

Efeito de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp. no crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*

Mylenna Nádja Ferreira de Sá^{a*}, Jéssica de Souza Lima^b, Fábio Nascimento de Jesus^b, Jane Oliveira Perez^b, Carlos Alberto Tuão Gava^c

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Petrolina, 56302-970, Pernambuco, Brasil.
mylennadajfs@gmail.com

^b Instituto Federal do Sertão Pernambucano Petrolina Zona Rural, Petrolina, 56302-970, Pernambuco, Brasil.

^c Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Semiárido, Petrolina, 56302-970, Pernambuco, Brasil.

Recebido: 25 setembro 2018 / Aceito: 28 novembro 2018 / Publicado online: 27 maio 2019

Resumo

Esta pesquisa teve como objetivo, avaliar o efeito antagonístico de isolados bacterianos do gênero *Bacillus* sp. e do fungo *Trichoderma* sp. sobre o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*, agente causador da podridão de esclerócio em plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). O ensaio foi conduzido utilizando a técnica de pareamento de culturas. O patógeno foi obtido pelo isolamento de plantas de feijão-caupi com sintomas da doença. Os antagonistas utilizados foram: *Bacillus subtilis* (LCB 30), *B. subtilis* (LCB 45), *Bacillus* sp. (BMH), *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio de cultivo BDA (Batata, Dextrose e Ágar) apresentava-se colonizada pelo *S. rolfsii* no tratamento testemunha (patógeno cultivado na ausência do antagonista). Para as análises foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os isolados *B. subtilis* (LCB30), *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp. são capazes de inibir o crescimento micelial do fungo *S. rolfsii*, reduzindo a colônia fúngica em 53,77%, 29,22% e 34,00%, respectivamente, sendo que os isolados *B. subtilis* (LCB45) e *Bacillus* sp. (BMH), inibiram 13,55% e 21,55% do crescimento de *S. rolfsii*, respectivamente, não diferindo estatisticamente da testemunha.

Palavras-chave: Microrganismo antagonista, controle biológico, fitopatógeno.

Effect of *Bacillus* sp. and *Trichoderma* sp. in Micelial Growth of *Sclerotium rolfsii*

Abstract

This research aimed to evaluate the antagonistic effect of bacterial isolates of the genus *Bacillus* sp. and the fungus *Trichoderma* sp. on the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii*, causal agent of sclerotia rot in plants *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (cowpea). The assay was conducted using the crop pairing technique. The pathogen was obtained by the isolation of *V. unguiculata* (L.) Walp. with symptoms of the disease. The antagonists used were: *Bacillus subtilis* (LCB 30), *B. subtilis* (LCB 45), *Bacillus* sp. (BMH), *Bacillus* sp. (INV) and *Trichoderma* sp. Evaluations of mycelial growth were made when the entire surface of the culture medium was presented BDA-colonized by *S. rolfsii* in the treatment control (pathogen grown in the absence of antagonist). For the analyzes, a completely randomized design with five replications was used. The isolates *B. subtilis* (LCB30), *Bacillus* sp. (INV) and *Trichoderma* sp. They are capable of inhibiting fungus mycelial growth of *S. rolfsii* by reducing the fungal colony on 53.77%, 29.22% and 34.00%, respectively, with isolated *B. subtilis* (LCB45) and *Bacillus* sp. (BMH), inhibited 13.55% and 21.55% growth *S.rolfsii*, respectively, did not differ statistically from the control.

Keywords: Antagonist microorganism, biology control, phytopathogen.

Introdução

A O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma das principais culturas exploradas pelos pequenos agricultores nas áreas semiáridas do Nordeste do Brasil. Seu cultivo tem representado fundamental importância econômica, social e alimentar (Coutinho, P.W.R., Silva, de D.M.S., Saldanha, E.C.M., Okumura, R.S. & Silva Júnior, M.L. da. 2014). A produção brasileira de feijão-caupi para o ano agrícola 2016/2017 foi de 725,3 mil toneladas de grãos (CONAB,

2017), figurando assim entre os três maiores produtores mundiais.

Esta leguminosa possui boa adaptação as condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro, mas os cultivos de feijão-caupi têm apresentado baixa produtividade no sistema de produção familiar. Vários são os fatores, dentre eles a ocorrência de doenças (Assunção *et al.*, 2011). O fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. é um importante fitopatógeno habitante do solo, agente causal da murcha ou podridão de

esclerócio.

Em plantas atacadas por *S. rolfsii*, normalmente são observados sintomas de murcha e amarelecimento de folhas, devido aos danos causados na região do colo da planta hospedeira, geralmente causando a morte de plantas encontradas em estágios iniciais de crescimento (Singh & Sarma, 2009). O controle de *S. rolfsii* é extremamente difícil pela sua capacidade de sobrevivência no solo e pela ampla gama de hospedeiros. O controle químico não é usualmente econômico e tecnicamente viável, além de apresentar uma série de restrições do ponto de vista ambiental (Silva *et al.*, 2014).

Neste contexto, o controle biológico tem-se apresentado como alternativa promissora e viável para o manejo da podridão de esclerócio (Sousa & Blum, 2013; Isaías, C.O., Martins, I., Silva, J.B.T., Silva, J.P. & Mello, S.C.M., 2014). A maioria dos relatos científicos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças em plantas citam fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* como dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (Lanna Filho, R., Ferro, H.M. & de Pinho, R.S.C., 2010; Remuska & Pria, 2007).

Esta pesquisa teve como objetivo, avaliar o efeito antagonístico de isolados bacterianos do gênero *Bacillus* sp. e do fungo *Trichoderma* sp. sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii*, agente causador da podridão de esclerócio em plantas de feijão-caupi (*V. unguiculata*).

Material e Métodos

O isolado de *S. rolfsii* foi obtido pelo isolamento de plantas de feijão-caupi com sintomas da doença. Os antagonistas utilizados foram oriundos da coleção de micro-organismos do laboratório de controle biológico da Embrapa Semiárido, Petrolina, Pernambuco, sendo eles: *B. subtilis* (LCB 30), *B. subtilis* (LCB 45), *Bacillus* sp. (BMH), *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp.

Para o início dos experimentos *in vitro* o patógeno foi mantido em meio de cultura BDA (Batata, dextrose e ágar) por três dias de incubação, em câmara de crescimento tipo BOD (à temperatura de 26 ± 2 °C. De modo similar, o *Trichoderma* sp. foi mantido em meio de cultivo BDA por 10 dias e, as bactérias foram acondicionadas em meio de cultivo NA (Ágar nutriente) por 48 horas.

O ensaio foi conduzido utilizando a técnica de pareamento de culturas (Dennis & Webster, 1971). Foram utilizadas placas de Petri com 9 cm de diâmetro, e meio de cultivo BDA. O teste foi composto por um total de 5 tratamentos (antagonistas) e a testemunha (patógeno cultivado na ausência do antagonista), com quintuplicatas.

As suspensões bacterianas foram preparadas com a adição de 20 mL de solução salina (0,85%) em cada placa contendo a bactéria e com o auxílio da alça de Drigalski as colônias foram desprendidas e obtida a suspensão que, posteriormente, foi utilizada para submersão de discos de papel de filtro (5 mm) que foram colocados com auxílio de uma pinça nas placas de Petri com BDA a uma distância de 1,0 cm da borda.

Em seguida, discos de 5 mm contendo meio de cultura com colônias do fitopatógeno *S. rolfsii* foram colocados no centro das placas. O preparo do fungo *Trichoderma* sp. para

introdução nas placas foi o mesmo, com o auxílio de uma alça inoculadora foram retirados os discos e postos nas placas com BDA. As placas foram incubadas em BOD a 26 ± 2 °C.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio se apresentava colonizada pelo *S. rolfsii* no tratamento testemunha. As medidas de diâmetro foram feitas com o auxílio de uma régua, medindo-se o diâmetro da área de crescimento micelial em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, com significância de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2010).

Resultados e Discussão

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), o isolado de *B. subtilis* (LCB 30) reportou melhor atividade antagonística, se destacando como o isolado mais eficiente contra o *S. rolfsii*. Segundo Lanna Filho *et al.* (2010), bactérias antagonísticas, como *B. subtilis*, de modo geral agem significativamente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição, e seus isolados produzem uma grande variedade de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina.

Tabela 1. Crescimento micelial (cm) de colônias de *Sclerotium rolfsii* em função da ação inibitória de diferentes micro-organismos antagonistas em meio BDA.

Microrganismo antagonista	Diâmetro da colônia de <i>S. rolfsii</i> (cm)
<i>Bacillus</i> sp. BMH	7,0±0,8c
<i>B. subtilis</i> LCB 30	4,1±1,9a
<i>B. subtilis</i> LCB 45	7,8±0,1c
<i>Bacillus</i> sp. INV	6,4±1,7b
<i>Trichoderma</i> sp.	5,9±1,4b
Testemunha	9,0±0,0c

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5%, em cinco repetições.

Verificou-se que aos isolados *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp. mostraram desempenho semelhante estatisticamente, com ação inibitória de 29,2% e 34,0%, respectivamente. Conforme Mariano *et al.* (2005) o fungo do gênero *Trichoderma* é um dos mais importantes agentes utilizados no controle de doenças radiculares de plantas. Outros trabalhos também demonstram a ação do gênero *Trichoderma* contra *S. rolfsii* em feijão (Auler, A.C.V., Carvalho, D.D.C. & Mello, S.C.M., 2013). Como exemplo, Isaías *et al.* (2014) avaliando a ação antagonística e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra *S. rolfsii*, verificaram que a maioria dos isolados testados exibiu efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii* se destacando o isolado *Trichoderma harzianum* que inibiu totalmente o crescimento do patógeno.

Quanto aos isolados *Bacillus* sp. (BMH) e *Bacillus* sp. (LCB 45) foi observado que seus efeitos sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii* não diferiram estatisticamente do resultado obtido pelo tratamento testemunha.

Estudos realizados por Maciel *et al.* (2012), relataram ação

in vitro e in vivo do antagonista *Trichoderma* spp. (Trichodel®) sobre o patógeno *Cylindrocladium candelabrum*, causador de danos a *Eucalyptus saligna*. Assim como Morsy et al. (2009), que utilizou *B. subtilis* no controle de *Fusarium solani* em *Lycopersicon esculentum* L. (tomate).

Diferentes isolados de *Trichoderma* e *B. subtilis* utilizados por Bontempo (2016), reduziram mais de 80% da germinação de esclerócios de *Sclerotium cepivorum* a 16° C. Além da ação antifúngica, bactérias da espécie *B. subtilis* também são eficientes na redução do número de juvenis e no desenvolvimento de massas de ovos de *Meloidogyne* sp. em raízes de tomateiro (Araújo, F.F. de. & Marchesi, 2009).

Conclusões

Nas condições em que o estudo foi realizado, os isolados *B. subtilis* (LCB30), *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp. são capazes de inibir o crescimento micelial do fungo *S. rolfii*, sendo que o isolado *B. subtilis* (LCB30) apresenta maior antagonismo ao fungo *S. rolfii* agente causador da podridão de esclerócio no feijão-caupi (*V. unguiculata*). Novos estudos estão sendo realizados para verificar a eficiência desses isolados em condições de campo.

Referências

- Araújo, F.F., & Marchesi, G.V.P. (2009). *Uso de Bacillus subtilis no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. Ciência Rural*, 39(5), 1558-1561. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500039>
- Assunção, I.P., Nascimento L.D., Ferreira M.F., Oliveira F.J., Michereff S. J., & Lima G.S.A. (2011). *Reaction of faba bean genotypes to Rhizoctonia solani and resistance stability. Horticultura Brasileira*, 29(4), 492-497. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000400008>
- Auler, A.C.V., Carvalho, D.D.C., & Mello, S.C.M. (2013). *Antagonismo de Trichoderma harzianum a Sclerotium rolfii nas culturas do feijoeiro e soja. Revista Agro@mbiente On-line*, 7(3), 359-365. doi: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v7i3.1335>
- Bontempo, F.A. (2016). *Seleção “in vitro” de isolados de Trichoderma spp. E Bacillus spp. em baixa temperatura de crescimento para o controle de Sclerotium cepivorum*. Dissertação (Pós-Graduação). Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Parnaíba, MG, Brasil. Recuperado de <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7805>
- Campos, J.T. (2010). *Rizobactérias promotoras do crescimento de cana-de-açúcar*. Dissertação (Mestrado). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2017). *Acompanhamento da safra brasileira de grãos, safra 2016/17*. Recuperado de https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/21088_8ca248b277426bb3974f74efa00abab6
- Coutinho, P.W.R., Silva, de D.M.S., Saldanha, E.C.M., Okumura, R.S., & Silva Júnior, M.L. da. (2014). *Doses de fósforo na cultura do feijão-caupi na região nordeste do estado do Pará. Revista Agro@mbiente On-line*, 8(1), 66-73. doi: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v8i1.1310>
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). *Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma. III. Hyphal interactions. Transactions British Mycological Society*, 57, 363-369. doi: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80050-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80050-5)
- Ferreira, D.F. (2010). *SISVAR: Sistema de análise de variância*. Universidade Federal de Lavras, (CD-ROM).838.
- Isaias, C.O., Martins, I., Silva, J.B.T., Silva, J.P., & Mello, S.C.M. (2014). *Ação antagonista e de metabólitos bioativos de Trichoderma spp. contra os patógenos Sclerotium rolfii e Verticillium dahliae. Summa Phytopathologica*, 40(1), 34-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>
- Lanna Filho, R., Ferro, H.M., & Pinho, R.S.C. (2010). *Controle biológico mediado por Bacillus subtilis. Revista Trópica: Ciências Agrárias e*

Biológicas, 4(2), 12-20. Recuperado de <http://www.periodicoseltronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/145>

- Maciel, C.G., Maciel, C.G., Lazarotto, M., Ricardo Mezzomo, R., Poletto, I., Muniz, M.F.B., & Lippert, D.B. (2012). *Trichoderma spp. no biocontrole de Cylindrocladium candelabrum em mudas de Eucalyptus saligna. Revista Árvore*, 36(5), 825-832. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622012000500004>
- Mariano, R.L.R., Silveira, E.B., & Gomes, A.M.A. (2005). *Controle biológico de doenças radiculares*. Em: Michereff, S.J., Andrade, D.E.G.T. e Menezes, M. *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Imprensa Universitária, UFRPE, Recife*, 303-320.
- Morsy, E.M., Abdel-Kawi, K.A., & Khalil, M.N.A. (2009). *Efficiency of Trichoderma viride and Bacillus subtilis as biocontrol agents against Fusarium solani on tomato plants. Egyptian Journal of Phytopathology*, 37, 47-57.
- Remuska, A.C., & Pria, M.D. (2007). *Efeito de Bacillus thuringiensis e Trichoderma sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias*, 13(3), 31-36. <http://ri.uepg.br/riuepg/handle/123456789/125>
- Silva, J.A., Oliveira, M.G., Souza, L.T., Assunção, I.P., Lima, G.A., & Michereff, S.J. (2014). *Reação de genótipos de feijão-fava a Sclerotium rolfii. Horticultura Brasileira*, 32, 98-101. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362014000100016>
- Singh, U.P., & Sarma, B.K. (2009). *Biology and control of Sclerotium rolfii: the incitant of collar rot of Cicer arietinum*. Saarbrücken: VDM, 198p.
- Sousa, T.G. de., & Blum, L.E.B. (2013). *Uso de Trichoderma harzianum e condicionador orgânico de solo para controle da podridão por Sclerotium rolfii. Bioscience Journal*, 29(5), 1616-1623. <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/13932>

Licença Creative Commons CC BY 4.0

Este artigo foi publicado com acesso aberto para distribuição sob os termos do Licença de Atribuição Creative Commons, que permite uso irrestrito, distribuição, e reprodução em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.