

Potencial *in vitro* de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum

Evelynne Urzêdo Leão¹; Júlio Cesar da Silva¹; Fábíola Rodrigues Medeiros¹; Gabriela Silva Santa Rosa Macêdo²; Gentil Cavalheiro Adorian³; Antonio Carlos Maringoni¹

¹ Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, FCA-UNESP, CEP 18610-307, Botucatu, SP; ² Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, FCA-UNESP, CEP 18610-307, Botucatu, SP; ³ Doutor em Fitotecnia (Esalq/USP), Professor da Faculdade Católica do Tocantins, CEP 77061-002, Palmas – TO

Autor para correspondência: Evelynne Urzêdo Leão (evelynnegpi@gmail.com)

Data de chegada: 28/08/2015. Aceito para publicação em: 24/08/2016.

10.1590/0100-5405/2120

RESUMO

Leão, E.U.; Silva, J.C.; Medeiros, F.R.; Macêdo, G.S.S.R.; Adorian, G.C.; Maringoni, A.C. Potencial *in vitro* de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum. *Summa Phytopathologica*, v.42, n.4, p.360-362, 2016.

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma cultura de grande relevância na alimentação da população brasileira. A murcha-de-curtobacterium ou murcha bacteriana, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), é uma doença vascular que acomete o feijoeiro causando danos significativos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação *in vitro* de *Bacillus* spp. na inibição de dois isolados de Cff, colonização do sistema radicular e

desenvolvimento de plântulas de feijoeiro-comum. Foram realizados dois ensaios *in vitro* para verificar a atividade antagonista dos isolados *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* e *B. subtilis* + *B. licheniformis* a dois isolados de Cff. Todos os isolados de *Bacillus* spp. apresentaram inibição no crescimento dos isolados de Cff. Não foi observada a colonização das raízes das plântulas de feijoeiro-comum, pelos isolados bacterianos avaliados.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, Murcha-de-curtobacterium, Controle Biológico, Antagonismo Bacteriano

ABSTRACT

Leão, E.U.; Silva, J.C.; Medeiros, F.R.; Macêdo, G.S.S.R.; Adorian, G.C.; Maringoni, A.C. *In vitro* potential of *Bacillus* spp. in the control of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in common bean. *Summa Phytopathologica*, v.42, n.4, p.360-362, 2016.

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) constitutes a very important crop in the feeding of the Brazilian population. The curtobacterium wilt or bacterial wilt, caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), is a vascular disease that affects the common bean, leading to significant damage. In this context, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of *Bacillus* spp. on the inhibition of two Cff isolates,

the colonization of the root system and the development of common bean seedlings. Two *in vitro* assays were performed to verify the antagonistic activity of the isolates *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, and *B. subtilis* + *B. licheniformis* against two isolates of Cff. All isolates of *Bacillus* spp. inhibited the growth of Cff isolates. Common bean seedlings showed no root colonization by the evaluated bacterial isolates.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, Curtobacterium Wilt, Biological control, Bacterial Antagonism

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de grande relevância na alimentação da população brasileira, sendo o Brasil um dos maiores produtores do mundo. Contudo, a produtividade média do país é baixa, sendo a incidência de doenças um dos principais fatores (1). A murcha-de-curtobacterium ou murcha bacteriana, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), é uma doença vascular importante para a cultura do feijoeiro, na qual o seu agente causal sobrevive e é disseminado por sementes (2). Os sintomas típicos da doença, além da murcha, incluem o amarelecimento das folhas, nanismo e morte de plantas (12). A doença encontra-se distribuída em várias áreas produtoras de feijão, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e seu controle está baseado somente no uso de sementes sadias, rotação de culturas e cultivares com algum nível de resistência genética (9, 12).

O controle biológico de doenças com o uso de microrganismos é uma ferramenta importante para a agricultura. A diversidade de microrganismos existentes, bem como suas relações antagonistas, são ferramentas importantes no controle biológico (7). Bactérias isoladas da rizosfera e rizoplane de plantas podem promover o crescimento das

plantas e controlar fitopatógenos de solo, pois são capazes de crescer e colonizar o sistema radicular, que é o sítio de infecção desses patógenos (7). O potencial de controle da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro, em condições controladas, via tratamento de sementes com isolados específicos de rizobactérias vem sendo estudado (4, 10). Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a ação inibitória *in vitro* de *Bacillus* spp. sobre dois isolados de Cff.

A atividade antagonista *in vitro* de isolados de *B. subtilis*, *B. subtilis* (isolado AP03), *B. licheniformis*, *B. subtilis* + *B. licheniformis* e *Rhizobium* sp., cedidas pelo Dr. Wagner Bettiol da Embrapa Meio Ambiente – Jagariúna/SP, foi avaliada contra dois isolados de Cff (Feij-2500 e Feij-2628), pertencentes a coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, DPV/FCA/UNESP Campus de Botucatu. Empregou-se a metodologia descrita por Romero (13) de antibiose por difusão em dupla camada de meio de cultura agarizado. Para tanto, placas de Petri de vidro contendo meio de cultura nutriente-sacarose-ágar (NSA) foram semeadas em quatro pontos equidistantes com os isolados de *Bacillus* spp. Cada isolado foi semeado em cinco placas de Petri e incubado a 28°C, por 48 horas. As placas foram em

seguida transferidas para câmara de fluxo laminar, na posição invertida e adicionado 1 mL de clorofórmio na tampa de cada uma delas, por 30 min., sob luz ultravioleta. As placas permaneceram entreabertas por 30 min., visando a volatilização do clorofórmio remanescente. A seguir foi adicionada uma sobrecamada de 5 mL de meio NSA fundente, contendo 0,75% de ágar, ao qual foram incorporados 0,1 mL de suspensão de cada um dos isolados de Cff. As placas foram mantidas a 28 °C, por 48 horas, e foram medidos os diâmetros perpendiculares dos halos de inibição formados ao redor das colônias inativadas das bactérias (em cm) e classificados conforme Silva et al. (14), em: + (0 – 0,9 cm) baixa capacidade de inibição; ++ (1,0 – 1,9 cm) média capacidade de inibição; +++ (2,0 – 2,9 cm) alta capacidade de inibição; ++++ (>3,0 cm) muito alta capacidade de inibição.

Sementes de feijoeiro-comum (cultivar Pérola) foram desinfestadas em álcool a 70%, por 2 min. e hipoclorito de sódio a 2%, durante 5 min., enxaguadas em água destilada e esterilizada e imersas separadamente em suspensões bacterianas (10⁸ UFC/mL) dos isolados de bactérias, durante 1 h, e secas em ambiente de laboratório durante 12 h. O tratamento testemunha foi representado por sementes de feijoeiro imersas em água destilada contendo 0,01% de Tween 20. Em seguida, oito sementes de cada um dos tratamentos foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo Phytigel-água (11). Os tubos foram mantidos em B.O.D. a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h, durante 10 dias. Nesse período foi avaliada a emergência das plântulas e no décimo dia de incubação foi avaliada a turbidez do meio Phytigel-água, ao redor das raízes das plântulas, que indicou a colonização do rizoplane (11). As plântulas foram retiradas dos tubos e o comprimento da raiz principal e da parte aérea foi mensurado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas com o teste de Tukey a 5%.

Todas as bactérias inibiram o crescimento dos dois isolados de Cff avaliados (Tabela 1). *B. licheniformis* foi o que promoveu maior inibição do crescimento de ambos os isolados do patógeno, com halo de inibição maior que 3 cm de diâmetro. Também foi possível observar que *B. subtilis* (AP03) promoveu maior inibição do isolado Feij-2500 de

Cff. Nesse tratamento não foi possível observar o crescimento de Cff em algumas placas, este fato pode estar relacionado à maior capacidade de produção de substâncias inibitórias com ação antibacteriana. No entanto, ressalta-se que a antibiose, apesar de ser uma característica importante para o biocontrole, é apenas um dos mecanismos usados por microrganismos (5).

No ensaio da colonização do rizoplane, após observações diárias dos tubos, e aos 10 dias após a incubação, verificou-se que não houve colonização das raízes de plântulas de feijoeiro-comum pelos isolados avaliados (Tabela 2). O estabelecimento bacteriano na rizosfera é fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta. A inconstância dos resultados é citada por diversos autores, pois nem sempre as bactérias repetem sua atuação como promotoras de crescimento, mesmo em testes realizados em condições semelhantes (3, 4).

Apesar de não ser observada a colonização das raízes pelas bactérias, foi possível inferir que alguns tratamentos proporcionaram resultados superiores. Os tratamentos com *B. subtilis* e *B. subtilis* (AP03) promoveram maior porcentagem de germinação das sementes, não diferindo da testemunha (Tabela 2). O tratamento com *Rhizobium* sp. apresentou menor porcentagem de plantas emergidas. Dentre as vantagens proporcionadas por *B. subtilis* está à relacionada à germinação mais rápida das sementes. Manjula & Podile (8), trabalhando com sementes de feijão-guandu tratadas com formulação a base e *B. subtilis* AF1 em turfa suplementada com quitina, verificaram que houve um aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%.

Não houve diferença no desenvolvimento das plântulas, quanto ao comprimento da raiz e da parte aérea, promovido pelas bactérias ensaiadas. Entretanto, esse fato pode ser explicado pela pouca idade e as condições de desenvolvimento das plântulas em Phytogel-água, pois em condições de crescimento em substrato há registros do incremento da biomassa de plantas de feijoeiro (10). Com os resultados obtidos foi possível identificar o potencial *in vitro* de isolados de *Bacillus* sp. no controle da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro-comum.

Tabela 1. Teste de antagonismo, pela técnica de dupla camada, realizado com *Bacillus* sp. contra *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff).

Tratamentos	Cff	
	Isolado 2500	Isolado 2628
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++
<i>Bacillus subtilis</i> (AP03)	++++	+++
<i>Bacillus licheniformis</i>	++++	++++
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	+++	+++

*Classificação da capacidade de inibição com base no diâmetro do halo de inibição: + (0 – 0,9cm); ++ (1,0 – 1,9 cm); +++ (2,0 – 2,9 cm); ++++ (>3,0 cm).

Tabela 2. Efeito do tratamento de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) com isolados de bactérias sobre a emergência de plântulas, colonização e comprimento da raiz e da parte aérea.

Tratamentos	% plântulas emergentes	Colonização de raízes	Comprimento (cm)	
			Raiz	Parte Aérea
<i>Bacillus subtilis</i>	100	nc*	7,91 a**	7,62 a
<i>Bacillus subtilis</i> (AP03)	100	nc	7,43 a	7,25 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	72	nc	7,40 a	7,76 a
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>	90	nc	7,96 a	7,71 a
<i>Rhizobium</i> sp.	82	nc	7,87 a	7,75 a
Testemunha	100	nc	5,96 a	7,62 a

*nc – não visualização da colonização das raízes pelos tratamentos testados; **Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

REFERÊNCIAS

1. Avaci, A.B.; Coelho, S.R.M.; Nóbrega, L.H.P.; Rosa, D.M.; Christ, D. Qualidade fisiológica de sementes de feijão envelhecidas em condições de alta temperatura e umidade relativa. **Publicativo UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Agrária e Engenharias**, Ponta Grossa, v.16, n.1, p.33-38, 2010.
2. Behlau, F.; Nunes, L.M.; Leite JR., R.P. Meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo e sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.4, p.394-396, 2006.
3. Freitas, S.S.; Melo, A.M.T.; Donzeli, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.27, n.1, p.61-70, 2003.
4. Huang, H.C.; Erickson, R.S.; Hsieh, T.F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, Oxford, v.26, p.1055-1061, 2007.
5. Lanna Filho, R.; Ferro, H.M.; Pinho, R.S.C. (2010) Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
6. Lazzareti, E.; Bettiol, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, p.89-96, 1997.
7. Lucon, C.M.M.; Akamatsu, M.A.; Harakava, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.43, n.6, p.691-697, 2008.
8. Manjula, K.; Podile, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Hull, v.21, p.1057-1062, 2005.
9. Maringoni, A.C.; Rosa, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.23, p.160-162, 1997.
10. Martins, J.S.; Medeiros, F.H.V.; Souza, R.M.; Resende, M.L.V.; Ribeiro Júnior, P.M. Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, Orlando, v.66, p.65-71, 2013.
11. Queiroz, B.P.V.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Melo, I.S. Visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.95-97, 2006.
12. Rava, C.A.; Costa, J.G.C. Reação de cultivares de feijoeiro comum à Murcha-de-curtobacterium. In: Reunião Sul-Brasileira de Feijão, 5; Reunião Anual Paranaense de Feijão, 2001, Londrina **Anais**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2001. p.55-56.
13. Romero, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 417p.
14. Silva, J.R.C.; Souza, R.M.; Zaccarone, A.B.; Silva, L.H.C.P.; Castro, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.4, p.1062-1072, jul./ago. 2008.