

BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS E PRÓPOLIS COMO MEDIDAS ECO-AMIGÁVEIS PARA O MANEJO DE MOFO BRANCO EM ZÍNIA

SUELEN CAPPELLARO^{1,2*}, BRENDA TORTELLI³, GABRIELI GIRELLI DE ANDRADE⁴, PAOLA MENDES MILANESI^{2,5}

1 INTRODUÇÃO

O ramo da floricultura no Brasil nas últimas décadas está em forte ascensão, estima-se que a cada um hectare esse setor empregue até oito pessoas. Entre as plantas ornamentais de corte, destaca-se a zínia (*Zinia elegans* Jacq.), entretanto, doenças como o mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* provocam perdas na produção dessas flores (SCHONMAKER, 2018).

Considerada de suporte fitossanitário insuficiente, não existem fungicidas registrados para o controle de mofo branco em zínia. Assim, o controle biológico e alternativo, entre eles o uso de *Bacillus amyloliquefaciens* e própolis, são ferramentas em potencial para o manejo dessa doença.

2 OBJETIVOS

Investigar a redução da incidência e potencial de controle de mofo branco em zínia, a partir de sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com *Bacillus amyloliquefaciens* e extrato etanólico de própolis.

3 METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Fitopatologia e de Microscopia da UFFS-Campus Erechim/RS. O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* foi obtido de escleródios coletados em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.), hospedeiro botânico da família Asteraceae. Em placas

¹ Acadêmica do curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, **Bolsista**, contato: suelen02cappellaro@hotmail.com

² Grupo de Pesquisa: Manejo Sustentável dos Sistemas Agrícolas (MASSA)

³ Mestranda em Agronomia, Universidade de Passo Fundo, *campus* Passo Fundo

⁴ Acadêmica do curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim

⁵ Eng. Agrônoma, Dra. em Agronomia, Professora Adjunta, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, **Orientadora**

de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), os escleródios do fungo foram cultivados, após assepsia prévia, tendo em vista a obtenção de cultura pura. A identidade do isolado foi confirmada por meio de sequenciamento das regiões ITS1 e ITS 4 do rDNA.

Foi realizada a coleta de própolis de abelhas da espécie *Apis mellifera* para o preparo do extrato etanólico de própolis marrom (EEP) na cidade de Gaurama/RS. Diante disso, com a classificação e seleção da própolis, a mesma foi diluída em álcool de cereais (70 °GL) na proporção de 7:3 (volume:massa).

Para a avaliação do crescimento micelial, o isolado de *S. sclerotiorum* foi exposto aos tratamentos: T1) *Bacillus amyloliquefaciens* (SIMBI BS 10; CCT 7600; 5×10^9 UFC mL⁻¹; 0,03 g i.a. mL⁻¹); T2) *Bacillus amyloliquefaciens* (0,045 g i.a. mL⁻¹); T3) *Bacillus amyloliquefaciens* (0,06 g i.a. mL⁻¹); T4) *Bacillus amyloliquefaciens* (0,075 g i.a. mL⁻¹); T5) *Bacillus amyloliquefaciens* (0,09 g i.a. mL⁻¹); para os tratamentos com o extrato etanólico de própolis foi realizada diluições no meio BDA: T6) EEP (1,25%); T7) EEP (2,5%); T8) EEP (5%); T9) EEP (10%); T10) EEP (15%); T11) Álcool de cereais 70%; e T12) Testemunha (apenas BDA).

O crescimento micelial dos isolados foi mensurado com uma régua graduada (mm), por meio de duas medidas em eixos ortogonais, a cada 24 horas, até que na testemunha o patógeno atingisse as bordas da placa. A taxa de inibição do crescimento micelial (ICM, %) foi calculada por: $ICM = [(crescimento \text{ na testemunha} - \text{crescimento no tratamento Y}) / \text{crescimento na testemunha}] \times 100$.

Para os testes com a inoculação do patógeno em sementes, foi utilizado o restritor hídrico manitol (C₆H₁₄O₆) (COUTINHO et al., 2001; TORTELLI et al., 2020), em potencial hídrico de -0,6 Mpa. As sementes de zínia foram distribuídas e levemente prensadas sobre o meio BDA + manitol, em camada única incubadas a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, permanecendo sobre o meio em contato direto com o *S. sclerotiorum* com diferentes tempos de inoculação (3,6, 9, 12, 15 e 18 horas), à medida que as sementes foram sendo removidas foram deixadas secar em papel toalha em temperatura ambiente (CRUCIOL; COSTA, 2017). Por meio de teste de germinação, com 200 sementes, distribuídas em papel *germitest*, incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas (BRASIL, 2009), contabilizou-se ao quinto e décimo dia de incubação as plântulas normais obtidas a partir das sementes inoculadas com o patógeno. Com este teste inicial foi possível estabelecer que o melhor tempo de exposição das sementes de zínia a *Sclerotinia sclerotiorum* foi de 3 horas, garantindo o percentual de germinação (maior ou igual a 80%) e vigor das sementes.

Após estabelecido o tempo de exposição ao inóculo do patógeno as sementes foram

submetidas aos tratamentos: do T1 até o T5 com *Bacillus amyloliquefaciens* (SIMBI BS 10; CCT 7600) nas dosagens respectivamente (1; 1,5; 2; 2,5; 3 mL kg⁻¹ sementes); T6 até o T10 com extrato etanólico de própolis ambos nas mesmas dosagens citadas anteriormente; T11) Controle álcool de cereais (2,0 mL); T12) Testemunha negativa (sementes sem inóculo em meio BDA + manitol); e T13) Testemunha positiva (sementes com inóculo em meio BDA + manitol).

Realizou-se o teste de germinação para cada tratamento, conforme metodologia citada anteriormente, e o teste de incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*, no qual quatro repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes foram distribuídas em gerbox pelo método “blotter test”, incubadas 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por cinco dias. Após analisadas com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, foi determinada a incidência (%) de *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009).

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Sendo os resultados analisados pelo teste Kruskal-Wallis (não-paramétrico) para o ICM e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a germinação e incidência. As análises foram realizadas utilizando o pacote agricolae do programa RStudio (R CORE TEAM, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico de própolis em todas as dosagens testadas (T6 a T10) inibiu o crescimento micelial do isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*, apresentando efeito significativo (Tabela 1).

Tabela 1. Inibição do crescimento de isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* após diferentes tempos de exposição (horas) e submetidos a doses de *Bacillus amyloliquefaciens* (T1 a T5); EEP (T6 a T10); álcool de cereais (T11); e testemunha (apenas BDA; T12).

Tratamentos	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
T1	0,0 a*	75,9 a	78,4 cd	58,9 cd	38,3 ef
T2	0,0 a	62,2 a	78,1 cd	64,5 bcd	61,8 e
T3	0,0 a	74,9 a	86,1 bc	85,8 b	84,2 d
T4	0,0 a	75,9 a	89,3 b	85,2 bc	86,2 cd
T5	0,0 a	75,9 a	90,9 b	86,2 b	89,4 c
T6	0,0 a	75,9 a	92,8 a	93,5 a	94,4 b
T7	0,0 a	75,9 a	92,8 a	93,5 a	94,4 a
T8	0,0 a	75,9 a	92,8 a	93,5 a	94,4 a
T9	0,0 a	75,9 a	92,8 a	93,5 a	94,4 a
T10	0,0 a	75,9 a	92,8 a	93,5 a	94,4 a
T11	0,0 a	75,9 a	92,8 a	93,5 a	94,4 a
T12	0,0 a	0,0 b	0,0 d	0,0 d	0,0 f

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Constatou-se que em todos os tempos de exposição (horas) o EEP teve potencial de inibição, sendo que às 48 horas, esses tratamentos obtiveram percentuais de ICM acima de 90. Em contrapartida, no tratamento com *Bacillus amyloliquefaciens* (T1 a T5) maior inibição do crescimento do patógeno foi obtida nos tratamentos T4 e T5.

Com relação a germinação, os tratamentos que foram significativo: T4 (*Bacillus amyloliquefaciens*, 2,5 mL kg⁻¹ sementes), T6 e T7 (EEP, 1 e 1,5 mL kg⁻¹ sementes). As menores doses do EEP já foram suficientes para controlar o patógeno e assegurar a germinação, entretanto, o tratamento com álcool de cereais (T11) prejudicou completamente a germinação (Tabela 2). Cabe destacar que tanto *Bacillus amyloliquefaciens*, quanto o EEP não conseguiram garantir um percentual de germinação acima de 35%, demonstrando a necessidade de mais avaliações para verificar a eficácia desses tratamentos *in vivo*.

Tabela 2. Germinação (%) de sementes de zínia e incidência (%) de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes inoculadas e posteriormente tratadas com doses de *Bacillus amyloliquefaciens* (T1 a T5) e extrato etanólico de própolis marrom (EEP, T6 a T10); álcool de cereais (T11); Testemunha negativa (T12, sementes sem inóculo em meio BDA + manitol); e Testemunha positiva (T13, sementes com inóculo em meio BDA + manitol).

Tratamentos	Germinação	Incidência
	----- % -----	
T1	31,7 bcd*	80,0 b
T2	28,0 cd	76,0 b
T3	27,5 d	71,0 bc
T4	34,2 ab	57,0 d
T5	30,0 bcd	40,5 e
T6	33,5 abc	75,0 b
T7	33,5 abc	60,5 cd
T8	32,0 abcd	49,0 de
T9	32,2 abcd	40,0 e
T10	31,7 bcd	22,5 f
T11	0,0 f	100,0 a
T12	37,5 a	0,0 g
T13	16,5 e	100,0 a
C.V. (%)	7,9	8,8

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O tratamento que promoveu menor incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* foi o T10 (EEP, 3 mL kg⁻¹ sementes), similarmente ao que Vieira et al. (2011), constataram frente a redução dos

fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Colletotrichum*. Porém, os tratamentos T5, T8 e T9 reduziram mais de 50% a incidência do patógeno nas sementes (Tabela 2).

5 CONCLUSÃO

A maior inibição do crescimento do patógeno por *Bacillus amyloliquefaciens*, às 96 horas de exposição ao antagonista, é garantida pelas doses 0,09 e 0,075 g i.a. mL⁻¹.

Em 48 horas de exposição o extrato etanólico de própolis marrom (EEP) assegura inibição maior que 90% no crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, mesmo na menor dose testada (1,25%).

Bacillus amyloliquefaciens e o EEP não incrementam a germinação de sementes de zínia inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*.

O EEP e *Bacillus amyloliquefaciens*, na dose 3 mL kg⁻¹ sementes, reduzem a incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de zínia em 77,5% e 59,5%, respectivamente, e apresentam potencial para uso em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA, 2009a. 395. p.
- COUTINHO, W. M. et al. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água. **Revista Brasileira Sementes**, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.
- CRUCIOL, G. C. D.; COSTA, M. L. N. Influence of *Macrophomina phaseolina* inoculation methodologies on the performance of soybean cultivars. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 32-37, 2017.
- SCHOENMAKER, K. **O mercado de flores no Brasil** (2018). Disponível em: Acesso em: http://354d6537-ca5e-4df4-8c1b-3fa4f2dbe678.filesusr.com/ugd/b3d028_424e52e4b94549308df7321829759faa.pdf>. Acesso em: 21 julh. 2021.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2019. Disponível em:<<https://www.R-project.org/>>.
- TORTELLI, B. et al. Treatments for *Sclerotinia sclerotiorum* on Inoculated Bean Seeds and Effects on Health and Physiological Quality, **Journal of Agricultural Studies**, v.8, n. 1, p. 371-386, 2020
- VIEIRA, G. H. C.; DARDANI, P.; ANDRADE, W. P. Efeitos do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão. **Cadernos de Agroecologia**, v. 5, n.1, 1-4, 2011.

Palavras-chave: *Zinnia elegans* Jaqu.; *Sclerotinia sclerotiorum*; biocontrole; apiagricultura; vigor

Nº de Registro no Sistema Prisma: PES-2020-0298.

Financiamento: UFFS.