

11903 - Avaliação *in vitro* do antagonismo de *Bacillus* spp. a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Evaluation of in vitro antagonism of Bacillus to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici.

OLIVEIRA, Leonardo de Jesus Machado Gois de¹; SILVA, Mônica Shirley Brasil dos Santos²; LIMA, Odenilson de Deus Ribeiro³; ROCHA, Elys Regina Carvalho⁴; SANTOS, Leandro Victor Silva⁵; RODRIGUES, Antonia Alice Costa⁶.

1 UEMA, leonnardo_jesus@hotmail.com; 2 UEMA, shirleybrasil.85@hotmail.com; 3 UEMA, denis_rlima@hotmail.com; 4 UEMA, syle_regina@hotmail.com; 5 UEMA, leandrovictor_santos@gmail.com; 6 UEMA, alicecosta@cca.uema.br

Resumo: O presente trabalho objetivou o biocontrole da fusariose do tomateiro através da utilização de *Bacillus* spp. Foram utilizados dez isolados de *Bacillus* spp. cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 48 horas e o isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado em meio de cultura BDA por sete dias. Transferiu-se um disco de 6,0 mm do fitopatógeno para o centro da placa de Petri e nos bordos a bactéria formando um círculo de 5,0 cm de diâmetro. A avaliação foi efetuada no décimo dia, através da mensuração de diâmetros das colônias e as médias obtidas foram comparadas às da testemunha obtendo assim a porcentagem de inibição do crescimento micelial. O percentual de inibição dos isolados frente ao patógeno foram: B12 (*Bacillus* sp.) 49,5%, B41 (*B. cereus*) 46,92%, B22' (*B. pentothenicus*) 43,5%, B45 (*B. cereus*) 42,43%, B47 (*B. cereus*) 41,41%, B25 (*B. pumilus*) 38,6%, B22 (*B. polymyxa*) 17,82%, B16 (*B. macerans*) 15,38%, B40 (*Bacillus* sp.) 14,1% e B35 (*B. pumilus*) 11,53%.

Palavras-Chave: *Bacillus* spp., fusariose, biocontrole.

Abstract: This work aimed at biocontrol of fusarium wilt of tomato through the use of *Bacillus* spp. We used ten isolates of *Bacillus* spp. grown on PDA medium (Potato Dextrose Agar) for 48 hours and isolated from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* grown on PDA culture medium for seven days. Transferred to a 6.0 mm disc of the pathogen to the center of the Petri dish and the bacteria on the lips forming a circle 5.0 cm in diameter. The evaluation was performed on the tenth day, by measuring the diameters of the colonies and the averages were compared to the control thereby obtaining the percentage of inhibition of mycelial growth. The percentage of inhibition against the isolated pathogens were: B12 (*Bacillus* sp.) 49.5%, B41 (*B. cereus*) 46.92% B22 '(*B. pentothenicus*) 43.5%, B45 (*B. cereus*) 42.43%, B47 (*B. cereus*) 41.41%, B25 (*B. pumilus*) 38.6%, B22 (*B. polymyxa*) 17.82%, B16 (*B. macerans*) 15.38% , B40 (*Bacillus* sp.) 14.1% and B35 (*B. pumilus*) 11.53%.

Key-Words: *Bacillus* spp. , Fusariosis, biocontrol.

Introdução

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) é afetada por diversas doenças de importância econômica, que podem ser de origem bacteriana, fúngica, virótica ou causada por nematóides. Dentre as doenças mais preocupantes estão aquelas causadas por fungos que atacam as plantas a partir do sistema radicular, destacando-se a fusariose causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder; Hansen.

A ausência de especificidade e os riscos para a saúde humana e para o ambiente apresentados pelos defensivos agrícolas sintéticos acentuam a necessidade de ferramentas como o controle biológico na otimização dos sistemas de agricultura sustentável. Bactérias do gênero *Bacillus* possuem grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico, pois mantêm sua viabilidade quando estocadas por longos períodos (PETRAS; CASIDA, 1985).

O Controle Biológico visa manter, através de certas práticas, um equilíbrio no ecossistema, de modo que o hospedeiro na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema. Em uma cultura que demanda grandes investimentos fitossanitários, com número de aplicações de fungicida de contato em dez ou mais vezes durante seu ciclo, o estudo de medidas de controle alternativo torna-se justificável uma vez que as medidas de controle cultural e químico são pouco efetivos e extremamente onerosos para o produtor maranhense. Assim, o presente trabalho objetivou o biocontrole da fusariose do tomateiro através da utilização de *Bacillus spp.*

Metodologia

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís, MA.

Isolados de *Bacillus spp.* e *F. oxysporum f. sp. lycopersici* foram obtidos da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UEMA (Tabela 1). Sendo transferido para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), que posteriormente foi repicado e transferido para tubos de ensaio para conservação de culturas puras.

Tabela 1. Isolados de *Bacillus spp.* e do desafiante *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* utilizados no experimento *in vitro*.

ISOLADOS	ESPÉCIES
B12	<i>Bacillus sp.</i>
B41	<i>Bacillus cereus</i>
B22'	<i>Bacillus pentothenicus</i>
B45	<i>Bacillus cereus</i>
B47	<i>Bacillus cereus</i>
B25	<i>Bacillus pumilus</i>
B35	<i>Bacillus pumilus</i>
B40	<i>Bacillus sp.</i>
B16	<i>Bacillus macerans</i>
B22	<i>Bacillus polymyxa</i>
Fol – MA	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>

Para o estudo do efeito antagonista de *Bacillus spp.* x *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, foi utilizado o experimento *in vitro* do Método do Círculo. Inicialmente, os isolados de *Bacillus spp.* e o isolado de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 24 – 48 horas e 7 (sete) dias, respectivamente, em seguida transferiu-se assepticamente para placas de Petri com 9cm de diâmetro contendo

meio de cultura BDA, um disco de 6,0 mm de diâmetro do fitopatógeno, colocando-os no centro da placa e nesta mesma placa através de uma alça de platina inoculou-se a bactéria nos bordos do meio de cultura formando um círculo com diâmetro menor que a placa, aproximadamente 5 cm (MARIANO, 1993). Para o tratamento controle ou testemunha constou-se do fitopatógeno cultivado em meio BDA.

A avaliação foi efetuada durante dez dias, pela inibição do crescimento micelial, para isso foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e cinco repetições.

A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula de (P.I.C) (MENTEN et al., 1976), onde:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento baseado no método do círculo através do antagonismo de 10 isolados de *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aos 10 dias observou-se que todos mostraram efeito inibidor ao patógeno avaliado, ou seja, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* pelo método do círculo por isolados de *Bacillus* spp. São Luís, 2011.

Tratamento	Diâmetro da colônia (cm)	% da inibição
B45	4,49 cd	42,43
B35	6,90 b	11,53
B40	6,70 b	14,10
B41	4,14 cd	46,92
B47	4,57 cd	41,41
B16	6,60 b	15,38
B22	6,41 b	17,82
B22'	4,41 cd	43,5
B12	3,94 d	49,5
B25	4,79 c	38,6
Testemunha	7,80 a	-

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% (p<0,5) de significância. CV(%) = 6,64. T= testemunha; B45, B41, B47= *B. cereus*; B35, B25= *B. pumilus*; B16= *B. macerans*; B22= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenticus*; B12= *Bacillus* spp.; B40= *Bacillus* sp.

Destaque especial aos isolados B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*Bacillus. cereus*), B22' (*Bacillus pentothenticus*), B45 (*Bacillus cereus*), B47 (*Bacillus cereus*) e B25 (*Bacillus pumilus*) que apresentaram as menores médias de diâmetro da colônia. Os isolados B35 (*Bacillus pumilus*), B40 (*Bacillus* sp.), B16 (*Bacillus macerans*), B22 (*Bacillus polymyxa*) diferiram estatisticamente da testemunha, porém apresentaram as maiores médias de crescimento micelial em relação aos demais tratamentos.

Grande parte dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua através de antibiose, onde ocorre a interação entre organismos, um metabólito produzido por um deles tem um efeito prejudicial sobre o outro. O gênero *Bacillus* tem sido descrito por vários autores como biocontrolador de doenças de plantas. Nascimento (2009) no ensaio com dezoito isolados de *Bacillus* spp., no controle do crescimento micelial de *Pyricularia grisea*, observou que quinze promoveram maior inibição do crescimento micelial aos quatorze dias após o tratamento com destaque para os isolados B41 (*B. cereus*), B33 (*B. polymyxa*), BSB1 (*B. lentus*), B6 (*Bacillus* sp.), B31 (*B. pumilus*).

Shiomi (2007) observando o antagonismo de bactérias endofíticas do milho e incluindo outros isolados obtidos de estudos anteriores como *B. subtilis* OG, *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp. aos fungos de solo *Phytium aphanidermatum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, e o fungo foliar *Exerohilum turcicum* constatou que de forma geral todos os isolados selecionados apresentaram atividade antagônica aos patógenos desafiados com destaque as bactérias endofíticas *Bacillus subtilis* OG e *Bacillus lentimorbus*.

O percentual de inibição do crescimento micelial (P.I.C) ao *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* chegou a 49,5% pelo isolado B12 (*Bacillus* sp.), 46,92% pelo isolado B41 (*B. cereus*), 43,5 % pelo isolado B22' (*B. pentothenicus*), 42,43 % do isolado B45 (*B. cereus*), 41,41 % pelo isolado B47 (*B. cereus*), 38,6 % pelo B25 (*B. pumilus*) em contrapartida os isolados B22 (*B. polymyxa*), B16 (*B. macerans*), B40 (*Bacillus* sp.) e B35 (*B. pumilus*) apresentaram P.I.C abaixo de 20%. Assim, Melo (2005) em ensaio no laboratório com bactérias endofíticas de mandioca frente ao *Phytium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* a fim de escolher as melhores linhagens de bactéria concluiu que desta avaliação 3 bactérias endofíticas apresentaram melhor atividade antagônica são elas *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. antracis*. Estes resultados corroboram com os desta pesquisa, pois as espécies de *B. pumilus* e *B. cereus* presentes neste experimento também apresentaram atividade antagônica.

Bibliografia Citada

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.1, p. 369-409, 1993.

MELO, F.M.P. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005, 84p.

MENTEN, J.OM.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophominia Phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

NASCIMENTO, I. O. Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole de fitopatógenos do arroz. **Dissertação** (Mestrado em Agroecologia) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2009. 109p.

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.

SHIOMI, H.F. Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras de crescimento de plantas de milho (*Zea mays*). **Tese** (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu- SP, 2007, 57p.