

Inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano

In vitro inhibition of mycelial growth of fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* using actinomycetes isolates obtained from rhizosphere of native plants from Bahian Cerrado

Julielton S Silva^{1,*}, João Luiz Coimbra², Dérica G Tavares³, Geiza O Afonso¹

1. Graduando do curso de Engenharia Agrônoma/PRONERA, Departamento de Ciências Humanas, Universidade do Estado da Bahia/UNEB, Campus IX, BR 242, Loteamento Flamengo, CEP: 47800-000, Barreiras, BA. e-mail: elton_silva@hotmail.com.br, geizaafonso@yahoo.com.br; 2. Professor de Fitopatologia do Departamento de Ciências Humanas, UNEB, BR 242, Loteamento Flamengo, 47800-000, Barreiras, BA. e-mail: jcoimbra@uneb.br; 3. Graduanda do curso de Engenharia Agrônoma, Departamento de Ciências Humanas, Universidade do Estado da Bahia/UNEB, Campus IX, CEP: 47800-000, Barreiras - BA. e-mail: dericagoncalves@hotmail.com.

*Autor para correspondência: elton_silva@hotmail.com.br

Resumo Este trabalho teve como objetivo estudar a antibiose *in vitro* de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas do cerrado baiano, sobre o fungo *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, avaliando o seu potencial de antagonismo, visando dar suporte a pesquisas em campo. Para os estudos do antagonismo *in vitro* dos actinomicetos, o experimento foi montado em DIC, empregando-se o método de cultura pareada em placas de petri contendo meio BDA. Os tratamentos foram compostos com 6 isolados de actinomicetos (Ac.M, Ac.J, Ac.R, Ac.O, Ac.B, Ac.P) frente ao *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* e a testemunha contendo apenas o *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, sendo avaliado o crescimento micelial. Aos três dias depois do pareamento das colônias, apenas o actinomiceto Ac.P não diferiu estatisticamente da testemunha. Aos sete e onze dias após o pareamento, todos os isolados de actinomicetos testados neste trabalho (Ac.M, Ac.J, Ac.R, Ac.O, Ac.B, Ac.P), foram eficientes na inibição do crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, em condições de laboratório. O percentual de inibição variou em relação ao tipo de isolado antagonístico utilizado. Sendo que, em meio aos actinomicetos testados houve diferença estatística apenas entre os isolados Ac.R, que apresentou o maior percentual de inibição (35,85%) e o isolado de actinomiceto Ac.J, no qual foi observado o menor percentual de inibição (27,59%).

Palavras-chaves: Controle biológico, murcha de fusarium, maracujá.

Abstract This work aimed to study the *in vitro* antibiosis of

actinomycetes obtained from the rhizosphere of plants of the cerrado of Bahia, on the fungus *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* evaluating their potential antagonism, aiming to support research in the field. For studies of *in vitro* antagonism of actinomycetes, the experiment was performed in DIC, using the method of paired cultures in petri dishes containing BDA medium. The treatments consisted of 6 actinomycete (Ac.M, Ac.J, Ac.R, Ac.O, Ac.B, Ac.P) compared to *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* and control with only the *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* being evaluated mycelial growth. At three days after the pairing of the colonies, only the actinomycete Ac.P not statistically different from the control. At seven and eleven days after pairing every actinomycete isolates tested in this study (Ac.M, Ac.J, Ac.R, Ac.O, Ac.B, Ac.P), were effective in inhibiting the mycelial growth *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* able to laboratório. O percentage of inhibition varied with the type of isolated antagonistic used. And, among the actinomycetes tested statistical difference only between isolates Ac.R, which showed the highest percentage inhibition (35.85%) and isolated actinomycete Ac.J, in which we observed a lower percentage of inhibition (27.59%).

Keywords: Biological control, fusarium wilt, passion fruit.

Introdução

O cultivo do maracujá vem se expandindo no país nos últimos

anos, pelo fato da cultura apresentar boa adaptação em diversas regiões do Brasil, sendo que o maracujá é uma planta de clima tropical de ampla distribuição geográfica. O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá e a região nordeste representa mais da metade de toda a produção nacional, sendo que o estado da Bahia contribui com a maior parte desse percentual (IBGE, 2011). Nessa região, um pólo de produção dessa frutífera que está em franca expansão é o Submédio São Francisco, concentrados principalmente nos municípios de Juazeiro – BA e Petrolina – PE, devido a instalação de diversos perímetros irrigados (Araujo e Araújo, 2007).

Com o aumento da área plantada, sobreveio o surgimento e agravamento de um grande número de doenças. Esses problemas fitossanitários têm reduzido a produtividade do maracujazeiro, diminuindo o tempo de exploração econômica da cultura, obrigando o agricultor renovar constantemente seu pomar.

A murcha de fusarium causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* é um dos fatores limitantes no cultivo do maracujá. Patógeno habitante do solo, está entre as principais doenças de importância econômica do maracujazeiro, pois uma vez a planta infectada, não existe forma de controle curativo. Essa doença já foi constatada nas regiões produtoras do Nordeste brasileiro, principalmente nos Estados da Bahia e do Piauí.

Buscando minimizar as perdas de produção, os agricultores vêm intensificando o uso do controle químico nas lavouras, o que vem acarretando em impactos ambientais e aumentando os custos de produção, além de o fungo criar resistência quanto ao princípio ativo do produto químico.

O uso do controle biológico vem ocupando cada vez mais espaço no que diz respeito à produção agrícola e pecuária, em todo país, com objetivo de se obter alimentos livres de agrotóxicos, com uma produção mais sustentável e também visando diminuir os custos de produção. Dessa forma, pesquisas sobre agentes de controle biológico estão se tornando cada vez mais frequentes.

Entre os microrganismos com potencial de utilização no controle biológico de fitopatógenos, destacam-se as bactérias, e em especial, o grupo dos actinomicetos, responsáveis pela degradação e reciclagem de substratos naturais, além de serem reconhecidos como os principais produtores de inúmeros metabólitos secundários, principalmente, os antibióticos, devido ao seu amplo espectro de ação em relação à célula alvo, com atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e células tumorais (Araújo, 1998).

Diversos trabalhos com realização de testes *in vitro* utilizando actinomicetos vêm demonstrando resultados satisfatórios de antagonismo a vários tipos de doenças de plantas, tais como: inibição de *Botrytis cinerea* (Oliveira, 2004); *Meloidogyne javanica* (Coimbra e Campos, 2010); *Bipolaris sorokiniana* (Spadari e Van Der Sand, 2010). Assim, se mostra promissora a utilização de actinomicetos contra vários tipos de fitopatógenos. Todavia, salienta-se que o número de pesquisas relacionadas ao antagonismo dos actinomicetos frente às doenças de plantas ainda é restrito.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar a

antibiose *in vitro* de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas do cerrado baiano, sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, avaliando o seu potencial de antagonismo, visando dar suporte a pesquisas em campo.

Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia, na Universidade do Estado da Bahia/UNEB, Departamento de Ciências Humanas – Campus IX, situada no município de Barreiras, Oeste do Estado da Bahia.

O isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, foi cedido pela UFBA – Universidade Federal da Bahia/ICADS – Instituto de Ciências Ambientais e Desenvolvimento Sustentável, Campus Reitor Edgard Santos – Barreiras/Bahia. Os isolados de actinomicetos foram obtidos a partir da rizosfera de plantas do cerrado baiano, no município de Barreiras, onde se realizou uma pré-seleção entre os 18 isolados obtidos, escolhendo seis actinomicetos que apresentaram maior potencial de antagonismo frente ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Para os estudos do antagonismo *in vitro*, foi empregado o método de cultura pareada em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar), preparado com 200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar por litro de água destilada, sendo que o meio foi devidamente esterilizado em Autoclave Vertical, com temperatura de 120°C e pressão de 1 kgf/cm², durante 15 minutos. Posteriormente o meio BDA foi dispensando à base de 20ml por placa.

Após a solidificação do meio, cada actinomiceto foi pareado com o isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Para isso, em câmara de fluxo laminar discos de 0,5 cm de diâmetro contendo meio e micélio de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, foram retirados e colocados a 1 cm da borda da placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo o meio BDA. Na outra extremidade, foram colocados os isolados de actinomicetos, por meio da técnica de semeadura de estrias múltiplas, que consiste em espalhar o material com o auxílio de uma alça bacteriológica de platina, fazendo estrias sucessivas na superfície do meio, formando, assim o pareamento das colônias. Foram utilizadas como testemunha placas contendo na extremidade apenas um disco com meio e micélio de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora do tipo BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) a 25°C. O potencial de antagonismo dos isolados de actinomicetos foi avaliado, através da medição do crescimento micelial do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, até a testemunha cobrir toda a superfície do meio.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos (Tabela 1) e sete repetições, sendo cada repetição duas placas, que foram consideradas como uma parcela (Tabela 1). As avaliações foram realizadas medindo-se o diâmetro da colônia do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, com o auxílio de uma

Tabela 1 Disposição das unidades experimentais.

Tratamentos	Descrição
01	Ac. M* + <i>F. oxysporum</i>
02	Ac. J + <i>F. oxysporum</i>
03	Ac. R + <i>F. oxysporum</i>
04	Ac. O + <i>F. oxysporum</i>
05	Ac. B + <i>F. oxysporum</i>
06	Ac. P + <i>F. oxysporum</i>
07	<i>F. oxysporum</i>

*denominação dos isolados de actinomicetos.

régua milimetrada, em dois sentidos transversais, obtendo-se a média do crescimento micelial da colônia (Figura 4). Em seguida, foi calculada a percentagem de inibição (% I) do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando a seguinte fórmula:

$$%I = \frac{(c-T)}{c} \times 100\% \quad I = \frac{(c-T)}{c} \times 100 \text{ em que:}$$

% I = Percentagem de inibição;

C = Diâmetro do crescimento micelial da testemunha;

T = Diâmetro do crescimento micelial do tratamento.

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT, sendo selecionados os actinomicetos que apresentarem os maiores potencial de antagonismo frente ao *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Silva 2011).

Resultados e discussão

Todos os isolados testadas de Actinomicetos (Ac.M, Ac.J, Ac.R, Ac.O, Ac.B, Ac.P) demonstraram efeito antagônico significativo sobre o crescimento micelial do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* quando comparados com a testemunha, a partir do sétimo dia de avaliação (Tabela 2).

Na avaliação feita aos três dias depois do pareamento os antagonistas não se diferenciaram estatisticamente entre si. No entanto, foi observado diferença estatística da maioria dos actinomicetos com relação à testemunha, apenas o actinomiceto Ac. P não diferiu estatisticamente da testemunha, obtendo o menor percentual de inibição (Tabela 2). Porém, pode ser observado que já no terceiro dia de avaliação os actinomicetos testados demonstraram inibição do crescimento micelial do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*,

Tabela 2 Área da Colônia do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas do cerrado baiano.

Isolado	3 dias	7 dias	11 dias
	Área da Colônia (cm ²)	Área da Colônia (cm ²)	Área da Colônia (cm ²)
Testemunha	9,4 a	30,6 a	40,1 a
Ac. M	8,4 b	25,2 bc	26,7 bc
Ac. J	8,6 b	24,8 bc	29,0 b
Ac. R	8,3 b	24,6 c	25,7 c
Ac. O	8,6 b	26,9 b	28,8 bc
Ac. B	8,6 b	26,7 bc	27,8 bc
Ac. P	8,8 ab	26,1 bc	27,3 bc
CV%	4,88	4,84	6,48

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (P≤0,05).

pelo fato da testemunha apresentar maior área da colônia (9,4cm²).

Aos 7 dias após o pareamento, todos os actinomicetos testados apresentaram efeito antagônico significativo sobre o crescimento micelial do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, comparados com a testemunha (Tabela 2). Em meio aos antagonistas, o isolado Ac.R se diferiu estatisticamente do isolado Ac.O (Figura 1), apresentando percentuais de inibição de 19,50 e 11,88, respectivamente.

Aos 11 dias depois da formação do pareamento, quando a testemunha preencheu toda a superfície da placa, todos os isolados de actinomicetos inibiram significativamente o crescimento micelial do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Tabela 2). O percentual de inibição variou em relação ao tipo de isolado antagônico utilizado (Figura 1). Sendo que, entre os isolados de actinomicetos testados houve diferença estatística apenas entre os actinomicetos Ac.R, que apresentou o maior percentual de inibição (35,85%) e o isolado de actinomiceto Ac.J, no qual foi observado o menor percentual de inibição (27,59%) (Figura 1).

O antagonismo dos isolados de actinomicetos sobre o *F.*

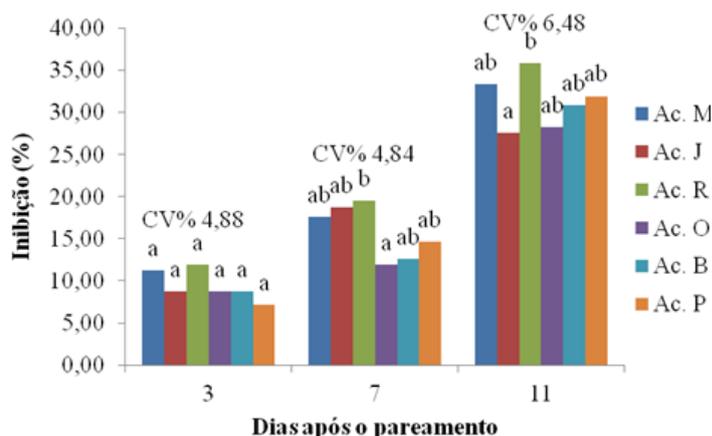


Figura 1 Comportamento do percentual de inibição dos isolados de actinomicetos frente ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*.

oxysporum f. sp. *passiflorae*, provavelmente foi exercido por meio da antibiose, pelo fato dos actinomicetos já apresentarem característica de produzirem antibióticos antifúngicos. Corroborando com Ujikawa (2003) que pesquisou a microbiota de várias partes do Brasil, isolando ao todo 41 cepas de actinomicetos produtoras de antibióticos antifúngicos. Destes 11 eram macrolídeos tetraênicos, 13 macrolídeos pentaênicos, 1 macrolídeo oxopentaênicos, 1 macrolídeo hexaênicos e 6 macrolídeos heptaênicos. Os antibióticos antifúngicos produzidos pelas restantes 9 cepas não eram poliênicos.

Eficiência de 19 isolados de actinomicetos, em condições de laboratório, contra isolados de *Botrytis cinerea* (patógeno da videira), foi observada por Oliveira (2004). Nesta pesquisa foram utilizados 62 isolados de actinomicetos reativados, sendo que 19 (30,7%) apresentaram atividade antagonista contra o fitopatógeno analisado.

Quando Marroni e Germani (2011) avaliaram a eficiência no controle do fungo *Macrophomina phaseolina*, através de isolados de bactérias do gênero *Bacillus*, verificaram que as bactérias isoladas da rizosfera de mamoneira selvagem inibiu o crescimento do fungo em 9% (cepa RZ 1) e 24% (cepa RZ 2), e bactérias isoladas da cultivar mostraram 23% e 21% de inibição com os isolados RZE 4 e RP 2, respectivamente.

Soares et al. (2009) ao avaliarem o efeito de metabólitos secundários produzidos por estreptomicetos na germinação de esporos e no crescimento micelial dos fungos *Cladosporium fulvum* Cooke e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* da cultura do tomateiro, verificaram que metabólitos produzidos pelos isolados AC-147 e AC-92 causaram 94,1% de inibição da germinação de esporos de *C. fulvum*, enquanto que o isolado AC-95 causou 33,9% de inibição. O AC-92 foi o mais eficiente para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causando 94,2% de inibição na germinação de esporos. Para o crescimento micelial, AC-26 e AC-92 foram os mais eficientes na inibição dos fungos *C. fulvum*, com 46,6% de inibição, e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, com 29,9%. Esses resultados mostram a eficiência de actinomicetos, também na inibição da germinação de esporos, sendo estes uma das principais fontes de disseminação de doenças de plantas.

Spadari e Van Der Sand (2010) ao avaliarem a atividade antifúngica de 25 isolados de *Streptomyces* sp. frente a 10 isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana*, através do método de dupla-camada. Constatou-se que o isolado *Streptomyces* 1S apresentou halos de inibição em 100% dos fungos, quando realizado os ensaios de antagonismo, se mostrando promissor no controle biológico a fitopatógenos.

Sousa et al. (2006) avaliaram o efeito de seis isolados de estreptomicetos na mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* e no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. Os metabólitos produzidos por *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* causaram 98,2% de mortalidade dos J2 de *M. incognita*, comprovando a eficiência dos metabólitos sobre os fitonematóides.

Trabalhos já apontaram a eficiência do efeito antagonista *in*

situ de actinomicetos contra fitopatógenos. Coimbra e Campos (2010) estudaram a ocorrência de actinomicetos em rizosfera de diferentes ervas daninhas e de gramíneas e seus efeitos antagonistas e de parasitismo a *Meloidogyne javanica* em tomateiro, sendo que dez isolados de actinomicetos testados em sala climatizada, reduziram significativamente o número de galhas por grama de raiz, variando 27 a 65%. Souza et al. (2009) avaliaram o efeito de estreptomicetos no controle do nematóide *Scutellonema bradys* em túberas de inhame, em casa de vegetação e constataram uma redução de 84,5 a 95,4% no número de nematóides nas túberas inoculadas com os isolados de estreptomicetos.

Observando-se os resultados dos trabalhos supracitados, realizados em condições de laboratório, o antagonismo por antibiose com a utilização de actinomicetos, têm se mostrado promissores no controle de vários tipos de doenças de plantas. Apesar disso, faz-se necessário aprofundamento em estudos que venham avaliar os mecanismos de ação antagonista por competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de resistência, que possam ser exercidos pelos isolados de actinomicetos. Assim, poderia obter maiores suportes para as pesquisas em casa de vegetação e experimentos em condições de campo.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam um grande potencial de controle biológico do *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando-se actinomicetos. A especificidade do antagonismo, observada *in vitro*, aponta para um possível sucesso no controle da murcha de fusarium do maracujazeiro casa de vegetação, ou até mesmo em condições de campo.

Referências

- Araujo JLP e Araújo EP (2007) **Estudo das Relações de Troca do Maracujá Produzido e Comercializado na Região do Submédio São Francisco**. Petrolina, Embrapa Semi-Árido.
- Araújo JM (1998) Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo IS e Azevedo JL (org). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, pp 351-367.
- Coimbra JL, Campos VP (2010) Efeito antagonista de actinomicetos isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** 10: 144-153.
- IBGE (2011) **Banco de dados agregados**. Sistema IBGE de recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl1.asp?c=1613&z=t&o=11&i=P>> Acessado em: 17 de dezembro de 2012.
- Marroni IV, Germani JC (2011) Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L). **Revista Brasileira de Agroecologia** 6: 159-167.
- Oliveira SR (2004) **Atividade antagonista de actinomicetos contra *Botrytis cinerea*, patógeno da videira (*Vitis* sp)**. Dissertação de Mestrado.

- Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciência Biológicas.
Departamento de Antibióticos. Recife – PE.
- Silva AN (2011) **Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro.** Dissertação de Mestrado em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia. Vitória da Conquista – BA, UESB.
- Soares ACF, Sousa CS, Garrido MS (2009) *Streptomyces* antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **Ciência Rural** 39: 1897-1900.
- Sousa CS, Soares ACF, Garrido MS, Lima FS (2009) Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame. **Revista Ciências Agrônômicas** 40: 486-491.
- Souza CS, Soares ACF, Garrido MS, Almeida GMCO (2006) Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41: 1759-1766.
- Spadari CC, Van Der Sand ST (2010) **Atividade Antifúngica de Actinomicetos Frente a Isolados de *Bipolaris sorokiniana*.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Bacharelado em Ciências Biológicas. Trabalho de Conclusão de Curso. Porto Alegre - RS.
- Ujikawa K (2003) Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 39: 149-158.