

Controle da queima das folhas do inhame com produtos à base de *Bacillus subtilis*

Domingos E.G.T. Andrade^{1*}; Emanuel B. Silva^{1***}; Sami J. Michereff¹; Rosa L.R. Mariano^{1**} & Wagner Bettiol^{2**}

¹ Depto. de Agronomia - Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 - Recife, PE, Brasil,

² EMBRAPA/CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP, Brasil.

* Bolsista da FACEPE.

**Bolsista do CNPq.

Acceto para publicação em: 10/07/95.

RESUMO

Andrade, D.E.G.T.; Silva, E.B.; Michereff, S.J.; Mariano, R.L.R. & Bettiol, W. Controle da queima das folhas do inhame com produtos à base de *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica*, v.21, p.202-205, 1995.

Visando o controle da queima das folhas do inhame causada por *Curvularia eragrostidis*, diferentes produtos à base de *Bacillus subtilis* (isolado AP-3) foram testados: suspensão de células (10^8 ufc/ml); células veiculadas em formulação pó molhável (AM-66, 1.500 ppm); extrato concentrado contendo metabólitos [GPLD(10) - 5.000 ppm] e solução etanólica dos metabólitos (5.000 ppm). O fungicida mancozeb (1.600 ppm) foi utilizado como padrão de controle. Os produtos à base de *B. subtilis* e o fungicida mancozeb foram aplicados em diferentes períodos com relação ao momento de inoculação do patógeno (3 dias antes, simultaneamente e 3 dias depois). O extrato de metabólitos GPLD (10) demonstrou alta eficiência no controle da doença com comporta-

mento estatisticamente semelhante ao mancozeb. Quando diferentes dosagens do extrato GPLD (10) (0,5, 5, 50, 500, 2.500 e 5.000 ppm) foram testadas, as duas últimas concentrações inibiram em mais de 97% a germinação de conídios e reduziram em mais de 80% a severidade da doença, sem diferirem significativamente de mancozeb. Cinco isolados de *C. eragrostidis* tiveram a germinação de seus conídios inibidos em mais de 96% na concentração de 2500 ppm, enquanto a severidade da doença foi reduzida em mais de 62%, pelo produto na concentração de 500 ppm sem diferirem significativamente entre si quanto à sensibilidade ao extrato GPLD (10).

Palavras-chave: *Curvularia eragrostidis*, *Dioscorea cayennensis*, controle biológico, *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Andrade, D.E.G.T.; Silva, E.B.; Michereff, S.J.; Mariano, R.L.R. & Bettiol, W. Control of yam leaf blight with *Bacillus subtilis* extracts and formulated cells. *Summa Phytopathologica*, v.21, p.202-205, 1995.

In order to control the yam leaf blight caused by *Curvularia eragrostidis*, different formulations of *Bacillus subtilis* isolate AP-3 were evaluated: cells suspension (10^8 cfu/ml); cells formulated as wettable powder (AM-66, 1500 ppm); concentrated extract of metabolites [GPLD (10), 5000 ppm] and liquid extract of metabolites (5000 ppm). The fungicide mancozeb (1600 ppm) was used as a control. Formulations and fungicide were applied in different periods in relation to the pathogen inoculation (3 days before, simultaneously and 3 days after). The extract of metabolites GPLD (10) showed high efficien-

cy for disease control however without significant difference from mancozeb. When different dosages of the extract GPLD (10) (0.5, 5, 50, 500, 2500 and 5000 ppm) were tested, the two highest concentrations reduced more than 97% of the conidial germination and more than 80% of the disease severity, without differing significantly from mancozeb. Five *C. eragrostidis* isolates had their conidial germination inhibited in more than 96% while the disease severity was reduced in more than 62%, without differing significantly among them in relation to the sensibility to the extract GPLD (10).

Key words: *Curvularia eragrostidis*, *Dioscorea cayennensis*, biological control, *Bacillus subtilis*.

A queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.), causada por *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer, é uma das doenças mais frequentes e severas em todas as áreas de plantio no nordeste brasileiro (10). A redução da área fotossintética, decorrente da formação de manchas foliares necróticas, resulta em perdas de até 35 a 40% no peso das túberas comerciais. O controle da doença é tradicionalmente efetuado com pulverizações preventivas ou logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, com fungicidas à base de maneb ou mancozeb (15). Entretanto, existem informações de agricultores quanto à perda de eficiência desses produtos (11), indicando a necessidade de novos métodos para o controle da doença.

A utilização de microrganismos e/ou de seus metabólitos para o controle de fitopatógenos é uma das alternativas a serem estudadas. Diversos autores têm demonstrado a capaci-

dade de *Bacillus subtilis* Cohn em controlar patógenos no filoplano (2, 9, 14). Esses autores utilizaram células bacterianas ou culturas livres de células, sem desenvolver formulações ou extrair os metabólitos produzidos por *B. subtilis*, que é reconhecidamente produtor de antibióticos (8).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de células e de extratos concentrados contendo metabólitos de *B. subtilis* no controle da queima das folhas do inhame.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregaram-se cinco isolados de *C. eragrostidis* (CE-1, CE-4, CE-5, CE-8, CE-10), obtidos de folhas de inhame apresentando sintomas de queima, procedentes de plantios comerciais dos estados de Pernambuco e Paraíba.

Quatro materiais à base de *B. subtilis*, a partir do isolado AP-3 (2), foram avaliados quanto ao potencial de controle da queima das folhas do inhame: a) Suspensão de células em água destilada esterilizada; b) Células veiculadas em formu-

lação pó molhável (AM-66); c) Extrato concentrado de metabólitos [GPLD(10)]; d) Extrato líquido de metabólitos (solução etanólica de metabólitos).

A obtenção dos extratos concentrados e de células veiculadas em formulação pó molhável, de *B. subtilis*, foi previamente descrita por BETTIOL et al. (3). A suspensão de células foi preparada pela transferência de crescimento bacteriano com 48 horas de cultivo em meio NYDA (13) para tubos contendo água destilada esterilizada, procedendo-se a agitação mecânica.

1. Efeito de produtos à base de *B. subtilis* no controle da queima das folhas do inhame, aplicados em diferentes períodos. Plantas de inhame cv. Da Costa, com quatro meses de idade, foram inoculadas com o isolado CE-1 de *C. eragrostidis* atomizando-se no filoplano uma suspensão de conídios ($1,5 \times 10^5$ conídios/ml) e, tratadas em diferentes períodos com os produtos à base de *B. subtilis* ou com o fungicida mancozeb (Manzate BR, 800 g i.a./kg, Du Pont do Brasil S.A.), utilizado como padrão de controle. Os produtos à base de *B. subtilis* [Suspensão de células, 10^8 ufc/ml; células veiculadas em formulação pó molhável - AM-66, 1.500 ppm; Extrato concentrado de metabólitos [GPLD(10)] e Extrato líquido de metabólitos, 5.000 ppm] e o fungicida (mancozeb, 1.600 ppm) foram preparados em água destilada esterilizada. Em cada suspensão foi adicionado o espalhante adesivo Tween 80 na concentração de 0,05%. Três diferentes períodos de aplicação dos tratamentos em relação a inoculação do fitopatógeno foram testados: 3 dias antes, simultaneamente e 3 dias depois.

As plantas, após a inoculação do patógeno, foram mantidas em câmara úmida por 36 horas e posteriormente em condições de casa-de-vegetação. Nas testemunhas atomizou-se apenas a suspensão de conídios de *C. eragrostidis*, adicionada de espalhante adesivo. A avaliação foi efetuada 12 dias após a inoculação, pela análise dos sintomas usando escala de notas, variando de 0 a 4; onde: 0 = ausência de sintomas; 1 = presença de pequeno número de lesões circulares ou irregulares, isoladas, sem esporulação; 2 = presença de lesões circulares ou irregulares, isoladas, com até 20% da área foliar afetada; 3 = grande número de lesões esporulantes e com alguma confluência, de 21 a 40% da área foliar afetada; e, 4 = lesões abundantes, confluentes, com mais de 40% de área foliar afetada, esporulação abundante. A partir da comparação com a testemunha não tratada, foi calculada a porcentagem de redução da severidade da doença, conforme fórmula adaptada de EDINGTON et al. (7). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5×3 , com quatro repetições, sendo cada uma constituída de quatro conjuntos de folhas.

2. Efeito do extrato concentrado [GPLD(10)] contendo metabólitos de *B. subtilis* na germinação de conídios de *C. eragrostidis*. Sobre 0,2 ml de suspensão de esporos (isolado CE-1), na concentração de $1,5 \times 10^5$ conídios/ml, em lâminas escavadas, foram depositados 0,2 ml de suspensões contendo o extrato nas concentrações de 1, 10, 100, 1.000, 5.000 e 10.000 ppm, obtendo-se concentrações finais de 0,5, 5, 50, 500, 2.500 e 5.000 ppm. O fungicida mancozeb foi utilizado na concentração de 1.600 ppm. A testemunha constituiu-se

da deposição de 0,2 ml de água destilada esterilizada sobre a suspensão de conídios do patógeno. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e mantidas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em regime de luz contínua. Após seis horas de incubação, uma gota de azul de Aman foi depositada na cavidade da lâmina escavada e procedeu-se à contagem do número de conídios germinados e não germinados, em microscópio ótico. Considerou-se como conídio germinado aquele que apresentava o comprimento do tubo germinativo com, no mínimo, duas vezes a sua maior largura. Para efeito de cálculo, obteve-se a média da leitura de no mínimo 50 esporos em três campos de microscópio por repetição, sob aumento de 40x, determinando-se a porcentagem de inibição da germinação dos conídios do fitopatógeno, conforme fórmula adaptada de EDINGTON et al. (7).

Para determinar o efeito do extrato GPLD (10) sobre a germinação de conídios de diferentes isolados de *C. eragrostidis* (CE-1, CE-4, CE-5, CE-8, CE-10), foi utilizada a metodologia descrita anteriormente. A concentração do extrato foi fixada em 2.500 ppm devido aos resultados do ensaio anterior.

3. Efeito do extrato concentrado GPLD (10) contendo metabólitos de *B. subtilis* no controle da queima das folhas do inhame. Inicialmente, foi avaliado o efeito de concentrações e de períodos de aplicação do extrato GPLD (10) de *B. subtilis* no controle da doença. Para tanto, o extrato foi aplicado em diferentes concentrações (1, 10, 100, 1.000, 5.000 e 10.000 ppm), na parte aérea de plantas de inhame com quatro meses de idade, aos 3 dias antes e simultaneamente à inoculação de *C. eragrostidis* ($1,5 \times 10^5$ conídios/ml). O fungicida mancozeb foi utilizado (1.600 ppm) como padrão de controle. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 7×2 , com quatro repetições.

Para avaliar o efeito do extrato GPLD (10) no controle da queima das folhas do inhame causada por diferentes isolados de *C. eragrostidis*, atomizaram-se suspensões de conídios de cinco isolados do patógeno (CE-1, CE-4, CE-5, CE-8 e CE-10), na concentração de $1,5 \times 10^5$ conídios/ml, em plantas de inhame com quatro meses de idade, e simultaneamente atomizou-se o extrato de *B. subtilis*, na concentração de 5.000 ppm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Para os dois ensaios em que foi avaliado o efeito do extrato GPLD (10) no controle da queima das folhas, as repetições, as condições de incubação e a metodologia de avaliação foram semelhantes às descritas no item 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato GPLD (10) de *B. subtilis* demonstrou alta eficácia no controle da queima das folhas do inhame, principalmente quando aplicado simultaneamente ou 3 dias antes da inoculação de *C. eragrostidis*, com comportamento estatisticamente semelhante ao controle obtido com a aplicação do fungicida mancozeb (Quadro 1). Em tratamento curativo, tanto o extrato GPLD (10) como o mancozeb apresentaram

Quadro 1. Redução na severidade da queima das folhas do inhame com *Bacillus subtilis*, aplicados em diferentes períodos.

Tratamento	Período de Aplicação ¹		
	-3	0	+3
Mancozeb (1600 ppm)	68,8 aA ²	93,8 aA	25,0 aB
GPLD (10) (5000 ppm)	81,2 aA	87,5 aA	12,5 aB
Suspensão células (10 ⁸ ufc/ml)	25,0 bA	12,5 bA	6,2 aA
Extrato líquido (5000 ppm)	6,2 bA	18,8 bA	0,0 aA
AM-66 (1500 ppm)	25,0 bA	0,0 bA	0,0 aA

¹ Aplicação: -3 = 3 dias antes da inoculação de *C. eragrostidis*; 0 = simultaneamente; +3 = 3 dias depois.

² Média de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúscula no sentido horizontal não diferem entre si (Tukey 5%).

GPLD (10) = Extrato concentrado de metabólitos de *B. subtilis*.

AM-66 = Células de *B. subtilis* veiculadas em formulação pó-molhável.

Extrato líquido = Solução etanólica de metabólitos de *B. subtilis*.

pequena redução na severidade da doença quando aplicadas 3 dias após a inoculação do patógeno (Quadro 1).

A baixa eficácia dos produtos à base de *B. subtilis* em tratamento curativo foi semelhante ao observado por BETTIOL et al. (1) estudando o efeito de células de *B. subtilis* sobre *Cylindrocladium scoparium* em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. Este efeito deve-se ao fato dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* não apresentarem ação sistêmica, conforme verificado por BETTIOL et al. (4) estudando o controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*).

A aplicação de suspensão de células de extrato líquido contendo metabólitos e de células veiculadas na formulação pó-molhável não foram eficazes em reduzir a severidade da doença independente do período de aplicação (Quadro 1).

A porcentagem de inibição da germinação dos conídios de *C. eragrostidis* pelo extrato GPLD (10) foi diretamente proporcional à concentração do produto, com tendência linear ($y = 26,02 + 0,01747x$, em que "y" representa a porcentagem de inibição dos conídios e "x" a concentração do produto; $R^2 = 0,71$). Por essa equação, a dose que inibe a germinação de 95% é de 3.948 ppm do extrato. Entretanto, as dosagens de 2.500 e 5.000 ppm do extrato GPLD (10) inibiram em mais de 97% a germinação dos conídios, não diferindo significativamente de mancozeb, que inibiu totalmente. A dosagem de 0,5 ppm não inibiu a germinação dos conídios (Quadro 2).

Quando aplicado em diferentes dosagens em relação a dois períodos, o efeito do extrato GPLD (10) no controle da queima das folhas foi diretamente proporcional à sua concentração. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as dosagens de 10.000 e 1.000 ppm. A aplicação do extrato no mesmo dia da inoculação do fitopatógeno apesar de propiciar melhores resultados, não diferiu estatisticamente de sua aplicação três dias antes da inoculação (Quadro 2). Os ED₉₅ para a redução da severidade da doença quando considerada a aplicação do extrato GPLD (10) três dias antes e simultâneo à inoculação do patógeno foi de 13.362 e 10.578 ppm, respectivamente. Essa estimati-

Quadro 2. Efeito de diferentes concentrações do extrato concentrado de metabólitos [GPLD (10)] de *Bacillus subtilis* na germinação de conídios de *Curvularia eragrostidis* e no controle da queima das folhas do inhame em dois períodos de aplicação.

Tratamento	Inibição da Germinação de conídios (%)	Tratamento	Período de Aplicação ¹		
			-3	0	Média
Mancozeb	100,0 a ²	Mancozeb	87,5 aA ²	93,8 aA	90,6 a
GPLD 5.000*	97,8 a	GPLD 10.000*	81,2 abA	93,8 aA	84,4 ab
GPLD 2.500*	97,1 a	GPLD 5.000*	75,0 abA	87,5 aA	81,2 ab
GPLD500*	52,4 b	GPLD 1.000*	62,5 bA	75,0 aA	68,8 b
GPLD 50*	41,9 c	GPLD 100*	18,8 cA	31,2 bA	25,0 c
GPLD 5*	7,7 d	GPLD 10*	0,0 cA	0,0 cA	0,0 d
GPLD 0,5*	0,0 e	GPLD 1*	0,0 cA	0,0 cA	0,0 d
Média			46,3 B	53,6 A	

¹ Aplicação: -3 = 3 dias antes da inoculação de *C. eragrostidis*; 0 = simultaneamente.

² Média de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúscula no sentido horizontal não diferem entre si (Tukey 5%).

* Concentração de GPLD (10) expressa em ppm.

va foi determinada a partir das equações $y = 20,44 + 0,00558x$; e $y = 43,06 + 0,00491x$, com R^2 de 0,64 e 0,41, respectivamente, em que "y" representa a porcentagem de redução na severidade da doença e "x" a dosagem do extrato.

Conídios de diferentes isolados de *C. eragrostidis* foram inibidos acima de 96% pelo extrato GPLD (10) na concentração de 2.500 ppm (Quadro 3). O efeito inibitório demonstrado pelo extrato GPLD (10) sobre a germinação dos conídios de *C. eragrostidis*, pode indicar um possível fator de sucesso deste produto no controle da queima das folhas do inhame. Segundo BLAKEMAN (6), a germinação de esporos fúngicos na superfície foliar é um estágio crítico no desenvolvimento da interação patógeno-hospedeiro, no qual o patógeno, na maioria das vezes, é muito vulnerável.

As queimas das folhas causadas pelos cinco isolados de *C. eragrostidis* foram controladas similarmente pelo extrato [GPLD (10)] de *B. subtilis* (Quadro 3), assemelhando-se ao

Quadro 3. Efeito do extrato GPLD (10) de *Bacillus subtilis* sobre a germinação de conídios e a queima das folhas do inhame causada por diferentes isolados de *Curvularia eragrostidis*.

Isolado do patógeno	Inibição da germinação de conídios (%)	Redução da severidade da doença (%)
CE-5	98,8 a ¹	62,5 a
CE-1	97,4 a	75,0 a
CE-4	97,1 a	72,9 a
CE-8	96,7 a	75,0 a
CE-10	96,6 a	62,5 a

¹ Média de 4 repetições. Médias seguidas da mesma letra no sentido vertical não diferem entre si (Tukey 5%).

As concentrações do extrato GPLD (10) no teste de germinação e no de controle da doença foram de 2.500 e 5.000 ppm, respectivamente.

verificado em relação à inibição da germinação de conídios. Esses resultados demonstram que o extrato de *B. subtilis* não apresentou especificidade a isolados de *C. eragrostidis*. Resultados semelhantes foram obtidos por BETTIOL & VARZEA (5) trabalhando com cinco raças de *H. vastatrix*.

O extrato concentrado GPLD (10) contendo metabólitos de *B. subtilis* constitui importante alternativa ao controle químico tradicionalmente utilizado para a queima das folhas do inhame. Conforme RODGERS (12), a combinação da atividade antimicrobiana pela produção de metabólitos extracelulares e a capacidade para produção sob fermentação em larga escala, faz de *B. subtilis* um organismo atrativo para estudos de controle de doenças de plantas visando a sua produção industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BETTIOL, W.; AUER, C.G.; CAMARGO, L.E.A.; KIMATI, H. Controle da mancha foliar do *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium* com *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.14, n.2, p.210-218, 1988.
02. BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos à *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, n.3-4, p.257-266, 1989.
03. BETTIOL, W.; BRANDÃO, M.S.B.; SAITO, M.L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.18, n.2, p.153-159, 1992.
04. BETTIOL, W.; SAITO, M.L.; BRANDÃO, M.S.P. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.20, n.2, p.119-122, 1994.
05. BETTIOL, W.; VARZEA, V.M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, n.1, p.91-95, 1992.
06. BLAKEMAN, J.P. Phylloplane interactions. In: MOUNT, M.S.; LACY, G.H., eds. **Phytopathogenic prokaryotes**. New York: Academic Press, 1982. v.2, p.308-333.
07. EDINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, 1971.
08. KATZ, E.; DEMAIN, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriological Reviews**, Washington, v.41, p.449-474, 1977.
09. MIZUBUTI, E.S.G. Controle da ferrugem do feijoeiro com *Bacillus subtilis*. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 1992. 87p. Tese de Mestrado.
10. MOURA, R.M. Doenças do inhame, *Dioscorea cayennensis* Lam. var. *rotundata* Poir. 1990. 11p. (mimeografado).
11. RAMOS, J.E.L.; MOURA, R.M.M. Novas informações sobre o controle químico da queima do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.). **Caderno Omega - Série Agronomia**, Recife, n.4, p.197-206, 1992.
12. RODGERS, P.B. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. **Pesticide Science**, Oxford, v.27, p.155-164, 1989.
13. SCHAAD, N.W. ed. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 2nd ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 164p.
14. SINCLAIR, J.B. *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant diseases. In: AGRIHOTRI, V.P.; SINGH, N.; CHAUB, H.S.; SINGH, U.S.; DWIVEDI, T.S., eds. **Perspectives in plant pathology**. New Delhi: Today & Tomorrow's, 1989. p.367-374.
15. SISTEMA de produção para cará da costa: Agreste Setentrional, Agreste Meridional e Mata Norte. Recife: EMATER/IPA, 1985. 48p. (Série Sistema de Produção. Boletim, 11).