

**CONTROLE DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*, CAUSADOR DA ANTRACNOSE EM FRUTOS, POR *PSEUDOMONAS* SPP.**

*Erica Heloise Freitas Santos*<sup>1</sup>, *Leonardo Sousa Cavalcanti*<sup>2</sup> *Vanessa Polon Donzeli*<sup>3</sup>

**Resumo**

A produção de frutos no cenário econômico no Vale do São Francisco gera diversas preocupações, sendo, uma das mais importantes, a antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. O estudo teve como objetivo investigar a ação antagônica das bactérias *Pseudomonas* spp. e filtrados da cultura ao fungo *C. gloeosporioides*. Dos 50 isolados testados na inibição micelial, os isolados PCA 30, PCA31, PCA36, PCA39, PCA63, PCA64 e PCA66 de *Pseudomonas* spp. apresentaram melhores resultados de inibição e foram selecionados para os testes com o os seus filtrados e testes de germinação de conídios. Não houve inibição micelial pelos filtrados de cultura em nenhum dos 7 isolados testados, no entanto, houve atraso de 3 dias no crescimento micelial comparado com a testemunha, além de deformações nas hifas e dos tubos de germinação e uma taxa de inibição de germinação de esporos de 70,67% no filtrado do isolado PCA36. Os isolados bacterianos apresentaram eficiência na inibição de germinação de esporos sendo que o isolado PCA36 apresentou o melhor resultado, inibindo 96,72 %. No teste de substancias voláteis, o isolado PCA31 apresentou melhor taxa de inibição micelial (37,30%). Apesar da baixa eficiência dos filtrados das culturas na inibição do crescimento fúngico, os isolados bacterianos de *Pseudomonas* spp e seus voláteis mostraram eficácia no controle do fungo.

<sup>1</sup> Engenharia Agrícola e Ambiental, Universidade Federal do Vale do São Francisco, [erica.freitas2005@hotmail.com](mailto:erica.freitas2005@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, IPESB, [Leonardo.cavalcanti@univasf.edu.br](mailto:Leonardo.cavalcanti@univasf.edu.br)

<sup>3</sup> Doutora, Universidade Federal do Vale do São Francisco, IPESB, [vanessa.donzeli@univasf.edu.br](mailto:vanessa.donzeli@univasf.edu.br).

## Introdução

Dentre as doenças que ocorrem em diversas culturas, a antracnose, causada por espécies do fungo *Colletotrichum*, pode prejudicar as plantas nos seus vários estágios de desenvolvimento (CHOUDHURY et al., 2003). Dentre as espécies causadoras de antracnose que predominam no Brasil, destaca-se *Colletotrichum gloeosporioides*, que é expressiva como causa da podridão pós-colheita principalmente frutos tropicais (PEREIRA, 2016).

Atualmente, o método de controle da doença inclui o uso profilático dos fungicidas sintéticos (PUSHPA et al., 2015). Entretanto, a aplicação de químicos sintéticos no fruto pode acarretar problemas para o consumo, devido à exigência, cada vez maior, de frutos sem resíduos de substâncias tóxicas (JUNQUEIRA et al., 2002).

Nesse sentido, o uso de agentes microbianos para controle biológico de doenças vem sendo estudado como uma alternativa viável à substituição dos mesmos e tem demonstrado grande potencial (ZHENG et al., 2013). Com esse intuito o estudo objetivou investigar a ação antagonista, *in vitro*, das bactérias *Pseudomonas* spp. sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose em frutos.

## Fundamentação Teórica

Agentes de controle biológico podem agir por mecanismos distintos, incluindo antibiose por secreção de metabólitos voláteis tóxicos, produção de enzimas micolíticas, parasitismo ou competição por espaço ou nutrientes (BHATTACHARJEE; DEY, 2014).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* mostram-se promissoras no controle de um grande espectro de patógenos de plantas e são potenciais candidatas para o desenvolvimento de bioprodutos, por produzirem substâncias responsáveis pela inibição do crescimento de patógenos (AGARAS et al., 2015).

Trabalhos como de Moreira (2013) em que o isolado de *Pseudomonas putida* foi eficiente na inibição da germinação de esporos do fungo *Colletotrichum acutatum* demonstram a eficiência da bactéria como agente de controle.

## Metodologia

Foram realizados testes de antagonismo, *in vitro*, de 50 isolados de *Pseudomonas*, contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizando o Método da Risca descrito por Mariano (1993), nos meios de cultura BDA e Meio B (King et al., 1954) com 5 repetições. Dos 50 isolados, 7 foram selecionados para as próximas etapas do estudo, pois apresentaram maior eficácia na inibição do fungo, tanto no meio B como no meio BDA.

A obtenção dos filtrados de cultura dos 7 isolados foi realizada pela metodologia de Banowetz et al. (2009).

A metodologia utilizada para a inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* pelos filtrados foi a de difusão em Agar foi descrita por Tagg & McGiven (1971) com modificações.

Os isolados selecionados e seus filtrados também foram testados quanto aos seus efeitos sobre a germinação de esporos de *C. gloeosporioides* pelo método adaptado de Carvalho et al. (2005) e o efeito dos compostos voláteis no crescimento micelial do *C. gloeosporioides* foi determinado pela metodologia de Arrebola et al. (2010) com algumas

modificações. O grau de inibição foi determinado usando pela fórmula de Yang et al., (2011).

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análise de variância pelo teste de Scott-Knott para comparação das médias.

## Resultados e Discussão

Os isolados PCA30, PCA31, PCA36, PCA39, PCA63, PCA64 e PCA66 de *Pseudomonas* spp., apresentaram melhor resultado de inibição micelial do fungo (de 41,5 a 48% de inibição), quando comparados, nos meios BDA e B, às testemunhas sem inoculação da bactéria, sendo essa diferença significativa à 5% de probabilidade (Tabela 1).

Tabela 1. Inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* por isolados de *Pseudomonas* spp fluorescentes, cultivados em meio B e BDA. Média de 5 repetições. Fonte: Própria.

Isolado bacteriano	Raio do fungo (cm) Meio B	Raio do fungo (cm) Meio BDA	Isolado bacteriano	Raio do fungo (cm) Meio B	Raio do fungo (cm) Meio BDA	Isolado bacteriano	Raio do fungo (cm) Meio B	Raio do fungo (cm) Meio BDA
Testemunha	2,12 A	2,44 A	Testemunha	2,12 A	2,44 A	Testemunha	2,12 A	2,44 A
PCR37	2,10 A	2,28 B	<b>PCA36</b>	<b>1,12 E</b>	<b>1,35 F</b>	PCA72	1,36 D	1,31 F
<b>PCA39</b>	<b>1,24 E</b>	<b>1,40 F</b>	PS1	1,90 B	2,07 C	PCR38	1,68 C	1,96 D
PCR33	1,20 E	2,27 B	PS2	1,94 B	2,08 C	PM8	1,96 B	1,99 D
PCA38	1,62 C	1,30 F	PCA35	1,58 C	1,19 F	PB33	2,10 A	2,06 C
PC4	1,96 B	2,02 C	PA6	1,90 B	1,93 D	PCA6	1,48 D	1,13 F
PM4	1,96 B	2,18 B	PCR29	1,92 B	2,22 B	PCA40	2,22 A	1,29 F
<b>PCA31</b>	<b>1,10 E</b>	<b>1,36 F</b>	PCR28	2,04 B	2,16 B	<b>PCA64</b>	<b>1,20 E</b>	<b>1,30 F</b>
PCA41	1,42 D	1,29 F	PCA41 B	1,38 D	1,67 E	PCR23	2,14 A	2,20 B
PCA37	1,65 C	1,43 F	PCA67	1,58 C	1,36 F	PM1	2,14 A	1,90 D
PBR15	2,02 B	2,16 B	PCR40	2,22 A	2,10 C	PCA61	1,40 D	1,33 F
PCA5	1,64 C	1,39 F	<b>PCA30</b>	<b>1,16 E</b>	<b>1,32 F</b>	PCA33	2,22 A	1,26 F
PBR41	1,88 B	2,38 A	PCA62	1,46 D	1,32 F	PP4	2,30 A	1,93 D
PP1	2,00 B	2,07 C	PSR8	2,28 A	1,62 E	PB32	2,18 A	1,92 D
PCA65	1,50 D	1,51 E	PCR30	2,06 A	1,96 D	PB9	1,82 B	2,04 C
<b>PCA63</b>	<b>1,20 E</b>	<b>1,36 F</b>	PCA32	1,42 D	1,32 F	PM6	1,96 B	2,01 C
PA4	2,14 A	2,21 B	PCA68	1,48 D	1,34 F	PCA26	1,40 D	1,26 F
<b>PCA66</b>	<b>1,22 E</b>	<b>1,30 F</b>	PB5	1,88 B	2,36 A			
C.V.Meio B= 7,98%				C.V.Meio BDA= 6.71 %				

As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Não houve inibição do crescimento micelial dos fungos pelos filtrados das culturas, sendo esse resultado constatado pela ausência de halos de inibição nos meios de cultura B e BDA.

Esses resultados inferem que os isolados bacterianos testados possivelmente não secretaram, no meio de cultura, substâncias capazes de impedir o crescimento do fungo, sendo que a atividade antimicrobiana pode ter se dado de maneira direta, por competição ou por substâncias constitutivas das células. Entretanto, observou-se, que o crescimento micelial foi consideravelmente retardado quando comparados ao controle. Enquanto o controle apresentou crescimento significativo em 7 dias, o fungo levou 10 dias para cobrir toda a placa onde foram adicionados os filtrados das culturas PCA36, PCA39 e PCA64 e mais que 8 dias com os demais filtrados.

Também foi observado um menor volume micelial mesmo com o preenchimento total da placa. Diferente do que ocorreu neste estudo, Huang et al. (2015) verificaram halos de inibição micelial deste fungo, de 22.3 mm, pelo filtrado de *Bacillus atrophaeus*XW2. As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade .

Nos testes de inibição da germinação de esporos, os isolados bacterianos apresentaram melhores resultados do que os filtrados da cultura (Tabela 2), podendo ser explicado, tanto pela baixa atividade antifúngica do filtrado como também pelo crescimento agressivo da bactéria. Verificou-se, também o aparecimento de vacúolos nas hifas e nos tubos de germinação do fungo, causados pela degradação bacteriana.

Tabela 2. Inibição da germinação de esporos de *C. gloeosporioides* por *Pseudomonas* spp.cultivados em meio B líquido e seus filtrados. Média de 9 repetições. Fonte: Própria.

Isolado bacteriano	Não germinados (cultivo)	Não germinados (filtrado)
Testemunha	13,56 F	15,83 D
PCA30	90,39 B	49,33 C
PCA31	83,06 D	51,33 C
<b>PCA36</b>	<b>96,72 A</b>	<b>70,67 A</b>
PCA39	89,94 B	53,00 C
PCA63	87,39 C	60,33 B
PCA64	96,61 A	63,00 B
PCA66	79,00 E	45,67 C
	C.V. = 5,12 %	C.V.= 12,51 %

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

O filtrado da cultura PCA36 apresentou-se significativamente diferente dos outros filtrados, com inibição de 70,67% em relação à testemunha. À semelhança deste, Huang et al. (2015) verificaram uma redução de 96% de inibição da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* por isolados de *Bacillus atrophaeus*. A taxa de inibição observada neste trabalho, bem como a alteração na morfologia dos esporos pode justificar o atraso do crescimento micelial discutido anteriormente.

Os resultados de inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* pelos compostos voláteis derivados das culturas de *Pseudomonas* spp. estão apresentados na tabela 3. Os compostos voláteis produzidos por todos os isolados ocasionaram inibição micelial entre 23,54 e 27,98%, no entanto, o isolado PCA31 destacou-se dos demais proporcionando inibição de 37,30% do micélio, em relação à testemunha.

Em estudo semelhante, Baysal et al. (2013) ao analisarem três substancias voláteis extraídas de isolados de *B. subtilis* observaram inibição micelial de 44,3% e deformações nos

esporos e nas hifas do fungo *Fusarium oxysporum*.

Tabela 3. Inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* pelos compostos voláteis derivados das culturas de *Pseudomonas* spp. Média de 8 repetições. Fonte: Própria.

Isolado bacteriano	Potencial de inibição (%)
Testemunha	0,00 A
PCA30	23.98 B
<b>PCA31</b>	<b>37.30 C</b>
PCA36	28.87 B
PCA39	26.20 B
PCA63	23.54 B
PCA64	27.98 B
PCA66	24.42 B
C.V.= 35.79%	

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott- Knott ao nível de 5% de probabilidade.

## Conclusões

Todos os testes realizados apresentaram resultados positivos no biocontrole do fungo *C. gloeosporioides* pelos isolados de *Pseudomonas* ssp. e seus extratos, o que demonstra a possibilidade de serem selecionados para testes, *in vivo*, para a verificação de seu potencial de controle da antracnose viabilizando o desenvolvimento de produtos que possam gerar menor impacto ambiental.

## Referências

AGARAS, B. C.; SCANDIANI, M.; LUQUE, A.; FERNÁNDEZ, L.; FARINA, F.; CARMONA, M.; GALLYD, M.; ROMEROD, A.; WALLA, L.; VALVERDE, C. Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. **Biological Control Journal**, v. 90, p. 173-186, 2015.

ARREBOLA E, SIVAKUMAR D, KORSTEN L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. **Biological Control Journal** v.53.p.122–128. 2010. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.11.010

BANOWETZ, G. M.; AZEVEDO, M. D.; ARMSTRONG, D. J.; MILLS, D. I. Germination arrest factor (GAF): Part 2. Physical and chemical properties of a novel, naturally occurring herbicide produced by *Pseudomonas fluorescens* strain WH6. **Biological Control Journal**, v. 50, n. 2, p. 103-110, 2009.

BHATTACHARJEE, R.; DEY, U. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n.17, p.1749-1762, 2014.

BAYSAL Ö, LAI D, XU HH, SIRAGUSA M, ÇALIŞKAN M, CARIMI F, DA SILVA

JAT,TÖRM. A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. **PLoS One** 8(1):e53182. doi:10.1371/j.pone.0053182, 2013.

CARVALHO, G .A. et al. Efeito *in vitro* e *in vivo* de filtrados de rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia. Lavras** , v. 29, n. 3, p. 553-561, 2005 .

CHOUHDURY M. M., COSTA T. S., ANJOS J. B. Controle da antracnose pós-colheita da manga causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Comunicado técnico 116**. ISSN 1516-1609 Petrolina, PE. Dezembro, 2003.

HUANG, H.; WU, Z.; TIAN, C. Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus*XW2 , antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Microbiology** n. 35, p. 1361–1371, 2015.

JUNQUEIRA, N. T. V.; PINTO, A. C. DE Q.; CUNHA, M. M.; RAMOS, V. H. V. Controle das doenças da mangueira. In: ZAMBOLIM, M.L. (Org.) **Controle de Doenças de Plantas: fruteiras**. Viçosa –MG: UFV. v.1, p. 323-404. 2002.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RAPP, p.369-409. 1993.

PEREIRA F. D. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum spp.* provenientes de diferentes frutas tropicais. 119f. **Tese de Doutorado em Agronomia**. Unesp, Jaboticabal, 2016.

PUSHPA, D; YOGENDRA, K. N.; GUNNAIAH, R.; KUSHALAPPA , A. C.; MURPHY A. Identification of late blight resistance-related metabolites and genes in potato through nontargeted metabolomics. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 32, p. 584–595, 2014.

TAGG JR, MCGIVEN AR. Assay system for bacteriocins. **Journal of Applied Microbiology** v .21(5). p.943.1971

YANG C.J., ZHANG X.G., SHI G.Y., ZHAO H.Y., CHEN L., TAO K., HOU T.P..Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. **African Journal of Microbiology Research** v. 5(2).p.131–136. 2011. doi:10.5897/AJMR10.81

ZHENG, M.; SHI, J.; SHI, J.; WANG, Q; LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, v. 65. p. 200-206. 2011