



**INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE  
*Thielaviopsis paradoxa* POR *Bacillus subtilis* E *Bacillus pumilus***

Gustavo Venturini<sup>1</sup>; Fabio Brandi<sup>2</sup>; Wagner Bettiol<sup>3</sup>

Nº 14405

**RESUMO** – O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de *Bacillus pumilus* (QST 2808) e *Bacillus subtilis* (QST 713) na inibição da germinação de esporos e no crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da podridão abacaxi da cana-de-açúcar. O primeiro teste avaliou a taxa de crescimento micelial do patógeno em placas de Petri, totalizando 15 placas em três tratamentos (inoculação simultânea; 24 horas e 48 horas após o bioagente). Em seguida avaliou o crescimento micelial na presença dos metabólitos produzidos pelos agentes de biocontrole, adicionados ao meio batata-dextrose-ágar, em cinco concentrações (10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%). No teste de germinação avaliou-se o percentual de germinação dos conídios na presença dos agentes de biocontrole nas concentrações citadas anteriormente. Ambos os agentes de biocontrole apresentaram efeitos antagônicos significativos contra o patógeno, com destaque para *B. subtilis*.

**Palavras-chave:** antagonismo; agentes de biocontrole; podridão; abacaxi.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Eng. Agrônoma, ESALQ - USP, Piracicaba - SP; g.venturini.agro@outlook.com.br

2 Colaborador, Mestrando, UNESP, Botucatu – SP.

3 Orientador, Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP; wagner.bettiol@embrapa.br



**ABSTRACT** – *The effects of Bacillus subtilis (QST 713) and Bacillus pumilus (QST 2808) in the conidia germination and micelial growth were evaluated. In the first bioassay it was evaluated the mycelial growth rate in Petri dishes. In this experiment it was evaluated 15 Petri dish in three treatments (simultaneous inoculation; 24 and 48 hours after the bioagent). The following test it was evaluated the mycelial growth in the presence of metabolites produced by biological agent added to the BDA, in five concentrations (10%; 1%; 0.1%; 0.01%; 0.001%). Finally, the spores germination in the presence of biological agents in the same five concentrations above mentioned. The biocontrol agents significantly inhibited the pathogen, with emphasis on B. subtilis.*

**Keywords: antagonism; biocontrol agents; pineapple disease.**

## **1 INTRODUÇÃO**

A cultura da cana-de-açúcar é fundamental na economia nacional desde o período colonial. A partir da segunda metade do século XX, a busca por combustíveis alternativos atribuiu novo destaque à cultura, que com a crescente preocupação ambiental adentrou este século consolidada como uma fonte energética viável, tendo suas áreas expandidas nos estados de São Paulo, Alagoas, Pernambuco e, recentemente, na região Centro-Oeste (FERREIRA et al., 2008).

Tradicionalmente o plantio é iniciado no período de setembro a março na região Centro-Sul. Entretanto, vem sendo realizado, para um maior aproveitamento do maquinário, do aparato industrial e da mão-de-obra disponível para o setor sucroalcooleiro, no inverno, entre abril e setembro (FERREIRA et al., 2008). Nessa época de plantio a cultura fica exposta às condições adversas como temperaturas mais baixas, levando ao atraso na brotação das mudas e aumentando a incidência de podridões. Dentre essas, a podridão abacaxi, causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* tem se destacado como a mais frequente em todas as regiões (TOKESHI; RAGO, 2005).

A podridão abacaxi pode tanto inibir como retardar a brotação dos colmos da cana-de-açúcar, provocando falhas e consequente necessidade de replantio, acarretando custo adicional. Em casos mais severos, a operação de plantio pode ser comprometida em área total, como também acarretar perdas nos cortes subsequentes (SORDI, 1983). Assim, a atual forma de plantio da cana-de-açúcar, tendendo a total mecanização, a doença é



favorecida devido ao maior número de ferimentos nos colmos, aliado a possibilidade do plantio em época de inverno (SEGATO et al, 2006). Segundo Tokeshi e Rago (2005), *T. paradoxa* só infecta as plantas de cana-de-açúcar via ferimentos e cortes nas mudas, descartando a entrada via aberturas naturais.

O sintoma característico se dá pela fermentação das mudas (colmos), principalmente no início do desenvolvimento quando há maior concentração de açúcares, com o surgimento de tecido avermelhado e encharcamento da região do corte, produzindo aroma característico de essência de abacaxi. Os nós funcionam como barreira física ao desenvolvimento da doença, embora em variedades susceptíveis toda a planta possa vir a ser colonizada. Tais plantas podem desenvolver raízes e gemas, contudo são facilmente dominadas pelo mato ou pela competição com plantas vizinhas (TOKESHI; RAGO, 2005).

De acordo com Yadahalli, Adiver e Kulkarni (2007), *T. paradoxa* apresenta crescimento e produção de esporos em abundância entre 25°C e 28°C e pH entre 6 e 7. Produz dois tipos de esporos: microconídios e macroconídios. Os microconídios são responsáveis pela rápida infestação das plantas, sendo produzidos em cadeias longas nos conidióforos. Tem paredes delgadas e inicialmente de coloração hialina, se tornando pardo-escuro. Já os macroconídios apresentam coloração verde-oliva e posteriormente pardo-escuro, formando cadeias de 3 a 10 conídios por conidióforo e funcionam como estrutura de resistência em condições adversas (TOKESHI; RAGO, 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos agentes de biocontrole *Bacillus pumilus* (QST 2808) e *Bacillus subtilis* (QST 713) sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de *T. paradoxa*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. O isolado de *T. paradoxa* foi obtido de toletes infectados em área de cana-de-açúcar na região de Jaboticabal-SP e fornecido pelo Dr. Modesto Barreto, da Unesp/FCAVJ. Previamente, o fungo foi cultivado em placas de Petri em meio BDA durante cinco dias, mantido em sala climatizada a 25 °C. Também foram repicadas placas com *B. pumilus* e *B. subtilis*, mantidas sob as mesmas condições e período citados para o patógeno.



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Para o teste de pareamento *in vitro* foram utilizados discos retirados das bordas da cultura com 7 mm de diâmetro, tanto do fungo quanto dos agentes biológicos *B. pumilus* (QST 2808) e *B. subtilis* (QST 713). Os fundos das placas utilizadas foram previamente marcados com um traço de 7 cm, demarcando a distância entre os organismos dentro da placa, permitindo a medição do crescimento micelial. Estipulou-se três tratamentos: inoculação simultânea; inoculação após 24 horas; e inoculação após 48 horas em relação ao agente de biocontrole. Cada tratamento constou com cinco repetições, sendo as medições realizadas três dias após a inoculação do último tratamento instalado.

O teste de crescimento micelial com diversas concentrações de metabólitos consistiu na elaboração prévia de meio de cultura BDA combinado com as concentrações de 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% dos agentes de biocontrole. Os meios foram autoclavados a fim de inativar os agentes biológicos. Para as concentrações de 10% e 1% fez-se necessário a correção do pH para 5,8, permitindo a solidificação do meio. Cada tratamento constou de 10 repetições, e as medições foram realizadas diariamente, através de mensuração do diâmetro das colônias em dois eixos perpendiculares, sempre no mesmo horário, iniciando-se 24 horas após a instalação do experimento.

O teste de inibição da germinação de *T. paradoxa* foi realizado em placas de Petri de 6,5 cm de raio x 1,3 cm, de fundo quadriculado, a fim de se facilitar a marcação dos campos. A suspensão de esporos foi de  $1,6 \times 10^6$  conídios/ml. A fim de se compensar a diluição provocada pela junção com a suspensão de esporos na placa foram utilizadas as concentrações de 20%, 2%, 0,2%, 0,02% e 0,002%. Foram inoculados simultaneamente 50 microlitros da suspensão de esporos e 50 microlitros de cada da diluição (que foram os mesmos da diluição supra citada), espalhados com alça de Drigalski, para obter as concentrações finais de 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% dos agentes de biocontrole. Testemunhas foram utilizadas a fim de se identificar o período ideal de avaliação, que resultou no período de 10 horas após a instalação do experimento.

Todos os testes foram instalados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x6 (produtos x concentrações). As análises estatísticas foram efetuadas no programa Assistat e os gráficos produzidos no programa SigmaPlot. As variáveis significativas no teste F da análise de variância foram submetidas à análise de regressão. O ajuste do modelo de regressão foi realizado utilizando-se as repetições das variáveis estudadas.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*B. pumilus* (QST 2808), *B. subtilis* (QST 713) reduziram o crescimento micelial em relação a testemunha. Entretanto, sob a condição de inoculação prévia de 48 horas em relação ao patógeno, *B. subtilis* obteve maior controle em relação à inoculação simultânea e de 24 horas, e também em relação a *B. pumilus*, sob todas as condições (Tabela 1).

Em relação ao crescimento micelial em meio de cultura contendo apenas os metabólitos dos agentes antagonistas, *B. subtilis* apresentou controle superior a *B. pumilus* em todas as concentrações, com destaque em 0,1%, 1% e 10% onde foi obtido 100% de controle. *B. pumilus* controlou significativamente o crescimento na concentração máxima utilizada de 10% (Figura 1).

**Tabela 1.** Efeito de agentes de biocontrole no crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*.

Agente biológico	Tempo de inoculação <i>T. paradoxa</i>			
	Testemunha	Simultânea	24 horas depois	48 horas depois
<i>Bacillus pumilus</i> (QST 2808)	8,00 aA	5,58 aB	5,2 aB	5,22 aB
<i>Bacillus subtilis</i> (QST 713)	8,00 aA	5,74 aB	5,28 aB	4,52 bC

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ )

O teste de germinação de *T. paradoxa* mostrou que *B. subtilis* apresentou a maior inibição da germinação em todas as concentrações em relação a *B. pumilus*, principalmente quando diluído ao meio nas concentrações 0,1%, 1% e 10% (Figura 2).

Tais resultados *in vitro* indicam que os isolados de *Bacillus* spp. tem como mecanismo de ação a antibiose. O isolado QST-713 de *B. subtilis* produz metabólitos, tais como: surfactina, iturina e agrastatina/plipastatina, os quais inibem a germinação dos esporos e o crescimento do tubo germinativo de patógenos (*Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* e *Alternaria brassicicola*). *B. pumilus* (QST 2808) produz açúcares aminados de ação antifúngica, sendo indicado para controle de *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans*, além de míldios e oídios incidentes em inúmeras culturas (BETTIOL et al., 2012).

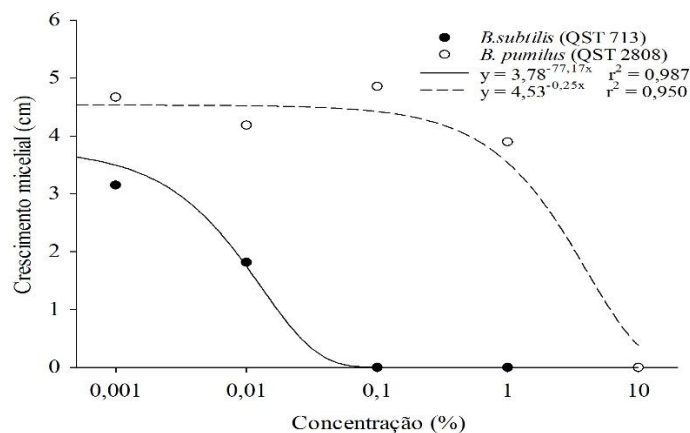


Diversos trabalhos demonstraram a inibição da germinação de esporos de fitopatógenos por *B. subtilis* (QST 713) e *B. pumilus* (QST 2808) (MARRONE, 2002; WSZELAKI e MILLER, 2005; LAHLAI et al., 2011). Assim, os resultados observados no presente trabalho, quanto à germinação dos conídios e crescimento micelial de *T. paradoxa*, (Figura 2), estão relacionados à ação dos metabólitos presentes na formulação.

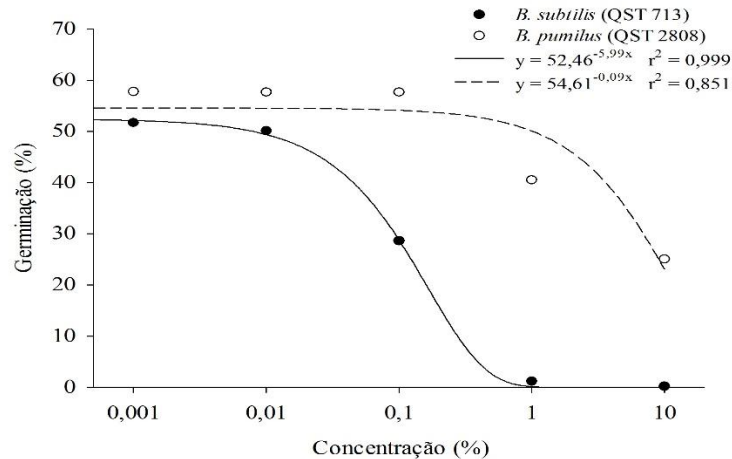
#### 4 CONCLUSÕES

*Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* apresentam potencial antagonista contra *T. paradoxa*;

*Bacillus subtilis* apresentou maior eficiência de controle em relação ao crescimento micelial e a inibição da germinação do patógeno em relação a *Bacillus pumilus*.



**Figura 1.** Efeito de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* no crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*.



**Figura 2.** Efeito de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* Porcentagem de germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa*.

## 5 AGRADECIMENTOS

O primeiro autor agradece ao CNPQ, pela bolsa concedida; ao Prof. Wagner Bettiol, pela oportunidade de trabalhar numa instituição de ponta como a Embrapa; e aos membros do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, pelo suporte técnico e pela amizade em todos os momentos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, V. Z.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORRÊA, E. D.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. **Produtos comerciais a base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p. (Documentos, 88).

FERREIRA, M. C.; WERNECK, C.F.; FURUHASHI, S.; LEITE, G.J. Tratamento de toletes de cana-de-açúcar para controle da podridão-abacaxi em pulverização conjugada ao plantio mecanizado. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 263-273, 2008.

LAHLAI, R.; PENG, G.; MCGREGOR, L.; GOSSSEN, B. D. Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST 713) in suppressing clubroot. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 21, p. 1351-1362, 2011.



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014**  
**12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

MARRONE P. G. An effective biofungicide with novel modes of action. **Pesticide Outlook**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 193–194, 2002.

SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. 415 p.

TOKESHI, H.; RAGO, A.M. Doenças da cana-de-açúcar, In: KIMATI, H.:(Coord.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 185-196.

WSZELAKI, A. L.; MILLER, S. A. Determining the efficacy of disease management products in organically-produced tomatoes. **Plant Health Progress**, Saint Paul, 2005. Disponível em:< <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2005/tomato/>>. Acesso em: 8 de julho 2014.

YADAHALLI, K.B.; ADIVER, S.S.; KULKARNI, S. Standartization of inoculation techniques for *Ceratocystis paradoxa* – an incitant of sugarcane sett rot. **Indian Phytopathology**, v. 60, p. 377-379, 2007.