

## Seleção *in vitro* de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium* sp.

Mylenna Nádja Ferreira de Sá<sup>a</sup>, Jéssica de Souza Lima<sup>a</sup>, Fábio Nascimento de Jesus<sup>a</sup>, Jane Oliveira Perez<sup>a</sup>, Carlos Alberto Tuão Gava<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Petrolina, CEP 56316-686, Pernambuco, Brasil.  
\* mylennadjafs@gmail.com.

<sup>b</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa semiárido, Petrolina, CEP 56302-970, Pernambuco, Brasil.

Recebido: 12 outubro 2018 / Aceito: 28 novembro 2018 / Publicado online: 2 janeiro 2019

### Resumo

Nesta pesquisa, objetivou-se avaliar a ação antagonista *in vitro* de bactérias do gênero *Bacillus* e do fungo *Trichoderma* sp. no controle de *Fusarium* sp. responsável por danos em plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (feijão-caupi). O ensaio foi conduzido utilizando a técnica de pareamento de culturas. O patógeno *Fusarium* sp. foi obtido pelo isolamento de plantas de *V. unguiculata* 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, agar) apresentava-se colonizada pelo *Fusarium* sp. no tratamento testemunha (patógeno cultivado na ausência do antagonista). Para as análises foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que os isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* sp. possuem potencial como antagonistas contra *Fusarium* sp., sendo o isolado *B. subtilis* (LCB 45) responsável por inibir 25,0% do crescimento micelial, e os tratamentos com *B. subtilis* (LCB 30), *Bacillus* sp. (BMH), *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp., inibiram 59,4%, 46,5%, 46,4% e 37,0%, o crescimento do diâmetro da colônia do agente causal da fusariose em plantas de *V. unguiculata*, respectivamente.

**Palavras-chave:** Antagonismo, controle biológico, fitopatógeno.

## In vitro selection of biocontrol agents for the control of *Fusarium* sp.

### Abstract

The objective of this research was to evaluate the *in vitro* antagonistic action of *Bacillus* and *Trichoderma* sp. in the control of *Fusarium* sp. responsible for damages in plants of *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea). The assay was conducted using the crop pairing technique. The pathogen *Fusarium* sp. was obtained by the isolation of cowpea plants 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. Mycelial growth evaluations were performed when the entire surface of the PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium was colonized by *Fusarium* sp. in the control treatment (pathogen cultured in the absence of the antagonist). For the analyzes, a completely randomized design with 5 replications was used. From the results obtained, it can be inferred that the isolates of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* sp. have the potential as antagonists against *Fusarium* sp., the isolate *Bacillus subtilis* (LCB 45) responsible for inhibiting 25.0% of the mycelial growth, and the treatments with *B. subtilis* (LCB 30), *Bacillus* sp. (BMH), *Bacillus* sp. (INV) and *Trichoderma* sp., Inhibited 59.4%, 46.5%, 46.4% and 37.0% growth of the colony diameter of the causal agent of fusariosis in cowpea plants, respectively.

**Keywords:** Antagonism, biological control, phytopathogen.

### Introdução

A O cultivo do *V. unguiculata* (L.) Walp. na região Nordeste do Brasil é de grandes produções devido a área utilizada, mas de baixas produtividades (Araújo, 2017). A baixa produtividade pode ser atribuída, em parte, a ocorrência de doenças que afetam a qualidade e quantidade dos grãos produzidos (Santos, Corlett, Mendes, Wanderley, 2002).

Diversas doenças acometem a cultura do *V. unguiculata* com destaque para as fúngicas. A cultura pode ser afetada por

diversas doenças causadas por fungos da parte aérea como também do sistema radicular. Dentre as doenças causadas por fungos habitantes do solo se destacam *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* que têm causado consideráveis prejuízos na produção do feijoeiro.

Fungos do gênero *Fusarium* são responsáveis pela destruição de várias culturas, entre elas o *V. unguiculata*. Considerado um fungo cosmopolita causa escurecimento

vascular de várias plantas. Seus principais sintomas incluem escurecimento do feixe vascular, tombamento, murcha, podridão de raiz, desfolhação e morte da planta (Dean et al., 2012). Nechet e Halfeld-Vieira (2006) cita que a fusariose é uma das mais importantes doenças que ocorrem na cultura do *V. unguiculata* provocando elevadas perdas econômicas.

As medidas de controle químico e cultural para doenças causadas por fungos habitantes do solo são caras, difíceis de serem implementadas e, na maioria das vezes, ineficazes. Além disso o aumento da preocupação da sociedade com impacto da agricultura no ambiente tem aumentado pesquisas para redução do uso de agrotóxicos, como também tem motivado o uso de métodos alternativos (Bettiol & Morandi, 2009; Raut & Karuppaiyil, 2014).

Neste sentido, o uso de agentes de controle biológico é considerado uma alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo. Além disso, não contamina o meio ambiente deixando resíduos e possui fácil aplicação (Soares, 2006). Atualmente o gênero *Trichoderma* é o mais estudado e utilizado no controle biológico de patógenos habitantes do solo (Silva, Heckler, Santos, Durigon, Blume, 2015).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a ação antagonista *in vitro* de bactérias do gênero *Bacillus* e do fungo *Trichoderma* sp. no controle de *Fusarium* sp. responsável por danos em plantas de feijão-caupi (*V. unguiculata*).

## Material e Métodos

O patógeno *Fusarium* sp. foi isolado de plantas com sintomas de murcha em área de produção de feijoeiro. Os antagonistas utilizados foram oriundos da coleção de micro-organismos do laboratório de controle biológico da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, sendo eles: *Bacillus subtilis* (LCB 30), *B. subtilis* (LCB 45), *Bacillus* sp. (BMH), *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp. Para o início do ensaio *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 (Demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de  $26 \pm 2$  °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 AN (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 na cultivado na ausência do antagonista).

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 *Fusarium* sp. foram colocados no centro das placas. O preparo do fungo *Trichoderma* sp. para inoculação 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  $26 \pm 2$  °C.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio se apresentava colonizada pelo *Fusarium* sp. 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).

Para as análises foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. 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

Todos os isolados testados diferiram significativamente da testemunha (Tabela 1), com destaque aos isolados *Bacillus* sp. (BMH), *B. subtilis* (LCB 30), *Bacillus* sp. (INV) e *Trichoderma* sp. que reduziu o crescimento micelial de *Fusarium* sp. em 4,8; 3,6; 4,8; 5,6 cm, respectivamente.

Em estudos realizados por Carvalho, Mello, Lobo 2 Silva (2011) avaliando o controle de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* por seis isolados de *Trichoderma harzianum*, mostraram que todos os isolados apresentaram antagonismo contra o patógeno.

Conforme Vinale et al. (2008) a redução do crescimento micelial de *Fusarium* spp. pelo fungo *T. harzianum* pode ser atribuída à competição por espaço e por nutriente presentes no meio de cultura e/ou hiperparasitismo. Por outro lado, Dubey, Suresh e Singh (2007) constataram que espécies do gênero *Trichoderma* spp. tem a capacidade de inibir o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pela produção de metabolitos não voláteis.

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

Microorganismo antagonista	Diâmetro da colônia <i>Fusarium</i> sp. (cm)
<i>Bacillus</i> sp. BMH	4,8±2,4 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> LCB 30	3,6±1,4 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> LCB 45	6,7±0,23 <sup>b</sup>
<i>Bacillus</i> sp. INV	4,8±2,15 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma</i> sp.	5,6±1,54 <sup>a</sup>
Testemunha	9,0±0,0 <sup>c</sup>

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

Quanto ao isolado *B. subtilis* (LCB 45), observou-se que o tratamento foi superior à testemunha, mas diferiu estatisticamente dos demais isolados testados. Grande parte dos microorganismos envolvidos em controle biológico atua através de antibiose. Por exemplo, diversas espécies de *Bacillus* são citadas na literatura como produtoras de antibióticos podendo, ainda, secretar metabólitos importantes como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (Bettiol &

Ghini, 1995).

Segundo Lanna, Ferro e Pinho (2010), o gênero *Bacillus* se destaca por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos. Possibilitando dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos. Sendo que, a espécie *B. subtilis* é a que possui excelentes resultados como agente de biocontrole. Kupper, Gimenes-Fernandes e Goes (2003) afirmam que microrganismos que agem por antibiose, geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido.

Para o antagonista *Trichoderma* sp., Lopes et al. (2012) relataram 60% de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* pela ação de metabólitos voláteis de *T. harzianum*. Segundo Bomfim et al. (2010), *Trichoderma* spp. produzem enzimas que degradam as paredes celulares de outros fungos e a esse efeito se soma a ação tóxica de substâncias antifúngicas produzidas pelo antagonista, reduzindo ou mesmo paralisando (efeito fungistático) o crescimento e a esporulação do patógeno.

## Conclusões

Com a obtenção destes resultados, pode-se inferir que os isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* sp. testados possuem potencial como antagonistas contra *Fusarium* sp. agente causador de danos em plantas de *V. unguiculata*. Novos estudos serão necessários para testar a eficiência desses isolados em condições de campo.

## Referências

Araújo, L. B. R. (2017). *Potencial genético de variedades tradicionais de feijão-caupi e avaliação para resistência à murcha de Fusarium* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. Recuperado de <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/25240>

Bettiol, W. & Ghini, R. Controle biológico. In A. Bergamin, H. Kimati & L. Amorim. (1995). *Manual de fitopatologia.: Princípios e conceitos* (3 ed., vol. 1, pp. 717-727) São Paulo: Agronômica Ceres.

Bettiol, W. & Morandi, M. A. B. (2009). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente.

Bomfim, M. P., São José, A. R., Rebouças, T. N. H., Almeida, S. S., Souza, I. V. B. & Dias, N. O. (2010). *Avaliação antagônica in vitro e in vivo de Trichoderma spp. a Rhizopus stolonifer em maracujazeiro amarelo*. *Summa Phytopathologica*, 36(1), 61-67. doi: 10.1590/S0100-54052010000100011

Carvalho, D. D. C., Mello, S. C. M., Lobo Júnior, M. & Silva, M. C. (2011). *Controle de Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1), 28-34. doi: 10.1590/S1982-56762011000100004

Brígida Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ...Foster, G. D. (2012). *The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Dubey, S. C., Suresh, M. & Singh, B. (2007). *Evaluation of Trichoderma species against Fusarium oxysporum f.sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt*. *Biological Control*, 40(1), 118-127. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.06.006

Dennis C., Webster J. (1971). *Antagonistic properties of species groups of Trichoderma, III Hyphal interactions*. *Transactions British Mycological Society*, 57(3), 363-369. doi: 10.1016/S0007-1536(71)80050-5

Ferreira, D. F. (2010). *SISVAR: Sistema de análise de variância*. Universidade Federal de Lavras. (CD-ROM).

Kupper, K. C., Gimenes-Fernandes, N. & Goes, A. (2003). *Controle biológico de Colletotrichum acutatum, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos*. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3), 251-257. doi: 10.1590/S0100-41582003000300005

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.

Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandao, R. S., Monteiro, V. N., Lobo Junior, M., ...Silva, R. N. (2012). *Biochemical and metabolic profiles of Trichoderma strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116(7), 815-824. doi: 10.1016/j.funbio.2012.04.015

Nechet, K. L. & Halfeld-Vieira, B. A. (2006). *Doenças do feijão caupi em Roraima*. Boa Vista: Embrapa, Roraima.

Raut, J.S. e Karuppayil, S.M. (2014). *A status review on the medicinal properties of essential oils*. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055

Santos, D., Corlett, F. M. F., Mendes, J. E. M. F. & Wanderley, J. S. A. (2002). *Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(10), 1407-1412. doi: 10.1590/S0100-204X2002001000008

Silva, G. B. P., Heckler, L. I., Santos, R. F., Durigon, M. R. & Blume, E. (2015). *Identificação e utilização de Trichoderma spp. armazenados e nativos no biocontrole de Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista Caatinga*, 28(4), 33-42. doi: 10.1590/1983-21252015v28n404rc

Soares, P. L. M. (2006). *Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos* (Tese de doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Recuperado de <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/102317>

Li, Y., Hu, C. & Yu, Y. 2008. *Interfacial studies of sisal fiber reinforced high density polyethylene (HDPE) composites*. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39(4): 570-578. doi: 10.1016/j.compositesa.2007.07.005

Mohammed, R.R.; Chong, M.F., 2014. *Treatment and decolorization of biologically treated palm oil mill effluent (POME) using banana peel as novel biosorbent*. *Journal of Environmental Management*, 132, 237-249. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.11.031

Moriwaki, H., Kitajima, S. & Kurashima, M. 2009. *Utilization of silkworm cocoon waste as a sorbent for the removal of oil from water*. *Journal of Hazardous Materials*, 165 (1-3): 266-270. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.116

Parab, H., Joshi, S., Sudersanan, M., Shenoy, N., Lali, A. & Sarma, U. 2010. *Removal and recovery of cobalt from aqueous solutions by adsorption using low cost lignocellulosic biomass-coir pith*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 45(5): 603-611. doi: 10.1080/10934521003595662

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. & Lorito, M. (2008). *Trichoderma-plant-pathogen interactions*. *Soil Biology & Biochemistry*, 40(1), 1-10. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002

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.