

## EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* E *Trichoderma* sp. NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

### EFFECT OF *Bacillus thuringiensis* AND *Trichoderma* sp. ON THE GROWTH PATHOGENIC FUNGI

Angie Carneiro Remuska<sup>1</sup>, Maristella Dalla Pria<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Agronomia, UEPG.

<sup>2</sup> Autor para contato: Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Campus de Uvaranas, Ponta Grossa, PR, Brasil; (42) 3220-3086; e-mail: mdallapria@uepg.br

Recebido para publicação em 20/06/2007

Aceito para publicação em 27/11/2007

#### RESUMO

No controle biológico, doença não é só a interação entre patógeno e hospedeiro, mas o resultado desta interação e de inúmeros não patógenos que repousam no sítio de infecção. Os mecanismos das interações antagonistas podem ser: antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos agentes antagonistas no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições, no esquema fatorial 2 x 8, (antagonistas: *Trichoderma* sp. e *Bacillus thuringiensis* e fitopatógenos: *Sclerotium rolfsii*., *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Bipolaris sorokiniana*). Para avaliar o antagonismo foi utilizado o método do pareamento de colônias em placas de Petri contendo meio BDA, onde foi transferido um disco de micélio do fitopatógeno a 1,5 cm da borda da placa e na extremidade oposta, transferido um disco de micélio do antagonista *Trichoderma* sp. ou três estrias de *B. thuringiensis*. As placas foram incubadas em ambiente controlado. Após 48 horas foi medido o diâmetro das colônias. Nas placas teste-munhas foi transferido somente o fitopatógeno. Avaliou-se o diâmetro das colônias após 48 horas. A bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se eficaz como antagonista controlando a maioria dos fitopatógenos. A porcentagem de inibição de crescimento variou de 39,41 a 7,99 %, para *S.rolfsii* e *B. sorokiniana*, respectivamente. *Trichoderma* sp. exerceu controle significativo somente sobre *S.rolfsii*, porém não impediu a formação de escleródios.

Palavras-chave: controle biológico, crescimento micelial, *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma* sp.

## ABSTRACT

Biological control of plant disease does not only refer to the interaction between pathogen and host, but also to the result of this interaction and to the countless non-pathogens that rest on the infection site. The mechanisms of the antagonistic interaction can be: antibiosis, competition, parasitism, predation and defense induction of the host. This work aimed to evaluate the effects of some antagonistic agents on the mycelial growth of pathogenic fungi. The experiment was carried out in a completely randomized design with six repetitions, and the treatments were arranged in a factorial scheme 2 x 8 (antagonists: *Trichoderma* sp. and *Bacillus thuringiensis* and pathogens: *Sclerotium rolfsii*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *Bipolaris sorokiniana*). In order to evaluate the antagonism, the pairing culture on petri dishes with the BDA medium was used, and a disk of mycelia pathogen was transferred to 1,5 cm of the border of the disk, and at the other end, a disk of the *Trichoderma* sp. antagonist mycelial or three furrows of *B. thuringiensis* were transferred. The dishes were incubated in a controlled environment. The diameter of the colonies was measured after 48 hours. On the control dishes, only the pathogen was transferred. Again, the diameter of the colonies was evaluated after 48 hours. The bacterium *B. thuringiensis* was effective as an antagonist, controlling the majority of the pathogens. The percentage of growth inhibition varied from 39,41% to 7,99%, for *S.rolfsii* and *B. sorokiniana*, respectively. *Trichoderma* sp presented significant control only on *S.rolfsii*, but it did not prevent the development of sclerotia.

Key words: biological control, micelial growth, *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma* sp

### 1. Introdução

A população mundial atualmente tem exigido produtos livres de agroquímicos, fazendo com que aumentem as pesquisas em programas de controle biológico.

No controle biológico, a doença não é só a interação entre patógeno e hospedeiro, mas o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e uma série de microrganismos não patogênicos que também repousam no sítio de infecção. Esses não patógenos podem limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro (BETTIOL e GHINI, 1995).

O biocontrole pode ser conseguido através de práticas que favoreçam os antagonistas nativos ou através da introdução no solo de microrganismos selecionados cultivados em substratos no solo. O seu suc-

so depende das propriedades antogonísticas e dos mecanismos de ação do hiperparasita (BETTIOL, 1991). Os mecanismos das interações antagonistas entre microrganismos patogênicos e antagonistas com a planta podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro (MELO e AZEVEDO, 1998). Apesar desta divisão, é considerada como uma característica adequada de antagonista apresentar mais de um mecanismo, pois serão aumentadas as suas chances de sucesso. Um microrganismo pode interagir com outros, criando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes, sendo esta forma de interação denominada de antagonismo (BETTIOL, 1991).

Na antibiose ocorre a interação entre organismos, onde um metabólito produzido por um deles tem um efeito prejudicial sobre o outro. A produção de

metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos. Grande parte dos microrganismos envolvidos em controle biológico atua através de antibiose. Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos podendo secretar metabólitos comercialmente importantes como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL e GHINI, 1995).

Já o parasitismo é uma relação antagônica onde um organismo (parasita) vive sobre ou dentro de outro organismo vivo (hospedeiro), obtendo seu alimento deste último. Esta é uma relação muito comum entre os fungos. Algumas espécies de *Trichoderma* são micoparasitas eficazes no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos, como é o caso de *Sclerotinia sclerotiorum* e espécies de *Sclerotium*. Podem atuar, via de regra, através de um ou da associação de mecanismos como parasitismo, antibiose e competição [COOK e BAKER (1983), citados por Bettiol e Ghini (1995)].

A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos apresenta *Trichoderma* spp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (SILVA et al., 1999). Espécies de *Trichoderma* são apontados como agentes supressores de *R. solani* em experimentos realizados em laboratório supressores no solo natural (CHET e BACKER, 1983).

Lima et al. (2007) constataram que a imersão de bulbilhos de alho em suspensão de esporos de *Trichoderma asperellum* pode ser usado isolado ou associado a fungicidas melhorando o stand de plantas. Bettiol (1988) em trabalho de seleção de microrganismo antagônico a *Pyricularia oryzae*, verificou que *B. subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, e constatando também que o antagonista apresenta boas características para uso como agente de controle biológico, pois, além de rápido desenvolvimento, tanto em meio de cultura como na natureza, produzem endósporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se a várias condições ambientais. Este autor também verificou a termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *B.*

*subtilis*, os quais controlam *P. oryzae*. A termoestabilidade, juntamente com a estabilidade das substâncias antagônicas na forma seca e no armazenamento observadas por Landy et al. (1948) e Swinburne et al. (1975) citados por Bettiol (1988) são fatores de grande importância para a sua industrialização.

Bettiol (1988) ainda demonstrou a atividade antagônica de *B. subtilis* a *P. oryza* de arroz através de sua aplicação em sementes e parte aérea, considerando bastante promissor o seu emprego e/ou de seus metabólitos para o controle da brusone do arroz.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos agentes antagonistas *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento micelial, sobre os fungos fitopatogênicos: *Sclerotium rolfsii*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Bipolaris sorokiniana*.

## 2. Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, no delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições, no esquema fatorial 2 x 8 (antagonistas: *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp.; fitopatogênicos: *Sclerotium rolfsii*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Bipolaris sorokiniana*).

Os antagonistas foram fornecidos pela Universidade Estadual de Maringá e os fitopatogênicos pertenciam a coleção de fungos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Para avaliação da potencialidade antagonística de *B. thuringiensis* e *Trichoderma* sp., foi utilizada a técnica do pareamento de colônias do patógeno e controlador biológico descritos por Johnson e Curl (1972), citados por Mariano (1993).

Transferiu-se assepticamente para placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), um disco de 0,4 cm de diâmetro do fitopatogêno, esse disco foi colocado a 1,5 cm da borda da placa. Para o antagonista *Trichoderma* sp., também foi colocado um disco de 0,4 cm com a

colônia do fungo, a 1,5 cm da outra borda da placa. A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi multiplicada em meio de cultura AN (ágar-nutriente) e os tratamentos também montados em placas contendo meio BDA. Para *B. thuringiensis* foram feitas 3 estrias com auxílio de alça de platina a 1,5 cm da borda da placa. Assim, colônias do antagonista e do fitopatógeno ficaram pareadas na mesma placa.

No caso das testemunhas, transferiu-se para o centro das placas de Petri contendo meio BDA um disco de 0,4 cm de diâmetro do fitopatógeno ou do antagonista, para acompanhar o desenvolvimento dos fungos. Neste caso não foram pareadas as colônias do antagonista e fitopatógeno.

As placas foram incubadas em ambiente controlado, a 24°C, com 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Foram realizadas duas medidas opostas do crescimento das colônias e obteve-se a média do diâmetro das mesmas. As medições de crescimento das colônias começaram a ser realizadas 48 horas após a transferência dos microrganismos, e continuaram sendo realizadas no intervalo de 24 horas, até a paralisação do crescimento da colônia. Também foi avaliada a formação do halo de inibição ao redor dos patógenos e a formação de escleródios.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e em caso de significância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### 3. Resultados e Discussão

O fungo *Trichoderma* sp. mostrou-se eficiente como agente antagonista, apresentando porcentagem de inibição significativa, apenas para o fitopatógeno *S. rolfsii*, sendo essa porcentagem de 33,9 % (Tabela 1). Houve formação do halo de inibição, porém o antagonista *Trichoderma* sp. não impediu que o fitopatógeno produzisse escleródios. Com os fitopatógenos *P. aphanidermatum*, *M. fructicola*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. solani*, houve uma pequena inibição por parte do antagonista *Trichoderma* sp., porém com os fitopatógenos *D. phaseolorum* e *B. sorokiniana* não houve inibição do crescimento micelial.

Segundo Melo e Azevedo (1998), *Trichoderma* spp. apresentou antagonismo contra *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia tuliparum* e *S. sclerotiorum*, confirmando-se nesse experimento a inibição sobre *Sclerotium* sp. e uma pequena inibição sobre *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Muitos autores, como Well et al. (1972), relatam a eficiência de algumas espécies de *Trichoderma* no controle de *R. solani*, principalmente aliado à solariização. Contudo neste experimento o controle sobre *R. solani* por *Trichoderma* sp. foi insatisfatório.

A bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se muito eficaz como antagonista para a maioria dos fitopatógenos testados, diminuindo significativamente o crescimento das colônias, com exceção de *B. sorokiniana* para o qual exerceu um pequeno controle (Tabela 1). A porcentagem de inibição por *B. thuringiensis* variou de 39,41 % para *S. rolfsii*, a 7,99 % para *B. sorokiniana*.

*Bacillus thuringiensis* exerceu efeito antagonista significativo sobre *S. rolfsii*, *M. fructicola*, *S. sclerotiorum* e *F. solani*. Para os fitopatógenos *D. phaseolorum*, *P. aphanidermatum*, *R. solani* e *B. sorokiniana*, o antagonista exerceu um pequeno controle, sendo inferior significativamente aos demais patógenos.

**Tabela 1-** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos por *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. Ponta Grossa, UEPG, 2002.

Fitopatógenos	Antagonistas	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
<i>Sclerotium rolfsii</i>	39,41 A a*	33,90 A a
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	17,44 A b	0,00 B b
<i>Pythium aphanidermatum</i>	17,74 A b	3,67 B b
<i>Monilinia fructicola</i>	37,97 A a	0,83 B b
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	37,44 A a	7,47 B b
<i>Rhizoctonia solani</i>	12,40 A b	0,63 B b
<i>Fusarium solani</i>	36,17 A a	6,93 B b
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	7,99 A b	0,00 A b
C.V. (%)	53,19	

\*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ); C.V.= coeficiente de variação.

Comparando-se os dois antagonistas, *B. thuringiensis* mostrou-se mais eficiente do que *Trichoderma* sp., controlando maior número de fitopatógenos. Os antagonistas não deferiram no controle de *S. rolfsii* e *B. sorokiniana*, sendo que *B. sorokiniana* não foi controlado por nenhum dos antagonistas.

A bactéria *B. thuringiensis* além de controlar o crescimento da colônia de *S. sclerotiorum* em 37,44 % (Tabela 1), não permitiu que o fungo formasse escleródios, que são estruturas de resistência que garantem a sobrevivência do mesmo no solo por até oito anos. Os fungos *S. rolfsii* e *R. solani*, formaram estruturas de resistência (escleródios).

A inibição dos fitopatógenos pelo antagonista é observada pela formação do halo de inibição, que se manifesta como uma limitação do crescimento do fungo pela bactéria.

Segundo Stavely et al. (1981) e Baker et al. (1985), citados por Bettiol e Ghini (1995), a ação de *B. subtilis* ocorre na germinação dos esporos e no crescimento micelial. Neste experimento observou-se que *B. thuringiensis* também atuou no crescimento micelial de alguns fitopatógenos, impedindo inclusive a formação de escleródios por *S. sclerotiorum*.

Foi observado por Bettiol e Kimati (1989, 1990) o potencial inibitório de *B. subtilis* sobre diversos fitopatógenos, entre eles *R. solani* e *Fusarium moniliforme*. Neste experimento, observou-se a eficiência no controle micelial por *B. thuringiensis* nos patógenos *F. solani* e baixa porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. solani*.

Alguns autores como Wilson e Pusey (1984), constataram que isolados de diversas espécies de *Bacillus* são capazes de inibir o crescimento fúngico em várias culturas. Foi constatado neste experimento que *B. thuringiensis* inibiu o crescimento micelial de diversos fungos em condições de laboratório.

A maioria dos relatos encontrados aponta *Trichoderma* spp. como um dos mais promissores agentes no controle biológico (PANDOLFO et al., 2007 e HILGEMBERG et al., 2007, porém neste experimento foi constatado que *B. thuringiensis* mostrou-se mais eficiente que *Trichoderma* sp. no controle dos fitopatógenos testados.

Segundo Perondi et al. (1996), tem sido realizada a microbiolização de sementes com *B. subtilis* para o controle de *Fusarium roseum* e *Pythium* sp. em milho. A bactéria *B. thuringiensis* neste experimento apresentou controle significativo sobre *F. solani*, contudo pequeno controle sobre *P. aphanidermatum*.

## Conclusões

A bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se eficiente no controle de *M. fructicola*, *S. sclerotiorum*, *F. solani* e *S. rolfsii*, impedindo que o fungo *S. sclerotiorum* formasse escleródios. O fungo *Trichoderma* sp., exerceu efeito no crescimento micelial do fungo *S. rolfsii*. *Bacillus thuringiensis* mostrou-se mais eficiente que *Trichoderma* sp. no controle biológico dos fitopatógenos *D. phaseolorum*, *P. aphanidermatum*, *M. fructicola*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. solani*.

## REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-728.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 226 p.
- BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagonísticos a *P. oryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)**. Piracicaba, 1988. 140 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, p.1165-1174. 1990.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismo antagonísticos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle do Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.15, p.257-266, 1989.
- CHET, F.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Palo alto, v.73, p.137-160, 1983.
- HILGEMBERG, P.; DALLA PRIA, M.; DUDA, L.; SANDINI, F.; KAMIKOGA, A.T.M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e

*Trichotecium roseum* a fungos de solo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.121, 2007.

LIMA, E.A.; CHAGAS, B.L.; SILVA, V.P.; POMELLA, A.W.V. Efeito de *Trichoderma asperellum* no cultivo do alho, associado ou não com tratamento químico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.319, 2007.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. **Revisão Anual de patologia de Planta**, Passo Fundo, v.1, p.369-409, 1993.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. 262 p.

PANDOLFO, J.D.; MATSUMURA, A.T.S.; PORTO, M.D.M. Efeito antagônico de *Trichoderma* sp. e de fungicidas, *in vitro*, sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.260, 2007.

PERONDI, N.L.; LUZ, W.C.; THOMAS, R. Controle microbiológico da giberela do trigo. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.21, p.243-249, 1996.

SILVA, A.C.F.; ROSA, C.R.E.; MELO, I.S.; Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, p.395-399, 1999.

STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; BAKER, C.J.; MACFALL, J.S. Greenhouse control of bean rust with *B. subtilis*. **Phytopathology**, Palo Alto, v.71, p.95-99, 1981.

WELL, H. D.; WELL, D. K.; JAWORSKI, G. A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Palo Alto, v.62, p.442-447, 1972.

WILSON, C.L.; PUSEY, P.L. Post harvest biological control of stone fruit brown rot by *B. subtilis*. **Plant Disease**, St. Paul, v.68, n.9, p.753-756, 1984.