

Seleção de Actinomicetos Antagonistas para Aiocontrolo de *Colletotrichum Sublineolum*, Agente Causal da Antracnose do Sorgo

Evani S Duarte¹, Marcos A. Soares,² Gilma D. Teixeira¹, Patrícia G. Silva³, Carlos R. Casela ³,
Rodrigo V. Costa,³ Ivanildo E. Marriel³

¹Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira, Rod. MG 03, Córrego Seco, Bairro Areão Itabira - MG. ²Professor da Fundação Comunitária do Ensino Superior de Itabira.

³Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, Km 65Cx. Postal. 151, Sete Lagoas

Palavras-chave: controle biológico, antagonismo, doença da parte aérea, *sorghum bicolor*

Entre os fatores limitantes de produção da cultura do sorgo, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* (P. HENN, & BULBAK) constitui a principal doença dessa cultura no Brasil (Ali & Warren, 1987), produzindo sintomas típicos nas folhas, colmo, panículas e nos grãos (THAKUR & MATHUR 2000).

Alem do emprego de genótipos tolerantes, tradicionalmente, o controle de doenças é efetuado com aplicações de produtos químicos, entretanto, o uso indiscriminado de fungicidas apresenta uma série de limitações econômicas e ambientais. Portanto, torna-se importante a busca de métodos alternativos de controle desta doença. Dentre estes métodos, o controle biológico constitui uma alternativa mais barata e sustentável do ponto de vista ambiental. Segundo Baker & Cook (1974), o controle biológico de plantas pode ser definido como o controle de um microorganismo através de outro microorganismo, que tem como meta manter todos os componentes do agroecossistema em equilíbrio, constituído de uma relação entre hospedeiro, patógenos e uma microbiota não patogênica que também é residente no sítio da infecção (Bettiol, 1991).

Dentre os possíveis agentes para o biocontrole de doenças, destacam-se os actinomicetos, que são bactérias filamentosas encontradas naturalmente no solo, com diversas espécies que são reconhecidamente produtoras de antibióticos. Estas bactérias produzem substâncias, que quando testadas *in vitro*, podem apresentar atividades antagônicas ao desenvolvimento de fungos (Bressan & Figueredo, 2003). Os testes de antagonismos *in vitro* permitem que uma grande população de microorganismo seja avaliada rapidamente (Mariano, 1993). Entretanto, recomenda-se que o teste *in vitro*, seja complementado *in vivo*, primeiro sob condições controladas e, posteriormente sob condições de campo (BETTIOL, 1991), uma vez que, nem sempre os testes realizados em laboratórios apresentam correlação com os resultados obtidos em condições de campo (Ghini & Nakamura, 2001).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar e caracterizar isolados de actinomicetos quanto sua atividade antagonista contra *Colletotrichum sublineolum*, em função de composição de meio de cultura.

Os microorganismos avaliados pertencem aos Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo e de Fitopatologia da EMBRAPA Milho e Sorgo. Foram avaliados 59 isolados de actinomicetos, isolados de amostras de solo sob diversos tipos de cobertura vegetal de

solo cerrado, e três raças do *C. sublineolum* (denominado raça 84, 91 e 98), isolados previamente de plantas de milho e sorgo cultivado em solo de cerrado de Sete Lagoas.

A avaliação do potencial do controle *in vitro* foi realizado através do método de culturas pareadas, que consiste no confronto direto dos microrganismos em meio de culturas. Um disco de micélio do fitopatógeno foi inserido no meio da placa de petri contendo meio BDA, quatro pontos equidistantes do disco do micélio foram inoculados com 10 ul de suspensão contendo os prováveis antagonistas. Placas contendo apenas o fitopatógeno foi utilizado como controle. Após sete dias de incubação a temperatura ambiente, mediu-se o diâmetro do micélio do fitopatógeno crescendo sem contato e com contato com o antagonista. A porcentagem de inibição foi estimada pela seguinte fórmula $(N1-N2)/N1 \times 100$, sendo N1 o raio do micélio encontrado na ausência do antagonista e N2, na presença do antagonista.

Para testes da influência do meio de cultura sobre a porcentagem de inibição, utilizaram-se isolados de microrganismos que apresentaram antagonismos, com inibição do crescimento igual ou superior a 70% de pelo menos um dos fitopatógenos. Testaram-se os seguintes meios: BDA (200g/L batata, 20g açúcar cristal e 15g ágar para 1L de água pH), Meio Actinomiceto (1g L-asparagina; 10g glicerol; 1,0 g KH_2PO_4 ; 1 mL solução de micronutrientes; e 12 de agar para 1L de água pH), Meio Completo para 1L de meio: 6g $NaNO_3$, 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,5g de KCl, 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01g de $FeSO_4$, 0,01g de $ZnSO_4$, 10g de glicose, 2g de peptona, 1,5g de caseína hidrolisada, 0,5g de extrato de levedura, 1mL de solução de vitaminas, 15 g de ágar pH6:8), Meio Mínimo composição por litro: $NaNO_3$ – 0,24g, $NH_4H_2PO_4$ – 2,97g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,52g, KCl – 0,52g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01g, Glicose – 10,00g, Ágar – 15,00g pH 6,5). Meio LB Luria-Bertania : 10 g Peptona de caseína; 5 g Extrato de levedura; 10 g NaCl; 15 g Ágar, para 1 L de água pH 6,8) e o Meio Ágar Aveia (15g Agar e 60g aveia para 1 L de água pH). Esses meios variam na constituição química.

Os testes de inibição foram realizados de acordo com o experimento inicial variando-se apenas o meio de cultura. Para cada antagonista, realizaram-se três repetições. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico de Student-Newman-Keuls para o desdobramento de meios de culturas *versus* cada antagonista e antagonistas *versus* meios de cultura.

Como resultados observados para a seleção de actinomicetos antagonistas, após o período de sete dias de crescimento dos fitopatógenos na presença dos antagonistas, notou-se que o grau de inibição foi variável entre os antagonistas. Para facilitar análise, os actinomicetos inibidores foram agrupados em quatro classes de acordo com o grau de inibição (expresso em porcentagem de inibição de crescimento do fitopatógeno).

Do total de 59 linhagens de actinomicetos testadas, observou-se que a distribuição dos isolados nas classes consideradas variou em função do grau de inibição e à raça testada. Na (Fig. 1), notou-se que, independentemente dos fitopatógenos, a maioria das linhagens de bactérias (45%) apresentou baixa atividade antagonista, isto é, encontra-se distribuída na classe entre 0 e 20% de inibição. Enquanto 12 a 15% apresentaram inibição entre 21 a 40%. Números intermediários de bactérias atingiram de 41 a 60% e 61 a 80% de eficiência de inibição dos fitopatógenos. Não se observou nenhum actinomicetos capaz de inibir os fitopatógenos com mais de 80% de eficiência.

As raças 84 e 91 dos fitopatógenos foram mais sensíveis quanto a raça 98 menos sensível.

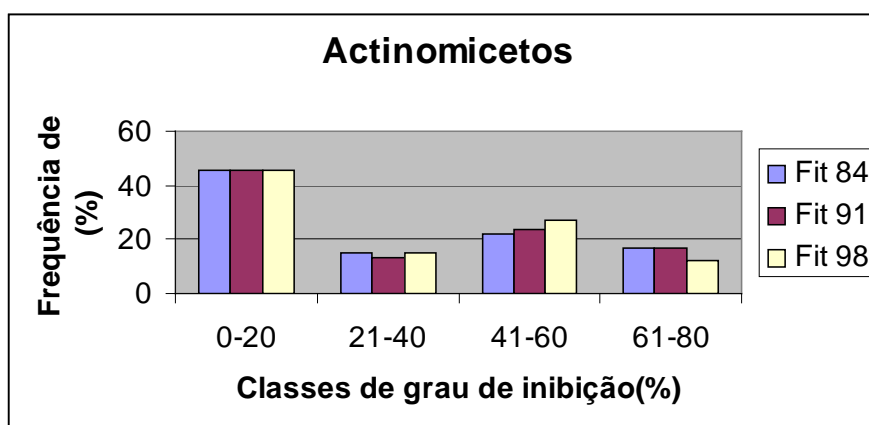


Figura 1- Distribuição de freqüência dos números de actinomicetos capazes de inibirem o crescimento das raças 84, 91 e 98 de *C. sublineolum*

Após o primeiro teste de inibição em meio BDA isolou-se três linhagens de actinomicetos que demonstraram inibição igual ou superiores a 70% em pelo menos uma das três raças do *C. sublineolum*.

Na tabela 1 estão apresentados os isolados actinomicetos selecionados com as suas respectivas atividades antagonistas, contra as raças 84, 91 e 98, testados em meio BDA. Os resultados mostram que houve variação entre os antagonistas e entre as raças do fitopatógeno. Nota-se que o actinomiceto 90 apresentou alta inibição contra a raça 84, enquanto a linhagem de actinomiceto 92 eficientemente inibiu a raça 91 e diferentemente, o actinomiceto 449 foi mais efetivo contra o crescimento da raça 98.

Raça	Ac tinomiceto 90	Ac tinomiceto 92	Ac tinomiceto 449
84	73,		57,
75		25	25
91	65,		71,
77		25	63
98	61,		55,
66		06	00

Tabela 1. Eficiência de inibição das raças de *C. sublineolum* por três linhagens de actinomicetos em meio BDA.

Com o objetivo de verificar se o meio de cultura é capaz de interferir com o grau de inibição apresentado na Tabela 1 utilizou-se a mesma metodologia de determinação da porcentagem de inibição variando-se apenas o meio no qual o teste foi realizado.

Na figura 2 encontrar-se os dados de inibição do crescimento da raça 84, em seis meios de culturas, pelas três linhagens de actinomicetos selecionadas anteriormente

Um fato interessante é que a capacidade de inibição dos actinomicetos não foi detectada quando testou-se o meio de cultura Agar-Aveia em nenhuma das combinações raça x actinomiceto.

Nota-se claramente que a eficiência de inibição do actinomiceto 90 não diferiu significativamente quando testado os meios de cultura BDA, ACT, MM, MC e LB. No caso do actinomiceto 92, o meio de cultura é capaz de influenciar na eficiência de inibição do crescimento da raça 84. Os meios que propiciaram maiores inibições foram ACT e MM, não diferindo estatisticamente entre si. Em relação ao actinomiceto 449, os meios de cultura também influenciaram no antagonismo. Os meios mais propícios foram BDA, ACT, MC e LB.

Comparando-se os três antagonistas em relação a cada meios de cultura, observam-se comportamentos diferentes somente para os meios BDA, ACT, MM. Na presença do meio BDA, os antagonistas 90 e 449, apresentaram inibições similares e com valores aproximadamente 70%, e superior ao observado para o antagonista 92. Com relação o meio ACT e o MM os antagonistas 90 e 92 não diferem entre si, apresentando inibição superior ao antagonista 449. No meio MC e LB não se detectou diferença significativa para atividade dos três antagonistas.

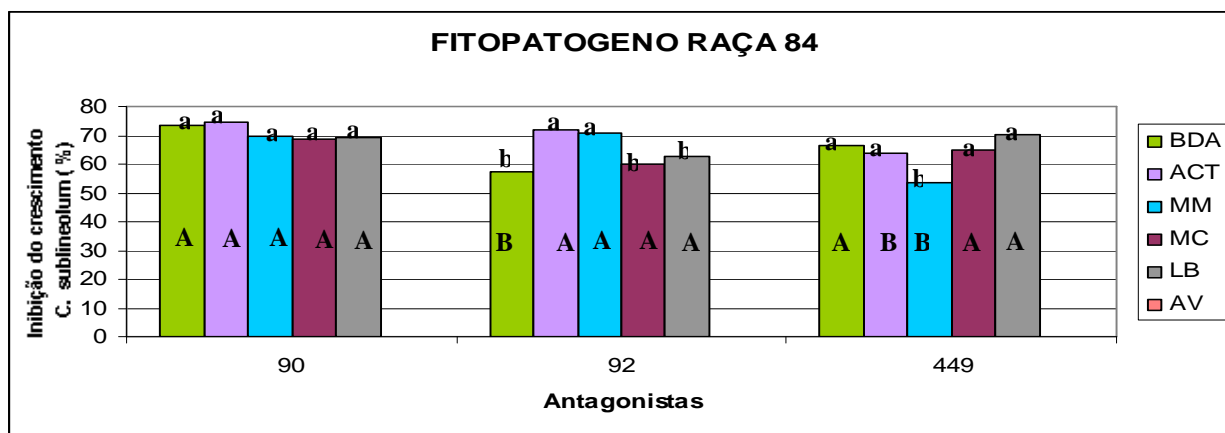


Figura Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Student-Newman-Keuls. Letra minúsculas comparam a inibição de um antagonista em diferentes meios de cultura e letra maiúsculas comparam o mesmo meio de cultura influenciando dos diferentes antagonistas.

Para a raça 91, os resultados mostram diferenças significativas para antagonistas em função do meio de cultura, exceto para o antagonista 92 que não sofreu influencia do meio no seu grau de inibição (Fig. 4) apenas o meio MM resultou num decréscimo da inibição. Os demais meios de culturas apresentaram comportamentos similares para esses antagonistas. Em relação ao antagonista 449, menor atividade foi observada na presença do meio

MM e na presença dos demais meios de cultura não houve diferença significativa na eficiência de inibição.

Comparando-se as atividades de antibiose dos três antagonistas em função de cada meio de cultura, nota-se que, para os meios BDA, MC e LB, os três antagonistas apresentaram atividades similares, não diferindo estatisticamente nos valores de inibição. Entretanto para o meio o meio ACT, os antagonistas 90 e 92 apresentam inibições similares e superiores ao observado para o Antagonista 449. Na presença do MM a maior inibição foi observada para o antagonista 92 , em seguida o antagonista 90 e com menor inibição o antagonista 449.

Para a raça 98, analisando os resultados obtidos para os meios de cultura, observam-se diferenças significativas, para meio de cultura e para interação dos antagonistas versus meio de cultura. Para o antagonista 90 o melhor meio foi ACT, em seguida os meios MC e LB, que não se diferem , sendo o pior meio o MM e posteriormente o meio BDA. Para o antagonista 92 os melhores meios foram ACT , MM e LB, e os meios com menor halo de inibição foram os meios BDA e MC, que não se diferem entre si. Para o antagonista 449 o melhor meio foi AC, em seguida os meios BDA, MM, MC e LB respectivamente. Comparando antagonistas com meio de cultura o antagonista 449 obteve inibição superior em relação ao antagonista 90 e 92 que se não se diferem. O meio ACT foi melhor meio para ambos três antagonistas. O meio MM não se difere para os antagonistas 92 e 449 e para o meio 90 teve menor inibição. O MC apresentou melhor inibição para o antagonista 90 em seguida para o antagonista 449 e com menor inibição para o antagonista 92 . O meio LB se difere apenas para o antagonista 90 e 449. Os resultados mostram que: (i) há variabilidade entre isolados de actinomicetos quanto a atividade antagonista contra *C. sublineolum*, (ii) a atividade antagonista dos actinomicetos testados varia em função do meio de cultura e da raça do fitopatógeno e(iii) a maior eficiência antagonista dos microrganismos contra *C. sublineolum* foi observada nos meios chamados Meio de actinomiceto e BDA.

Referências Bibliográficas

ALI, M.E.K. & WAREN, H.L. Physiological Races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum. **Plant Disease** 71:402-404.1987.

BAKER, K.F. & COOK R.J. **Biological control of plant pathogenes** . San Francisco: W.H. Freeman, 1974.433p.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa - CNPDA, 1991.388P.

BRESSAN.W.S & FIGUEREDO.J.E.F **Controle biologico de raças e isolados de Collhetotrichum sublineolum, do sorgo por actinomicetos**. Comunicado Técnico 62 outubro 2003 Sete Lagoas MG.

5.GHINI, R. NAKAMURA, D. **Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividades de solo a Fusarium Oxysporum F..SP. Phaseoli em microcosmos e in vivo**. Summa phytopathologica , v.27, n.3, p.318-322,2001.

MARIANO, R. L. R., Metodo de Seleção in vitro para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Anual de patologia de plantas**, v.1, p.369-409,1993.

THAKUR , R. P. & MATKUR, K. Anthracnose. In: Frederiksen, R.A. & Odvody, G.(Eds.) Compendium of Sorghum Dseases. APS Press. St. Paul. 2000. Pp.10-12