

Identificação e eficiência de *Bacillus* spp. inibidor do crescimento de *Macrophomina phaseolina*

Silva, A. R.¹; Silva, M. R.²; Delamuta, J. R. M.³; Santos, J. A.⁴; Ribeiro, R. A.⁵; Binneck, E.⁵; Hungria, M.⁵; Oliveira, M. C. N.⁵; Fantinato, G. G. P.⁵; Cattelan, A. J.⁵; Almeida, A. M. R.⁵

¹Graduando Universidade Estadual de Londrina (UEL); ²Universidade Norte do Paraná (UNOPAR);

³Doutoranda Universidade Estadual de Londrina (UEL); ⁴Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP); ⁵Embrapa Soja

Introdução

A cultura da soja (*Glycine max*) tornou-se a mais importante cultura do Brasil.

Fungos do solo são importantes causas de infecção da cultura da soja, sendo *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*, os mais importantes.

Estudos de estratégias de manejo de doenças em patossistemas tem sido objeto de pesquisas no controle de certos organismos patogênicos, pois o controle pela resistência genética ainda é insatisfatório. Na atividade de controle cultural foram analisadas e avaliadas diferentes sistemas de rotação e sucessão visando reduzir a infecção de raízes de soja pelo aumento da concentração e diversidade de microrganismos antagonistas.

A habilidade para produzir compostos voláteis por rizobactérias também inibiram o crescimento de fungos patogênicos, especialmente *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Cattelan, et al., 1999).

O fungo *Macrophomina phaseolina* é capaz de infectar centenas de culturas, entre elas a soja. Esse patógeno sobressai em períodos de seca, onde a planta de soja, afetada pelo estresse hídrico, também se torna mais suscetível (Wrather et al., 2008). Este fungo apresenta aspectos morfológicos diferentes, podendo ser cotonoso ou mais liso, se espalhando uniformemente na placa. Os sintomas causados podem ser manchas escurecidas e estrias acinzentadas, com produção de microesclerócios, com consequente apodrecimento da raiz e morte da planta.



Figura 1. Aspectos Morfológicos: (A) cotonoso; (B) liso e uniforme. (C) Sintomas na soja.

Um antagonista que pode vir a ser utilizado para a inibição do crescimento desse patógeno é o gênero *Bacillus* (Marroni e Germani, 2011), especialmente *B. subtilis*.

O presente trabalho visou quantificar a eficiência do gênero *Bacillus* no controle de *Macrophomina phaseolina*.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido in vitro, no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja, localizado na cidade de Londrina – PR, durante os meses de setembro/outubro de 2012. Retiraram-se amostras de rizosfera ao acaso de trigo, milho, aveia, nabo e tremoço. Um isolado de *Macrophomina phaseolina* (MAC P82T9 C.M.) da micoteca da Embrapa Soja foi repicado. As amostras de bactérias foram coletadas de rizosfera de plantas, da Fazenda Experimental da COAMO, localizada em Campo Mourão – PR. De cada amostra foram selecionadas 10 colônias de *Pseudomonas*, em meio de TSA para análises posteriores da frequência de isolados produtores de 2,4 DAPG, através de PCR com primers específicos (McSpadden Gardener et al, 2001). Os isolamentos dos *Bacillus* (4) foram feitos no mesmo meio e denominados B1, B2, B3 e B4.

Para a avaliação do efeito dos isolados de *Bacillus* na inibição do crescimento de *M. phaseolina*, discos de 5mm de micélio do fungo foram cultivados no centro de placas de Petri contendo meio de BDA (caldo de batata/dextrose/ágar), com adição de 5% peptona, durante 72 horas. Na sequência o fungo foi circundado pela bactéria, com o auxílio de uma alça de platina, sendo preparadas três repetições de cada tratamento. As placas foram mantidas em BOD a 28o C durante oito dias.

O experimento 1 foi montado no dia 14 de setembro, com aplicação do *Bacillus* no dia 17 e leitura do halo de inibição no dia 25 do mesmo mês. No experimento 2, a montagem se concluiu no dia 28 de setembro, com aplicação do *Bacillus* no dia 1 de outubro, e leitura, do halo de inibição, realizada dia 9 de outubro.

No Laboratório de Biotecnologia dos Solos, o DNA genômico total das amostras das bactérias foi extraído segundo a metodologia descrita por Kaschuk et al. (2006). Os primers e as condições de amplificação da sequência do 16S RNAr foram obtidos de Menna et al. (2006). Após a purificação do produto de PCR, o sequenciamento foi realizado como descrito por Ribeiro et al. (2009) e a leitura foi realizada no sequenciador capilar MEGA BACE 1000 (Amersham Biosciences).

Resultados e Discussão

Os isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente não foram considerados porque fizeram parte de um estudo já apresentado.

Foi feita uma análise conjunta de variância para o gênero *Bacillus*. Essa análise dos dois experimentos foi a mais adequada, apresentando uma C.V. de 14% e atendendo todas exigências requeridas pela ANOVA. Os isolados de *Bacillus* mais eficientes foram os isolados 1 e 4. Os demais isolados não diferiram do controle, sendo que, o isolado 2 era *Pseudomonas* do grupo fluorescente.

Tabela 1. Halo de inibição (cm) induzido por isolados de *Bacillus sp.*.

	Experimento 1			Experimento 2			Média Geral do Halo de Inibição (cm)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	
Controle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	a 0,00
B I	1,07	1,15	0,87	0,89	1,13	1,00	a 0,99200
B II	0,45	0,55	0,35	0,35	0,39	0,33	b 0,42667
B III	0,59	0,53	0,55	0,45	0,46	0,51	b 0,51000
B IV	1,13	0,92	0,87	1,02	0,94	0,99	a 0,97833

Sabe-se que o gênero *Bacillus* produzem metabólitos que afetam o desenvolvimento de fungos (Praça et al., 2004).

Com o resultado do sequenciamento foi obtido um valor 98% de semelhança com o gênero *Bacillus sp.* encontrado no banco de dados do NCBI (National Center for Biotchnology Information).

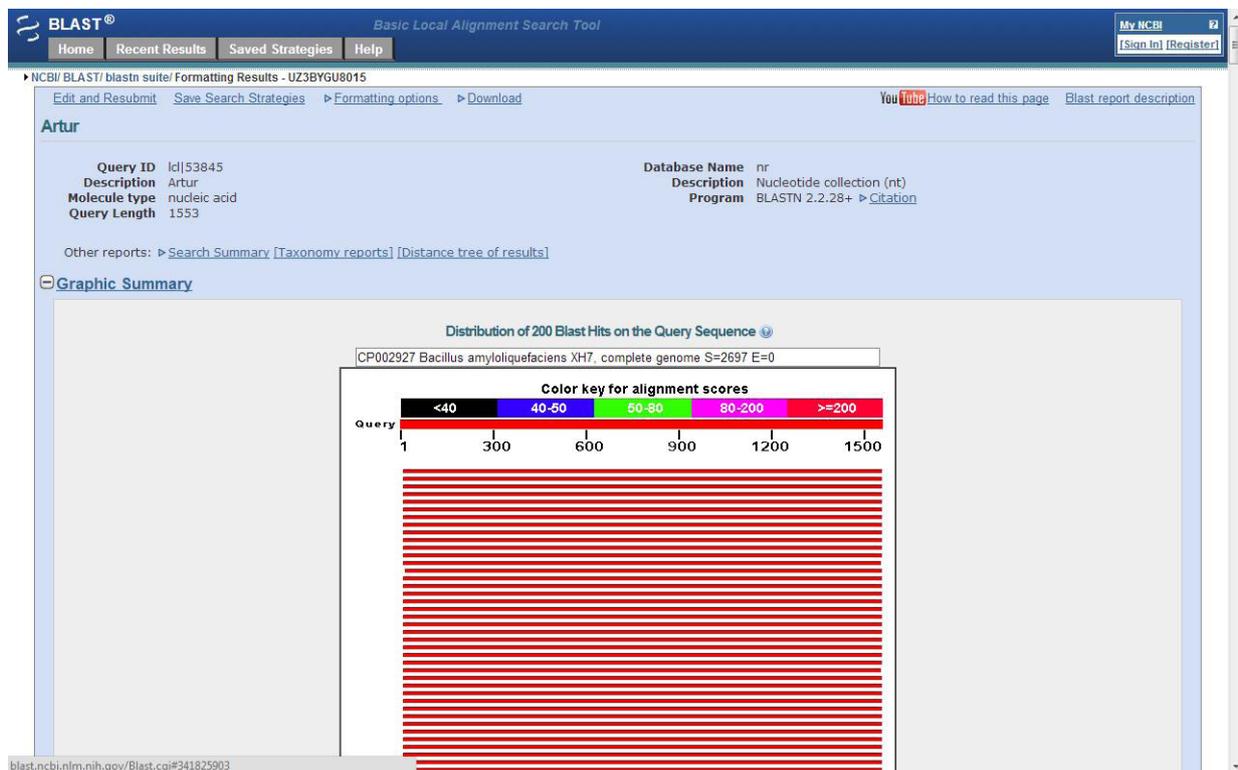


Figura 2. Imagem comprovando que a similaridade entre a sequência obtida em laboratório com o banco de dados (NCBI), resulta no gênero *Bacillus*.

Conclusão

Foram comprovadas que somente as bactérias do gênero *Bacillus sp.* isoladas (2) da rizosfera de plantas, controlam o crescimento de *M. phaseolina in vitro*.

Foram comparadas sequências entre os isolados de *Bacillus*, identificando-se *B. subtilis sp.*, *B. subtilis* sub-espécie *subtilis* e *B. amyloliquefaciens*.

Referências

- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32,p.210-220, 2006.
- McSPADDEN GARDENER, B.B., MAVRODI, D.V., THOMASHOW, L.S., WELLER, D.M. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. **Phytopathology** 91:44-54. 2001.
- MARRONI, I.V., GERMANI, J.C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, p.159-167, 2011.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.
- PRAÇA, L.B.; BATISTA A.C.; MARTINS, E.S.;SIQUEIRA, C.B; DIAS, D.G de S; GOMES,A.C.M.M., FALCÃO, R; MONNERAT, R. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.1, p.11-16, 2004.
- WRATHER, J. A.; SHANNON, J. G.; CARTER, T. E., BOND, J. P.; RUPE, J. C.; ALMEIDA, A. M.R. Reaction of drought-tolerant soybean genotypes to *Macrophomina phaseolina*. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2008-0618-01-RS, 2008.