

BIOCONTROLE DA MELA DO FEIJOEIRO COMUM (*Rhizoctonia solani*) POR RIZOBACTÉRIAS EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Ueliton Oliveira de Almeida¹³¹

José Roberto Vieira Júnior¹³²

Cléberon de Freitas Fernandes¹³³

Resumo: A mela do feijoeiro é a principal doença da cultura na Região Norte do Brasil, podendo inviabilizar o cultivo de feijão se as condições forem favoráveis à doença. Os métodos tradicionais não tem sido eficientes para controlar a doença. Assim, neste trabalho, buscou-se testar oito rizobactérias obtidas de plantios de feijoeiro nos campos experimentais da Embrapa Rondônia e previamente selecionadas em casa-de-vegetação. Para tanto, sementes de feijoeiro `Carioca Precoce` foram microbiolizadas por 12 horas com suspensão de células de rizobactérias ($A_{540nm}=0,4$). Em seguida, foram plantadas em campo onde comumente a mela ocorria, preparado e adubado conforme recomendações técnicas para cultivo de feijoeiro. Como controle utilizou-se sementes embebidas em água por 12 horas e plantas pulverizadas aos 15 e 35 dias após a emergência com azoxistrobina (0,6 g/L). Para cada tratamento, foram plantadas quatro linhas de quatro metros (15 sementes/metro). A parcela útil foi composta de 20 plantas (dez em cada linha) obtidas das duas linhas centrais. O delineamento foi de blocos ao acaso com quatro repetições. A severidade da doença foi avaliada por meio de escala diagramática de severidade. Com os dados obtidos, determinou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Dos oito isolados testados, RZ-39, RZ-53, RZ-60, RZ-26 e RZ-94 foram capazes de reduzir a severidade da doença quando comparadas ao controle com água. RZ-39 promoveu controle com níveis significativamente semelhantes ao tratamento com fungicida. Agora, estes isolados encontram-se em fase de identificação e deverão ser testados em diferentes formulações para otimizar sua eficiência de controle e sobrevivência no campo e em prateleira.

Palavras-chave: *Thanatephorus cucumeris*, controle biológico, rizobactérias.

Abstract: The blight of bean is the main disease of culture in Northern Brazil and could be a restrictive condition to the cultivation of beans if the conditions are favorable to disease. Traditional methods have not been effective in controlling the disease. Thus, this study aimed to test eight rhizobacteria obtained from bean crops in experimental fields at Embrapa Rondônia previously selected at greenhouse experiments. To this, bean seeds, cv. `Carioca Precoce` were microbyolized for 12 hours with cell suspension of rhizobacteria ($A_{540nm} = 0.4$). They were then planted in a field where blight occurred commonly, prepared and fertilized as recommended for growing beans. As a control, seeds soaked in water for 12 hours and plants sprayed at 15 and 35 days after emergence with azoxystrobin (0.6 g / L) were used. For each treatment, were planted four rows of four meters (15 seeds / meter). A useful parcel consisted

¹³¹ Graduando, Faculdade UNIRON-RO; Bolsista do CNPq/ PIBIC.

¹³² Eng. Agrônomo, D.Sc., Pesquisador Embrapa Rondônia. Orientador. E-mail: vieirajr@cpafro.embrapa.br

¹³³ Farmacêutico, D.Sc., Pesquisador Embrapa Rondônia. E-mail: cleberon@cpafro.embrapa.br

of 20 plants (ten in each line) obtained from the two central lines. The design was randomized blocks with four replications. Disease severity was assessed by means of diagrammatic scale of severity. With these data, we determined the area under the disease progress curve (AUDPC). Of the eight isolates tested, RZ-39, RZ-53, RZ-60, RZ and RZ-26-94 were able to reduce the severity of the disease when compared to water control. RZ-39 significantly promoted control levels similar to fungicide treatment. Now, these isolates are being identified and should be tested in different formulations to optimize its efficiency and survival in the control field and shelf.

Keywords: *Thanatephorus cucumeris* biological control, rhizobacteria.

1. Introdução

O mela ou teia micélica é a principal doença da cultura do feijoeiro no Estado de Rondônia. Devido a esta doença o Estado vem perdendo espaço para outros Estados no Ranking nacional de produção e produtividade. A doença tem provocado o abandono de muitas áreas, em especial dos pequenos produtores, que não dispõem de recursos para investir em controle químico. Desta maneira, alternativas ao uso de fungicidas têm sido buscadas. Dentre todas, o uso de variedades resistentes tem sido a mais buscada, em função de, entre outras coisas, da facilidade de incorporação da tecnologia pelos produtores, do custo da tecnologia e da facilidade de adoção. Entretanto, as buscas por variedades resistentes têm sido, até o presente, infrutíferas. Segundo Sartorato & Rava (1994) a procura por genótipos de feijão para a região do trópico úmido têm sido uma busca constante, face à dificuldade de obter um único genótipo que apresente algum nível de resistência. Associado a isso está à questão cultural dos produtores, que resistem a usar variedades que sejam do Grupo Preto, adotando aquelas que pertencem mais frequentemente ao grupo Carioca, mais susceptível. Algumas variedades lançadas e testadas na região Amazônica, tidas como resistentes, tem apresentado elevado grau de susceptibilidade. Dessa maneira, não há até o momento nenhum genótipo identificado com nível de resistência adequado (Sartorato & Rava, 1994). Assim outras medidas de controle da doença precisam ser testadas e adotadas.

Os primeiros trabalhos envolvendo a introdução consciente de antagonistas visando o controle biológico de enfermidades de plantas aconteceram no início do século XX, nas décadas de 1920-1940. Assim, Henry (1931), lançou mão de fungos e bactérias de solo visando controlar *Helminthosporium sativum* em trigo. Desde então, o biocontrole de enfermidades de plantas tem sido uma das linhas de pesquisa mais trabalhada e investigada por fitopatologistas de todo o mundo.

Ao se usar um microrganismo como agente de biocontrole, em algumas situações, é possível que ocorra o controle biológico clássico (Tuzun & Kloepper, 1995), por antagonismo direto exercido pelo agente de biocontrole sobre o fitopatógeno, com envolvimento dos conhecidos mecanismos de antagonismo: produção de substâncias antimicrobianas, parasitismo direto, competição por nutrientes e por nichos ecológicos.

Outra possibilidade é que não ocorra o antagonismo direto e, mesmo assim, o patógeno esteja sendo controlado. Neste caso, estamos falando dos mecanismos de indução de resistência. Essa presunção constitui uma dos principais preceitos da fitopatologia, onde se assume que a suscetibilidade é exceção, uma vez que os mecanismos de defesa de plantas são muito eficientes e podem ser ativados quando não houver co-evolução do patógeno com o seu hospedeiro natural (Agrios, 2005).

Algumas bactérias habitam a rizosfera, e, ou, o rizoplane de plantas e nesses locais sobrevivem e se protegem da ação antagonística da microbiota do solo circundante. Em sua associação com as plantas, as rizobactérias benéficas, internacionalmente conhecidas como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), podem promover crescimento ou induzir resistência a múltiplos patógenos, através de um fenômeno denominado RSI (Resistência Sistêmica Induzida). Assim sendo, as PGPR podem ser (e têm sido) usadas para fins agronômicos, no controle de enfermidades de plantas por indução de resistência. (Chen et al. , 1996; Romeiro et al., 2000).

É fato conhecido que a dispensa de rizobactérias especificamente selecionadas para tal fim, na rizosfera da planta que se deseja proteger, promove controle de múltiplas enfermidades (Hoffland Et al. , 1997; Chen et al. , 1996; Kloepper et al. , 1997). Muitas vezes ocorre o controle biológico clássico por antagonismo direto exercido pela PGPR contra o fitopatógeno (Tuzun & Kloepper, 1995). Mas há situações cientificamente descritas em que antibiose e antagonismo apenas não explicam o controle biológico exercido (Loon et al. , 1998). Em outras palavras, a presença da rizobactéria na rizosfera torna toda a planta, inclusive a parte aérea, mais resistente a patógenos. Nos dias atuais, assume-se que quando a PGPR coloniza o sistema radicular, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizadas atuam como eliciadores de sinais bioquímicos, provavelmente jasminatos ou etileno (Pieterse et al. , 2001; Loon et al. , 1998). Esse sinal transloca-se até sítios distantes do local de sua gênese, genes que codificam para a síntese de componentes da resistência são ativados e esta é expressa (Loon Et al. , 1998; Sticher et al., 1997). O mesmo pode ser

observado quando se trata de microrganismos que habitam o filoplano. Recentemente, Halfeld-Vieira et al, 2006 demonstrou que *Bacillus cereus*, isolado do filoplano de tomateiros sadios poderia estar atuando como indutor de resistência sistêmica contra diferentes patógenos da cultura. O mesmo foi observado por Vieira-Júnior (2005), que obteve bactérias de filoplano sadia de feijoeiro e essas induziram a resistência contra ferrugem, antracnose, crestamento bacteriano e à mancha-angular.

Ademais, na agricultura atual, a busca por produtos de origem natural corre paralelamente a busca por produtos sintéticos que sejam menos danosos ao ambiente e que apresentem um amplo espectro de controle. Esses produtos são conhecidos como fungicidas de quarta geração, indutores de resistência sistêmica ou eliciadores de resistência. Esse mecanismo complexo envolve a ativação nas plantas de mecanismos latentes de resistência.

Essas substâncias funcionam ativando diversos mecanismos de defesa vegetal, em rotas metabólicas diferentes daquelas que são ativadas pelos microrganismos indutores de resistência. A resistência sistêmica adquirida ocorre quando a planta “percebe” a presença do eliciador abiótico. Essa “percepção” se dá quando as moléculas do eliciador se ligam a moléculas receptoras, presentes na membrana plasmática da célula vegetal. (Sobrinho et al. 2005). Dessa ligação, resulta a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (as PR - proteínas) e fitoalexinas. Algumas dessas proteínas já são conhecidas como a B-1,3glucanase e a quitinase, que atuam degradando a parede celular de fungos (Vieira-Júnior, 2005).

Vários agentes podem atuar como eliciadores de indução de resistência sistêmica, desde moléculas simples à compostos de natureza complexa. Dentre estes pode-se citar como exemplo o Acibenzolar-S-metil (ASM), ácido salicílico, quitosana, silício, etileno, alguns jasmonatos, Messenger®, Elexa®, entre outros.

Alguns relatos demonstram a eficiência desses compostos nos mais diversos patossistemas. Martinez et al.,(2000) demonstraram a eficiência do ácido salicílico no controle do Tobacco mosaic vírus em fumo, onde os autores atribuíram seu efeito a de um sinalizador remoto de resistência. Latunde-Dada e Lucas (2001) comprovaram que o ASM foi capaz de induzir resistência em plantas de feijão-caupi contra a antracnose. O ácido jasmônico foi capaz de induzir resistência em plantas de trigo contra a ferrugem do colmo (Sticher et al, 1997). Rodrigues e Datnoff (2007) demonstraram que o silício é capaz de induzir resistência em diversas plantas, especialmente àquelas que tendem a acumulá-lo em maior quantidade nos seus tecidos como as gramíneas.

2. Metodologia

No presente trabalho buscou selecionar o melhor isolado em condições de campo, na qual foi avaliado oito isolados. Estes foram os melhores isolados de 150 avaliado *in vitro* e em vivo em casa de vegetação.

2.1 - Ensaio para re-testagem dos melhores isolados selecionados *in vivo* em casa-de-vegetação

Para a seleção massal dos 10 melhores antagonistas, as sementes de feijoeiro foram embebidas durante 12 horas numa suspensão de células ajustada numa concentração (A_{540}) igual a 0,4 (microbiolização). As plantas emergidas foram utilizadas, com 10 dias após a emergência, plantados individualmente, em copos plásticos de 300 mL. Utilizou-se como controles o fungicida azoxistrobina (0,6g/L; na dose comercial), e água. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação apenas do substrato. Após quatro dias, inoculou-se por aspersão uma suspensão de células do patógeno em fase exponencial de cultivo ($1,5 \times 10^4$ fragmentos/mL), sobre as folhas das plantas e estas foram levadas para câmara de nevoeiro, onde permaneceram por 24h. Em seguida, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até o aparecimento dos primeiros sintomas, a partir dos quais, determinou-se a severidade da doença pelo uso de uma escala diagramática de severidade. Aquelas que mantiveram os efeitos de controle foram testadas a campo.

2.2 - Ensaio em Campo

Neste ensaio, buscou-se testar oito rizobactérias previamente selecionadas em casa-de-vegetação. Para tanto, sementes de feijoeiro `Carioca Precoce` foram microbiolizadas por 12 horas com suspensão de células de rizobactérias ($A_{540nm}=0,4$). Em seguida, foram plantadas em campo onde comumente a mela ocorria, preparado e adubado conforme recomendações técnicas para cultivo de feijoeiro. Como controle utilizou-se sementes embebidas em água por 12 horas e plantas pulverizadas aos 15 e 35 dias após a emergência com azoxistrobina (0,6 g/L). Para cada tratamento, foram plantadas quatro linhas de quatro metros (15 sementes/metro). A parcela útil foi composta de 20 plantas (dez em cada linha) obtidas das duas linhas centrais. O delineamento foi de blocos ao acaso com quatro repetições. A severidade da doença foi avaliada por meio de escala diagramática de severidade.

3. Resultados e discussão

Com os dados obtidos, determinou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Dos oito isolados testados em campo, RZ-39, RZ-60, RZ-53, RZ-26 e RZ-94 foram os tratamentos mais capazes de reduzir a severidade da doença quando comparadas ao controle com água (Figura 1). Estes resultados confirmaram aqueles obtidos em casa-de-vegetação. Dentre os oito melhores isolados selecionados, está o tratamento RZ-39 que promoveu controle com níveis significativamente semelhantes ao tratamento com fungicida. Antunes Júnior (2010) demonstrou que o controle da doença foi promovido por mecanismos envolvidos no antagonismo direto destas rizobactérias e pela produção de compostos voláteis. Oliveira, (2010) trabalhando com as mesmas rizobactérias, porém com enfoque em atividade de promoção de crescimento de plantas demonstrou que estes isolados de rizobactérias podem atuar como promotoras de crescimento de plantas, aumentando a produtividade, o teor de clorofila, aumento da área foliar e da matéria seca de parte aérea e de raízes.. Esse dado se assemelha muito ao que foi sugerido por Schroth & Hancock (1981), os quais relatam que, das rizobactérias que constituem a microbiota do solo, que possuem efeitos benéficos, são da ordem de 2 a 5% do total. Porém, Chen et al. (1996) descreve que apenas 0,6% são benéficas.

Dos 150 isolados selecionados, apenas as anteriormente citadas foram capazes de promover o controle e um número ainda menor, dentre estas ambos os mecanismos (controle de doenças e promoção de crescimento).

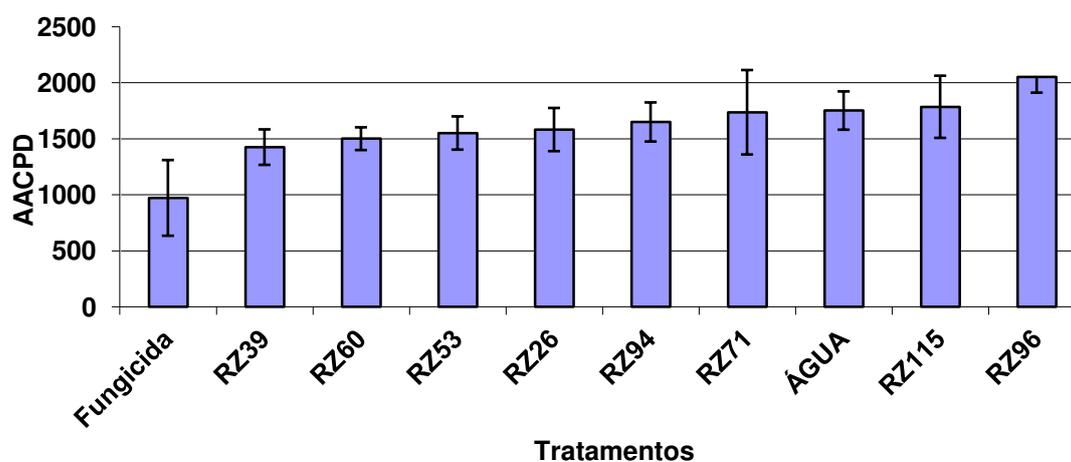


Fig. 1. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da severidade da mela de feijoeiro microbiolizados com rizobactérias.

4. Conclusões

O Controle biológico de doenças é uma alternativa real para o manejo da mela do feijoeiro. Esses resultados aqui apresentados demonstram que os isolados de rizobactérias induziram resistência a planta contra o fungo *Rhizoctonia solani*, promovendo controle biológico. Agora, estes isolados encontram-se em fase de identificação e deverão ser testados em diferentes formulações para otimizar sua eficiência de controle e sobrevivência no campo e em prateleira.

5. Bibliografia

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5^o Ed., Oxford, UK, Academic Press Publications, 2005, 922 p.

ANTUNES JUNIOR, H. **Seleção de rizobactéria autóctones de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) para o controle biológico da mela ou teia micélica (*Thanatephorus cucumeris*)**. 2010.

ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & ZIMMERMANN, M. J.O. (ed.) **Cultura do Feijoeiro no Brasil**, Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1996, 786p

CHEN, Y., MEI, R., LIU, L. & KLOEPPER, J. W. **The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture**. Chapter 8, pg: 165-184, IN: Utkhede, R. S. & Gupta, V. K (Eds). *Management of Soil Born Diseases*. Kalyani Publishers, Ludhiana. 1996.

HALFELD-VIERA, B.A; VIEIRA-JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H. S. A. A.; BARACAT-PEREIRA, C. **Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus***. *Pesquisa. Agropecuária. Brasileira*, Brasília, v.41, n.8, p.1247-1252, ago. 2006

HENRY, A. W. **The Natural Microflora of the Soil in Relation to the foot-rot problem of wheat**. *Can. Jour. Res.*, 4: 69-77. 1931.

HOFFLAND, E., BAKKER, P., LOON, L. C. V. & VAN LOON, L. C. **Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply**. *Phytopathology*, 87: 138. 1997.

KLOEPPER, J. W., TUZUN, S., ZEHNDER, G. W., WEI, G. & WEI, G. **Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - historical precedence**. *Phytopathology*, 87: 136-137. 1997.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. **The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings for rapid induction of resistance**. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. V. 58, p. 199-208, 2001

LOON, L. C. V., BAKKER, P., PIETERSE, C. M. J. & VAN LOON, L. C. **Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology**, 36: 453-483. 1998.

MARTINEZ, C.; BACCOU, J.C.; BRESSON, E.; BAISSAC, Y; DANIEL, J.F.; JLLOUL, A.; MONTILLET, J.L.; GEIGER, J.P.; ASSIGBETSÉ, K.; NICOLE, M.; **Salicylic acid mediated by oxidative burst in key molecule in local and systemic response of cotton challenged an avirulent race of xanthomonas campestris pv. Malvacearum. Plant Physiology**. V.122, p. 757-766, 2000.

PIETERSE, C. M. J., VAN, P. J. A., VAN, W. S. C. M., TON, J., LEON, K. K. M., KEURENTJES, J. J. B., VERHAGEN, B. W. M., KNOESTER, M., VAN, D. S. I., BAKKER, P. A. H. M. & VAN, L. L. C. **Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: Triggering, signalling and expression. European Journal of Plant Pathology**, 107: 51-61. 2001.

RODRIGUES, F.A.; DATNOFF, L. Silicon-mediated resistance in monocots: the rice-Magnaporthe grisea model. In: Rodrigues, F.A.; Romeiro, R.S. **Indução de resistência de plantas a patógenos- anais da III Reunião brasileira sobre indução de resistência em Plantas à patógenos**, Viçosa, MG, Editora UFV, 2007, 340p.

ROMEIRO, R.S.; NEVES, D.M.S.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; DEUNER, C.C. **Inadequação de uso de apenas um patógeno desafiante na seleção massal de residentes de filoplano para fins de controle biológico - um caso. Summa Phytopathologica, Resumos...**, Prelo, 2000.

SARTORATO, A. & RAVA, C. A. **Principais doenças e pragas do feijão comum e o seu controle** (ed.) Goiânia; EMBRAPA-CNPFA, 1994, 290p.

SCHOROTH, M. N. e HANCOCK, J. Selected topics in biological control. **Annual Review Microbiology**, 35:p453-476, 1981.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. IN.: Cavalcanti, L. S.; Di PIERO, R.S.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba, FEALQ, 2005, 263p.

STICHER, L., MAUCH MANI, B. & METRAUX, J. P. **Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology**, 35: 235-270. 1997.

TUZUN, S. & KLOEPPER, J. W. **Potential Applications of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Induced Systemic Disease Resistance**, pg: 115-127, Chapter 6. In: Reuveni, R (Ed.) Novel approaches to integrated pest management. Lewis Publishers, Boca Raton. In: (Ed.) 1995. PP

VIEIRA JÚNIOR, J.R. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura.** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. Tese (Doutorado), 146p, 2005.

Oliveira, M. S. A. **Seleção de rizobactérias autóctones para a promoção de crescimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).** 2010.