

Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. sobre os fungos fitopatogênicos: *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium graminearum*

Silas M. Alves¹; Mayara Barbosa Silva¹; Antoni Wallace Marcos¹; Eduardo Augusto Paschoal Capucho¹; André Sarabia Zamarian¹; Alison Fernando Nogueira¹; Aida Satie Suzuki Fukuji¹; Karoline Barbosa Pontes¹; Leandro S. A. Gonçalves¹.
***silasmian@hotmail.com**

¹Universidade Estadual de Londrina - Departamento de Agronomia - Laboratório de Ecofisiologia e Biotecnologia Agrícola, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, CEP 86.057-970, Londrina, PR, Brasil;

Resumo

O gênero de bactérias *Bacillus* spp. é descrito como um dos principais grupos de microrganismos que apresenta ação antagonista a diversos patógenos. *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium graminearum* estão entre os principais fungos que causam danos a cultura da soja, podendo levar as plantas a morte. Cada vez mais o controle biológico mediado por bactérias vem crescendo no Brasil, pois a intensa utilização de produtos agroquímicos tem causado desequilíbrio no agroecossistema. Assim, objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antagonística de isolados de *Bacillus* spp. sobre os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium graminearum*. A atividade antifúngica das cepas bacterianas, foi determinada pela inoculação destas em meio de ágar dygs por 24 horas, Em seguida, recortou-se 1 cm de ágar com uma lâmina estéril colocada de cabeça para baixo na superfície da placa de Petri BDA previamente espalhada com o micélio fúngico de *S. sclerotiorum* e *F. graminearum*. Após 5 dias foi medido o halo de inibição das bactérias que apresentaram antagonismo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 240 tratamentos (isolados bacterianos) e 3 repetições. Dos 120 isolados, 27 apresentaram antagonismo para *F. graminearum*, e dentre estes 12 apresentaram antagonismo para *S. sclerotiorum*. Os isolados (UEL 33, UEL 37, UEL 48) foram os mais promissores, pois apresentaram alta atividade antagonística para os dois fungos.

Palavras-chave: [*Glycine max* (L.) Merrill]; Soja; Controle biológico; rizobactérias.

Introdução

O gênero *Bacillus* spp. pertence à família *bacillaceae*, no qual as espécies deste grupo apresentam formato de bastonete, são grã-positivas, produzem esporos e podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas. Cada bactéria produz apenas um esporo, sendo resistente ao frio, calor e radiação. As bactérias deste gênero apresentam várias habilidades fisiológicas, que lhes permitem viver em diversos habitats, incluindo os extremos, como areia do deserto, nascentes de água quente e solos do Ártico (CAWOY et al, 2011).

O gênero é descrito como um dos principais grupos microbianos com capacidade de agir no controle de doenças, por meio da síntese de metabólitos secundários, que, em geral, apresenta ampla gama de inibição às diversas espécies de fitopatógenos (BORRIS, 2015). Várias espécies de *Bacillus* spp., como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* e *B. pumilus* são conhecidos como produtores muito eficientes de moléculas antibióticas (STEIN, 2005).

Sclerotinia sclerotiorum e *Fusarium graminearum* estão entre os principais fungos fitopatogênicos habitantes de solo que incidem na cultura da soja. O primeiro, ocorre de maneira severa em muitas regiões produtoras de soja e é de difícil controle, visto que o fungo apresenta mais de 400 espécies hospedeiras, além de produzir estruturas de resistência. A morte de fusarium pode ocorrer na fase inicial da cultura e na fase de reprodução e, com o progresso da doença as folhas das plantas apresentam amarelecimento, que evolui até a morte da planta (ITO, 2013).

Dentre as formas de controle de doenças causadas por fungos na cultura da soja o químico é o mais utilizado, porém a cada ano o controle biológico mediado por bactérias vem crescendo no Brasil, pois a intensa utilização de produtos agroquímicos tem causado desequilíbrio no agroecossistema, ocorrendo a seleção de pragas e doenças resistentes e em altas populações (CARMO et al., 2009).

Assim, este trabalho objetivou avaliar a atividade antagonística de isolados de *Bacillus* spp extraídos da rizosfera de cultivares de soja, sobre os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium graminearum*.

Material e métodos

Os isolados de *Bacillus* spp. utilizados são provenientes da coleção de bactérias do Laboratório de Ecofisiologia e biotecnologia agrícola (LEBA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Estes foram isolados da rizosfera de cultivares de soja resistentes e suscetíveis ao nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* e identificados como *Bacillus* spp. pelo sequenciamento da região 16s.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 240 tratamentos (isolados de *Bacillus* spp. + *Sclerotinia sclerotiorum* / *Fusarium graminearum*) com 3 repetições. As cepas bacterianas foram inoculadas em meio de ágar dygs e incubadas a 28° C por 24 h. Em seguida, recortou-se 1 cm de ágar com uma lâmina estéril colocada de cabeça para baixo na superfície da placa de Petri BDA previamente espalhada com o micélio fúngico de *S. sclerotiorum* / *F. graminearum* (em placas separadas), cultivados durante 4-5 em meio BDA. As placas foram incubadas a 28 °C durante 4-5 dias. Os isolados bacterianos foram classificados de acordo com o tamanho do halo de repelência aos fungos, sendo assim classificados: (") sem produção, sem halo; (+) baixa produção, halo até 2 mm; (++) produção média, halo de 2 a 4 mm; (+++) alta produção, > 4 mm.

Resultados e discussão

Dos 120 isolados apenas 27 (18,62%) apresentaram atividade antagonística. Dentre estes, 27 (18,62%) apresentaram antagonismo positivo para *F. graminearum* e 12 (1,74%) para *S. sclerotiorum*. (Tabela 1). Prachar, Kapoor e Sachdeva (2013) realizaram teste de antagonismo para *Fusarium oxysporum* com 56 isolados de rizobacterias, e destas, 10 apresentaram atividade antagonística contra o fungo, sendo que o isolado com maior atividade foi identificado como *Bacillus subtilis* após o sequenciamento da região 16s. Zaim, Belabid e Bellahcene (2013) isolaram 132 rizobacterias de diferentes ambientes e realizaram teste de antagonismo para *Fusarium oxysporum*, no qual 29 dos isolados testados inibiram mais de 20% do desenvolvimento do fungo. Shiomi e De Melo (2017) extraíram isolados bacterianos por meio da digestão de um biofertilizante, e realizou testes de antagonismo *in vitro* para *S. sclerotiorum*, no qual 4 destes apresentaram atividade antagonística, sendo 2 deles

pertencentes ao gênero *Bacillus*. Assim, este estudo reforça o potencial antagonístico das rizobactérias, principalmente do gênero *Bacillus* spp sobre estes gêneros de fungos, .

Neste trabalho, 8 dos isolados (UEL 58, 111, 169, 13, 48, 37, 31 e 33) inibiram o crescimento dos dois fungos entomopatogênicos, podendo serem considerados isolados de alto potencial biotecnológico. Os isolados (UEL 33, UEL 37, UEL 48) apresentaram alta formação de alo para os dois fungos utilizados.

Existem muitas bactérias que produzem substâncias capazes de inibir o crescimento de fungos entomopatogênicos, como foi possível verificar nesse trabalho. Diversos autores tem estudado a quitinase produzida por bactérias e verificaram que essa substância é capaz de inibir o crescimento in vitro de *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* (Hoster et al., 2005). Brzezinska e Jankiewicz (2012) verificaram que a quitinase produzida por 13 diferentes bactérias degradadoras de quitina pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* apresentaram significativa atividade antifúngica.

Tabela 1. Atividade antagônica in vitro de isolados bacterianos endofíticos da soja contra os patógenos da soja *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium graminearum*.

ID	<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	<i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i>
UEL 49	+++	-
UEL 75	+++	-
UEL 97	+	-
UEL 90	++	-
UEL 58	-	++
UEL 111	+++	+
UEL 02	++	-
UEL 121	+++	-
UEL 12	++	-
UEL 11	+++	-
UEL 169	-	+++
UEL 163	++	-
UEL 132	-	+++
UEL 13	+	+
UEL 44	+	-
UEL 142	++	-
UEL 8	+++	-
UEL 48	+++	+++

UEL 29	+++	-
UEL 148	++	-
UEL 91	++	-
UEL 52	-	+++
UEL 89	+++	-
UEL 165	++	-
UEL 31	+++	++
UEL 01	+	-
UEL 37	+++	+++
UEL 168	+++	+
UEL 81	++	-
UEL 33	+++	+++

* Medidas de halo: a) Sem Halo ou sem atividade(-); (+) halo pequeno (1 - 2 mm), pouca atividade; (++)halo médio (3 -4 mm), atividade mediana; (+++) (<4mm), alta atividade.

Conclusão

Os isolados (UEL 33, UEL 37, UEL 48) apresentaram efetivo controle dos fungos, sendo assim são promissores para serem utilizados no desenvolvimento de bioproduto. Contudo, os isolados precisam serem testados em experimentos em casa de vegetação e campo.

Referências

- BORRIS, Rainer. Bacillus, a plant-beneficial bacterium. In: **Principles of plant-microbe interactions**. Springer, Cham, 2015. p. 379-391.
- BRZEZINSKA, M.S. AND JANKIEWICZ, U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Curr Microbiol** . v.65, p.666–672.2012.
- CARMO, E. L. D., BUENO, A. D. F., BUENO, R. C. O. D. F., VIEIRA, S. S., GOBBI, A. L., & Vasco, F. R. (2009). Seletividade de diferentes agrotóxicos usados na cultura da soja ao parasitoide de ovos *Telenomus remus*. **Ciência Rural**, 39(8), 2293-2300.
- CAWOY, Hélène et al. Bacillus-based biological control of plant diseases. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2011.
- HOSTER, F., SCHMITZ, J.E. AND DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Appl Microbiol Biotechnol**, 66, 434–442.2005.

ITO, Margarida Fumiko. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, 2013, 10.3.

PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Isolation and Characterization of Bacillus sp with In-vitro Antagonistic Activity against Fusarium oxysporum from Rhizosphere of Tomato. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2013, 15.7: 1501-1512.

SHIOMI, H. F.; DE MELO, I. S. Bioprospecção de isolados bacterianos para o controle biológico do mofo branco na soja. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

STEIN, Torsten. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

ZAIM, Souad; BELABID, Lakhdar; BELLAHCENE, Miloud. Biocontrol of chickpea Fusarium wilt by Bacillus spp. rhizobacteria. **Journal of plant protection research**, 2013, 53.2.