Efeito antagonista de Bacillus subtilis e Bacillus amyloliquefaciens sobre o fungo Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Antagonistic effect of Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens on the fungus Fusarium oxysporum f. sp. cubense

COUTRIM, Ranyelly Leão[1]; MENDES, Hellenn Thallyta Alves e[1]; NOLASCO Danielle Suene de Jesus[1]; BARROS, Beatriz Lima[1]; ANJOS, Danilo Nogueira dos[2]; SÃO JOSE, Abel Rebouças[1]

[1]Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, nyellycoutrim@gmail.com; helen.talyta@hotmail.com; danielle_suene@hotmail.com; bbarrosagro@gmail.com; abeljose[3]@gmail.com; [2] Instituto Federal do Mato Grosso, danilo.anjos@cfs.ifmt.edu.br

Tema Gerador: Manejo de Agroecossistemas e Agricultura Orgânica

Resumo

O emprego de microrganismos para fins de controle biológico vem sendo amplamente estudado. Neste contexto, uso de espécies de *Bacillus* spp. como antagonistas de fitopatógenos, tem sido utilizado como alternativa no manejo integrado de doenças.

Objetivou-se com este trabalho, avaliar *in vitro* o efeito antagonista dos gêneros *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* ao *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. Transferiu-se um disco de 9mm do fitopatógeno para o centro da placa de Petri dividida em quatro quadrantes, onde cada um dos quadrantes recebeu uma gota do produto comercial à base de *Bacillus* spp. A medição do crescimento micelial do *Fusarium* foi realizada diariamente até o sétimo dia. Observou-se que o *Bacillus subtilis e o Bacillus amyloliquefaciens* inibem o crescimento do *Fusarium*, apresentando um percentual de inibição de 38,11% e 40,33%, respectivamente, demonstrando serem eficientes para o controle biológico.

Palavras-chave: Biocontrole; fusariose; banana.

Abstract

The use of microorganisms for biological control purposes has been widely studied. In this context, use of species of Baccillus spp. as antagonists of phytopathogens, has been used as integrated management of diseases.

The aim with this work, evaluate in vitro antagonistic effect of *Bacillus subtillis* and *Bacillus amyloliquefaciens* on *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*. He moved a 9 mm from the phytopathogenic fungus to the center of the Petri dish divided into four quadrants, where each of the quadrants received a drop of commercial product based on Bacillus spp. Measuring the mycelial growth of fusarium has been helddaily until the seventh day. It was observed that the *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* inhibit the growth of Fusarium, showing a percentage of inhibition of 38,11% and 40,33%, respectively, demonstrating be effective for biological control.

Keywords: Biocontrol; fusariose; banana.

Introdução

A banana é a fruta mais consumida no Brasil e é afetada por várias doenças que reduzem a produtividade da cultura. Entre as principais e mais destrutivas está o mal-do-Panamá causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense,* (Cordeiros e Matos, 2003).

Atualmente a população mundial tem exigido produtos mais saudáveis e livres de agroquímicos, aumentando assim a busca por uma agricultura mais biológica, auto-sustentável e limpa. Vários estudos com microrganismos promotores de crescimento vegetal tem sido realizado em cultivos agroecológicos. Dentre os microrganismos mais estudados se encontram as rizobactérias do gênero *Bacillus* que tem demonstrado grande potencial para uso como agentes de controle biológico (Petras e Casida,1985), pois se destacam por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismo antagônicos, possibilitando dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para as defesas dos fitopatógenos (Filho, 2010). Essas bactérias têm grande potencial de, juntamente com outros métodos de controle, compor excelentes pacotes tecnológicos para o controle fitopatógenos, especialmente em áreas de produção orgânica ou de utilização de controle biológico aplicado.

Assim, objetivou-se com presente trabalho, avaliar *in vitro* o efeito antagonista dos gêneros *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* sobre o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do Mal-do-panamá.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Biofábrica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista – Bahia.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos (*Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens* e Testemunha) e cinco repetições, composta por 3 placas de Petri cada, avaliados durante sete dias.

O *Bacillus subtilis* foi obtido a partir do produto comercial Serenade® que possui em sua composição *B. subtilis* linhagem QST 713, concentração mínima de 1 x 109 UFC/g de ativo, proveniente da empresa Bayer Cropscience. O *B. amyloliquefaciens* foi adquirido a partir do produto comercial Eficaz® da empresa Simbiose.

No teste de antagonismo do Bacillus spp. e *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, foi utilizado um disco de meio de cultura BDA de 9 mm de diâmetro, contendo micélio de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, foi transferido para o centro da placa de Petri (90 mm de diâmetro),

também contendo meio BDA. Esse Material foi incubado durante 24 h a 25ºC, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, quatro gotas de 50 µl do produto comercial contendo células bacterianas de *Bacillus* spp. foram dispostas equidistantes entre si e do centro da placa de Petri, uma gota em cada quadrante. Como testemunhas, usou-se o patógeno e os antagonistas cultivados isoladamente. As placas foram mantidas em incubadora, nas mesmas condições. As avaliações foram baseadas em medidas diárias do crescimento do diâmetro da colônia do patógeno, com o auxílio de um paquímetro digital, e verificação da formação de halo de inibição, Metodologia adaptada de (Sottero et al., 2006).

Para a validação do teste, foram adotadas duas escalas de notas: uma seguindo a escala de (Bell et al.,1982) que baseia-se na observação visual, atribuindo notas de 1 a 5, onde 1 – O agente de biocontrole cresce completamente sobre o patógeno cobrindo a superfície total do meio de cultura; 2 – O agente de biocontrole cresce sobre no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura; 3 – O agente de biocontrole e o patógeno colonizam aproximadamente metade da superfície do meio de cultura (mais do que 1/3 e menos que 2/3) e nenhum deles aparece dominando o outro; 4 – O patógeno coloniza no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura e aparece resistindo ao agente de biocontrole; 5 – O patógeno cresce completamente sobre o agente de biocontrole e ocupa a superfície total do meio de cultura. E outra seguindo a escala de Rodrigues (2010), que atribui notas variando de 1 a 7, onde 1 - Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno; 2 - Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobrepõe-se sobre o disco do patógeno; 3 – Antagonista cresce sobre 3/4 da placa; 4 – Antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 5 – Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa; 6 – Patógeno cresce sobre 2/3 da placa; 7 – Patógeno cresce por toda a placa de Petri., Foi utilizado um gabarito sob o fundo da placa no momento da avaliação, em que era possível visualizar as notas conforme crescimento das colônias.

Resultados e Discussão

Dados obtidos neste trabalho demonstram que os *Bacillus amyloliquefaciens e Bacillus subtilis* apresentam efeito antagônico ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento do Fusarium (CFUS) até o 7º dia e porcentagem de inibição micelial ao 7º dia (%INB7) do Fusarium oxysporum f. sp. cubense em cultivo pareado com Bacillus subtilis e Bacillus amyloliquefaciens in vitro.

TRATAMENTOS	CFUS1	CFUS2	CFUS3	CFUS 4	CFUS 5	CFUS6	CFUS7	% INB7
F. oxysporum f. sp. cubense	2,05 a	3,81 a	5,47 a	6,33 a	8,60 a	8,60 a	9,00 a	-
B.amyloliquefaciens	1,93 b	2,43 b	3,75 b	4,02 b	5,27 b	5,56 b	5,37 b	40,33 a
B. subtilis	1,94 b	2,45 b	3,88 b	4,21 b	5,48 b	5,79 b	5,57 b	38,11 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

De acordo com a Tabela 1, podemos observar que o *B. amyloliquefaciens e o B. subtilis* apresentam potencial de inibição do *Fusarium* similar ao longo dos dias de avaliação, diferindo-se estatisticamente da testemunha.

Ao observar a porcentagem de inibição do *Fusarium* ao 7º dia, percebemos que o *B. amyloliquefaciens* é estatisticamente superior ao *B. subtilis*, apresentando ao sétimo dia de avaliação, um percentual de inibição de 40,33% e 38,11%, respectivamente.

Bautista et al., 2016, estudando as diferentes estirpes do *Bacillus spp.* constataram que foram capazes de inibir o crescimento micelial *in vitro* dos patógenos: *Fusarium equiseti* e *F. solani*, isolados em *Capsium chinese*.

Segundo a escala de Bell et al., (1982) e de Rodrigues, (2010), os tratamentos testados apresentaram eficiência no controle do patógeno, sendo que confronto direto do *B. amyloliquefaciens* com o *Fusarium* foi estatisticamente maior que o B. subtilis e a testemunha pelas duas escalas de notas (Tabela 2).

Tabela 2. Médias das notas do teste de confrontação direta entre Bacillus subtilis e Bacillus amyloliquefaciens a Fusarium oxysporum f. sp. cubense utilizando a escala de Bell et al. e de Rodrigues ao 7º dia de avaliação.

Tratamentos	Bell	Rodrigues
B. amyloliquefaciens x *F. oxysporum* f. sp. *cubense*	2,13 a	1,79 a
B. subtilis x *F. oxysporum* f. sp. *cubense*	4,00 b	6,00 b
F. oxysporum f. sp. *cubense*	5,00c	7,00 c
CV(%)	**2,67**	**8,93**

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

De acordo com os Resultados, as duas escalas são eficientes para validação do teste de confrontação direta de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* contra isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* sendo que a escala de (Bell et al., 1982) apresentou coeficiente de variação menor do que a escala de (Rodrigues, 2010).

Esses estudos demonstraram que as bactérias do gênero *Bacillus* possuem potencial para serem utilizadas como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos na exploração comercial como alternativas de substituição ou redução dos insumos agrícolas (AMORIM, 2003)

Conclusão

Conclui-se com este trabalho que os *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* são capazes de controlar o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubens,* fungo causador do mal-do-Panamá, em cultivo pareado *in vitro,* demonstrando grande potencial para o controle biológico.

Referências

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes ambientais. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v.6, n.2, p.158-170, 2003.

BAUTISTA, M.A.M. et al. *Bacillus spp.* en el control de la Marchitez causada por *Fusarium* spp. em *Capsicum chinense*. Revista Mexicana de Fitopatología. 34:208-222, 2016.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, Cornell, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

CORDEIRO, Z.J. M; MATOS, A.P. Mal-do-Panamá: fim do bananal? Embrapa Mandioca e Fruticultura. Revista Cultivar HF. 28-30p, 2003.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M. P; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas: V.4 N.2, p.12, 2010.

PETRAS, S.F.;CASIDA, L.E.J. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 50. p.1496-1501, 1985.

RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*. 2010. 84 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

SOTTERO A. N. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.30, n.2, p.225-234, 2006.