Efeito Fungistático de *Bacillus* Spp. sobre Fungos Fitopatogênicos

Fungistatic effect of Bacillus spp. on plant pathogenic fungi

Angonese, MarciaToigo[1]; Della Giustina Júnior, Luis Henrique Paim[1]; Pansera, Marcia Regina[1]; Pagno, Roberta Soldatelli[1]; Mezzomo, Fabiane [1]; Zorzi, Elisa[1]; Pereira Carolina Oliveira Fialho[1]; Ribeiro, Rute Teresinha da Silva[1]. [1]Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas/Instituto de Biotecnologia/Universidade de Caxias do Sul. E-mail: mrpancer@ucs.br

Resumo

Em países de clima temperado como o Brasil, o controle fitossanitário da produção agrícola deve ser constante, porém o emprego de agrotóxicos polui o ambiente. Algumas espécies de *Bacillus* são antagonistas de fitopatógenos podendo ser usadas em programas de controle biológico. Os isolados FVI2, FRIIB2, FRIIB6 e FRIIB8 de *Bacillus* spp. foram avaliados em cultura dupla contra *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* spp**.** O efeito dos isolados de *Bacillus* spp. sobre o desenvolvimento dos fungos foi avaliado em meio BDA, inoculando-se um disco de 2 mm de meio colonizado de cada um dos fungos. Os isolados de *Bacillus* foram estabelecidos na forma de estrias a 1,5 cm de distância do fungo alvo. A avaliação do antagonismo ocorreu após oito dias. O isolado FVI2 determinou a maior inibição de crescimento para todos os fitopatógenos alvo e o isolado FRIIB2 apresentou os resultados de menor inibição de crescimento.

Palavras-chave: Bacillus spp.; Alternaria sp., Botrytis sp., Fusarium oxysporum, Colletotrichum sp.

Abstract

In temperate countries like Brazil, the control plant of agricultural production should be constant, but the use of agrochemicals pollutes the environment. Some species of Bacillus antagonists can be used in biological control. The isolates FVI2, FRIIB2, FRIIB6 and FRIIB8 of Bacillus spp. have been assessed in culture double against Alternaria spp., Botrytis spp., Fusarium oxysporum and Colletotrichum spp. The effect of Bacillus on the development of fungi was estimated: a disk 2mm colonized of each of fungi was established on center of Petri plates with BDA media and the bacteria were established in the form of ridges to 1.5 cm of distance from plant pathogen. The assessment of antagonism occurred after eight days. The isolate FVI2 determinate the best result for all plant pathogen target and the isolated FRIIB2 presented the results less inhibiting growth.

Keywords: *Bacillus* spp.; *Alternaria* sp.; *Botrytis* sp.,; *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* sp.

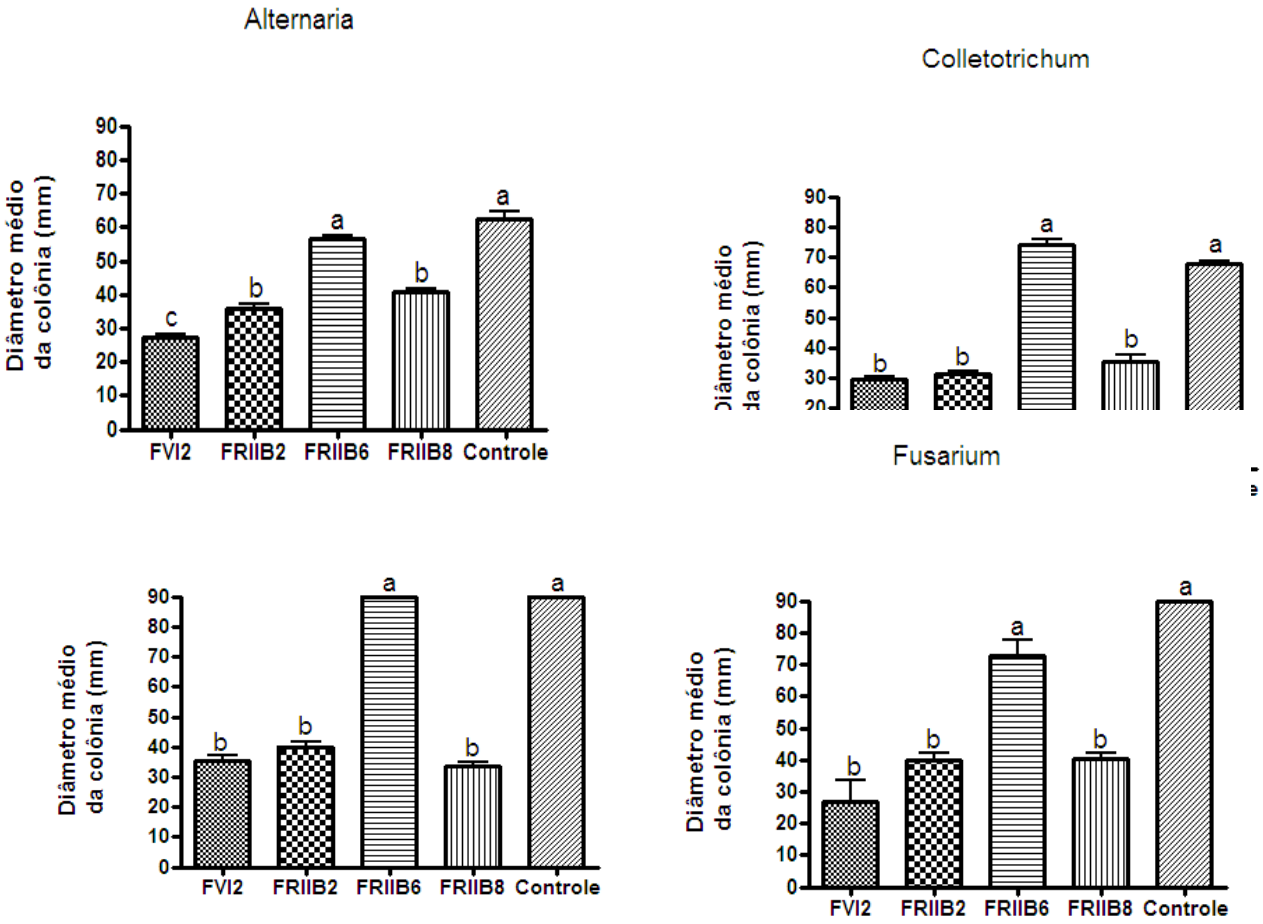
Introdução

A população mundial atualmente tem exigido produtos livres de agroquímicos, fazendo com que aumentem as pesquisas em programas de controle biológico. No controle biológico, a doença não é só a interação entre patógeno e hospedeiro, mas o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e uma série de microrganismos não patogênicos que também residem no sítio de infecção. Esses não patógenos podem limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro (BETTIOL e GHINI, 1995). O biocontrole pode ser alcançado através de práticas que favoreçam os antagonistas nativos ou através da introdução de microrganismos selecionados pelas suas propriedades antagonísticas. Bactérias do gênero *Bacillus* possuem grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico (PETRAS e CASIDA, 1985). Hang, et al. 2005 citaram que *Bacillus subtilis* S1-0210 foi utilizado como agente biocontrole de *Botrytis cinerea* em morangos. *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram positiva de solo, não patogênica, não colonizadora de tecidos, formadora de esporos e utilizada como modelo de estudo de bactérias gram-positivas. Bettiol (1988) demonstrou a atividade antagônica de *B.*

subtilis a *Pyricularia oryza* através da aplicação de isolados de *B. subtilis* em sementes e parte aérea, sugerindo o seu emprego e/ou de seus metabólitos para o controle de brusone do arroz.
Produtos formulados a partir de *Bacillus subtilis* vêm sendo utilizados, desde 1983 nos EUA para o tratamento de sementes de amendoim, entre outras culturas e contra vários fitopatógenos. Segundo Backman (1995), o isolado GB03 de *B. subtilis* foi utilizado para inoculação de mais de 2 milhões de hectares de diversas culturas em 1994. O produto hoje é comercializado tanto para proteção das raízes quanto para estimular o desenvolvimento das plantas. Por suas características, esse isolado de *B. subtilis* coloniza tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. (LAZZARETTI, 1997). O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito dos agentes isolados FVI2, FRIIB2, FRIIB6 e FRIIB8 de *Bacillus* spp. sobre crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* spp.

Metodologia
O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas da Universidade de Caxias do Sul. Como antagonistas foram utilizados quatro isolados de *Bacillus* spp.(FVI2, FRIIB2, FRIIB6 e FRIIB8) isolados do solo, e como fitopatógenos, os fungos *Alternaria* spp.P20/09*;*, *Botrytis* spp.996 , *Fusarium oxysporum* 120512 e *Colletotrichum* spp.011/09 isolados de frutos com sintomas de podridão pós-colheita. Todos os microrganismos pertencem a coleção de fungos da Universidade de Caxias do Sul. Para avaliação da potencialidade antagonística de *Bacillus* sp. foi utilizada a técnica do pareamento de colônias do patógeno e do controlador biológico: os isolados de *Bacillus* spp. foram inicialmente multiplicados em caldo nutriente por 36 horas (130rpm; 30° C) e imediatamente o conteúdo das culturas foi centrifugado e o precipitado reservado até o momento do uso. Os fitopatógenos foram desenvolvidos em meio BDA por sete dias, e a partir das colônias foi transferido um disco de 0,4 cm de diâmetro de Agar colonizado para o centro de uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro com meio BDA (Batata Dextrose Agar). Para *Bacillus* sp. foram feitos dois inóculos na forma de estria com auxílio de alça de platina a 1,5 cm de distância da borda da placa. No caso das testemunhas, transferiu-se para o centro das placas de Petri contendo meio BDA apenas o disco de 0,4 cm de ágar colonizado pelo patógeno. As placas foram incubadas em estufa BOD (28°C e fotoperíodo de 12 horas), e para cada fitopatógeno alvo foram feitas três repetições para cada isolado de *Bacillus*. A primeira avaliação foi feita 48 horas depois do estabelecimento dos microrganismos, pela medida do crescimento da colônia do fungo em direção da colônia bacteriana, e depois continuaram sendo realizadas a cada 24 horas, até a paralisação do crescimento dos fungos.
Os resultados foram submetidos à análise de variância e em caso de significância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussões
Os dados obtidos neste trabalho demonstram que os isolados FVI2, FVIIB2 e o VFIIB8 de *Bacillus* spp. avaliados, foram capazes de antagonizar a maioria dos fitopatógenos alvo, inibindo de forma O isolado FVI2 foi o melhor entre os três, mas sem diferença significativa. O isolado FVIIB6 não inibiu o desenvolvimento dos fungos.
Alguns autores como Wilson e Pusey (1984), constataram que isolados de diversas espécies de *Bacillus* são capazes de inibir o crescimento de alguns fitopatógenos. Segundo Stavely et al., (1981) e Baker et al., (1983), citados por Bettiol e Ghini (1995), a ação de *B. subtilis* ocorre sobre o crescimento micelial de fungos patogênicos, o que também foi observado neste trabalho. Foi observado por Bettiol e Kimati (1989, 1990) o potencial inibitório de *B. subtilis* sobre diversos fitopatógenos, entre eles *Rhyzoctonia solani* e *Fusarium moniliforme*. Foi observada também neste trabalho, a formação de uma área clara e transparente em torno das colônias dos isolados de *Bacillus* spp., com exceção do isolado FVIIB6. Esta zona clara pode ter sido determinada pela liberação de metabólitos pelos isolados de *Bacillus*, os quais podem ser os responsáveis pela inibição do crescimento dos fungos alvos.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

FIGURA 1. Efeito dos isolados dos *Bacillus* FVI2, FRIIB2, FRIIB6 e FRIIB8 sobre o crescimento micelial (diâmetro da colônia em mm) dos fungos fitopatogênicos *Alternaria* spp. P20/09;, *Botrytis* spp.996, *Fusarium oxysporum* 120512 e *Colletotrichum* spp.011/09.

Conclusões

Os resultados obtidos sugerem que os isolados de *Bacillus* avaliados ou moléculas liberadas por eles, têm potencial para serem utilizados em programas de controle biológico ou de manejo integrado de doenças de plantas.

Agradecimentos

Universidade de Caxias do Sul – UCS
Empresa Caxiense de Controle Biológico - ECCB

Referências

BACKMAN, P.A. Development and commercialization of *Bacillus subtilis* (GBO3) as a rhizosphere inoculant. European Journal of Plant Pathology. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 13., 1995, The Hague. *Abstracts*… Kluwer Academic, 1995. Abstract 27.

BAKER, C.J. et al. Inhibitory effect of Bacillus subtilis on Uromyces phaseoli and development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology,* Saint Paul, v. 73, n. 8, p. 1148-1152, 1983.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagônicos à Pyricularia oryzar para o controle de Brusone do arroz. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 15, n. 3/4, p. 257-266,1989.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de Bacillus subtilis sobre Pyricularia oryzae agente causal da Brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 25, n.8, p. 1165-1174,1990.

BETTIOL, W. *Seleção de microrganismos antagônicos a P. oryzae para o controle da Brusone do arroz* (*Oryza sativa L*.) Piracicaba.1988. 140 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo. São Paulo. 1988.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. *Manual de Fitopatologia.* Princípios e Conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.

HANG, N.T.T.; OH, S.; KIM, G.H.; HUR, J. KOH, Y.J. Bacillus subtilis S1-0210 as a Biocontrol Agent against Botrytis cinerea in Strawberries. *The Plant pathology Journal*, Bari, v. 21, n. 1, p. 59-63, 2005.

LAZZARETTI, E.; W. BETTIOL Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um

produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia. agricola*, Piracicaba, v. 54, n. 1-2, p. 89-96, 1997.
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.

STAVELY, J.R. ; THOMAS, C.A.; BAKER, C.J.; MACFALL, J.S. Greenhouse control of bean rust with *B. subtilis. Phytopathology,* Palo Alto, v. 71, p. 95-99, 1981.

WILSON, C.L.; PUSEY, P.L. Post harvest biological control of stone fruit brown rot by *B. Subtilis. Plant Disease*, St. Paul, v. 68, n .9, p.753-756,1984.