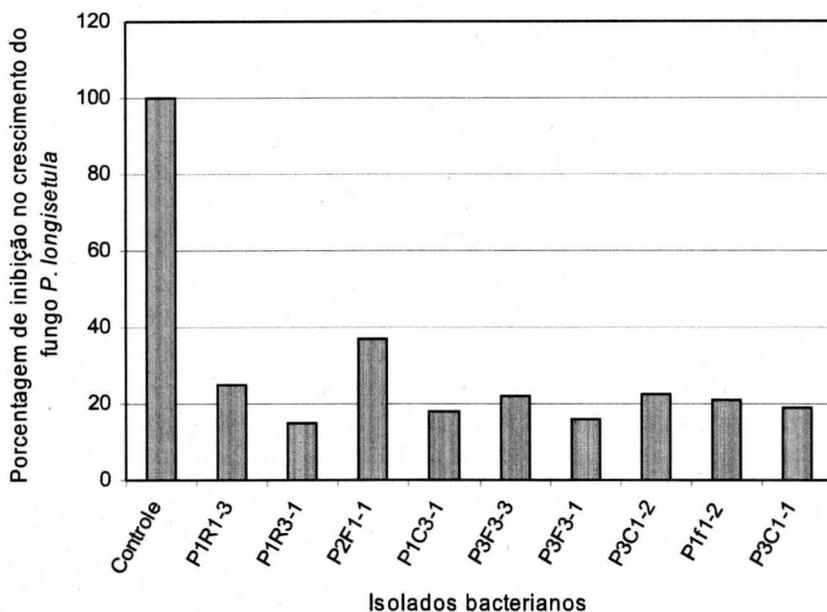


Figura 1. Percentual de inibição do fungo *P. longisetula* pelos isolados antagonísticos obtidos de plantas de morango coletadas no sistema convencional de cultivo.

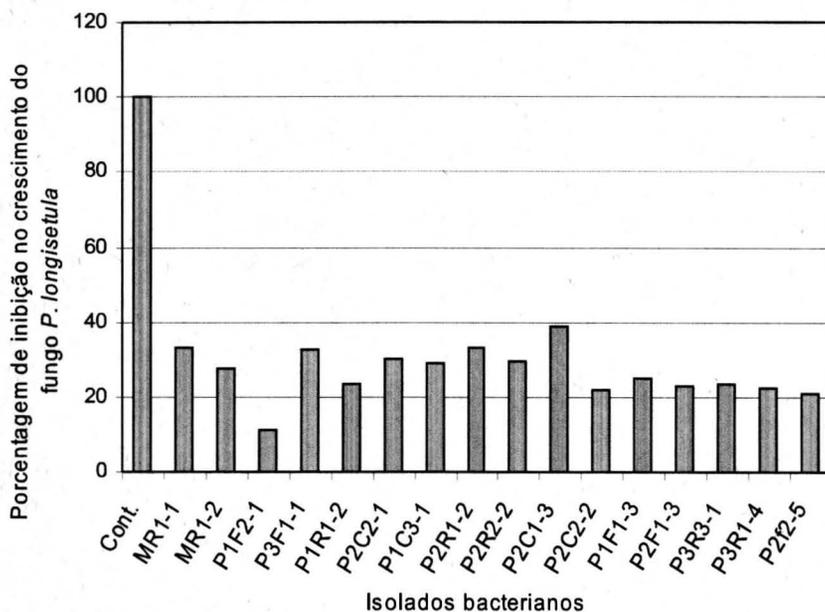


Figura 2. Percentual de inibição do fungo *P. longisetula* pelos isolados antagonísticos obtidos de plantas de morango coletadas no sistema orgânico de cultivo.

oriundas do isolamento de plantas orgânicas inibiram o crescimento do fungo patogênico com taxas superiores a 20%, à exceção do P1F2-1 que apresentou uma taxa de inibição inferior a 12%.

Tabela 1. Número de microrganismos endofíticos isolados de diferentes partes das plantas de morango coletadas em área de cultivo convencional e cultivo orgânico

Sistema de cultivo	Raiz	Caule	Folha	Total
Orgânico	75	49	39	163
Convencional	34	39	45	118
Total	109	88	84	281

Tabela 2. Percentual de microrganismos antagonísticos considerando as diferentes partes das plantas de morango coletadas em área de cultivo convencional e cultivo orgânico.

Sistema de cultivo	Raiz	Caule	Folha	Total
Orgânico	7	4	5	16
Convencional	2	3	4	9
Total	9	7	9	25

Conclusões

Isolados endofíticos de plantas de morango cultivadas em sistemas de plantio orgânico e convencional diferem na sua capacidade antagonística ao fungo causador da doença pestalotiose. As bactérias P2C1-3 isolada de plantas cultivadas em sistema orgânico e a P2F1-1 proveniente do de plantas cultivadas no sistema convencional foram os dois isolados com maior potencial de inibição do fungo *Pestalotiopsis longisetula*, em condições *in vitro*.

Referências

COSTA, H.; VENTURA, J. A. Doenças do morangueiro: Diagnóstico de Manejo. In: BALBINO, J. M. S. (Ed.). **Tecnologias para Produção, Colheita e Pós-colheita de Morangueiro**. I2.EDIÇÃO-INCAPER, Vitória, E.S. p. 41-58, 2006.

COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Manejo integrado das doenças do morangueiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado das doenças e pragas: produção integrada de fruteiras tropicais**. Viçosa, UFV, p.131-164, 2003.

TEIXEIRA, M. A., MELO, I. S. VIEIRA, R. F., COSTA, F. E. C. HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, p. 43-49, 2007

LACAVAL, P. T.I, ANDREOTE, F.D., ARAÚJO,W.L., AZEVEDO,J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 637-642, 2006

MOCALI, S.; BERTELLI, E. DI CELLO, FRANCESCO PAOLO; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research Microbiology**, v. 154, p. 105-114, 2003.

NOWAK, J.; ASIEDU, S. K.; LAZAROVITS, G.; PILLAY, V.; STEWART, A.; SMITH, C.; LIU, Z. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Eds.) **Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures**. Commissariat à l'énergie atomique, p. 173-179, 1995