



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE RIZOBACTÉRIAS NATIVAS DE SOLOS DO OESTE DO PARANÁ SOBRE *Pyricularia graminis-tritici*.

Sabrina Holz¹, Anderson Scherer², Vivian Carré Missio¹, Luciana Grange¹, Roberto Luis Portz¹, Paulo Cezar Ceresini³, Wesler Luiz Marcelino¹

¹Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina, PR. Departamento de Ciências Agronômicas, sabrinaholz16@gmail.com, carremissio@gmail.com

²Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina, PR. Departamento de Biotecnologia.

³Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira. Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos

RESUMO: A brusone do trigo causada por *Pyricularia graminis-tritici* é uma doença da cultura do trigo, que ataca as espigas, ocasionando grandes perdas. Tem-se muitas dificuldades para o controle químico e genético dessa doença então o controle biológico surge como uma forma alternativa, utilizando rizobactérias como agentes de biocontrole. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da liberação de compostos voláteis de isolados de rizobactérias da região oeste do Paraná no controle do patógeno *P. graminis-tritici*. Os ensaios *in vitro* contaram com 11 tratamentos, contendo gêneros de *Bacillus*, *Falsibacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Delftia* e *Azospirillum*, e um tratamento controle somente com o fungo. Utilizou-se de placas bipartidas colocando um microrganismo de cada lado, sendo o patógeno em meio de cultura farinha de aveia e a bactéria meio King B. Cada repetição foi constituída por uma placa, utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Repicou-se o patógeno cinco dias antes e após a bactéria sendo os 11 tratamentos citados acima. Em seguida realizaram-se dois testes a fim de analisar a interferência de diferentes tempos de estabelecimento dos microrganismos. O primeiro adicionando os dois microrganismos no mesmo dia e o segundo deixando a bactéria crescer dois dias e após repicando o fungo, para esses dois testes realizou-se apenas com três rizobactérias (203 - *Enterobacter*, 208 - *Delftia* e 56 - *Bacillus* 631), as quais demonstraram maior potencial de inibição em outro experimento de teste de antagonismo com as mesmas estirpes. As placas foram mantidas por sete dias em B.O.D, com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 h. Avaliou-se a inibição do crescimento micelial do patógeno com uma régua e os dados submetidos a ANOVA e teste Tukey 5%. Após a avaliação, no primeiro teste observou-se que o patógeno teve um crescimento expressivo devido os cinco dias de crescimento anterior, mas mesmo assim seis diferiram estatisticamente do controle. No segundo teste, a bactéria 203 (*Enterobacter*) diferiu-se do controle, e para o terceiro teste não houve diferença estatística, porém destaca-se que para esses dois últimos testes o patógeno teve um crescimento radial parecido com o controle, mas não teve um crescimento micelial aéreo expressivo, sendo um indicativo de inibição pela liberação de compostos voláteis.

Palavras-chave: Brusone do trigo; Isolados bacterianos; Biocontrole; Volatilização.

INTRODUÇÃO

A brusone do trigo, é uma doença causada por *Pyricularia graminis-tritici* descrita recentemente por Castroagudín et al., (2016), na forma teleomorfica *Magnaporthe grisea* (Hebert), esta doença pode proporcionar muitas perdas para cultura, em peso por espiga de até



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

72,5%, dependendo da época da infecção (GOULART e PAIVA, 2000).

Para o patossistema *P. graminis-tritici* - trigo, vários estudos demonstram que é baixa a eficiência dos fungicidas no controle da doença, principalmente pela dificuldade de atingir o alvo na espiga (ROCHA et al., 2014). Para o controle genético a dificuldade encontrada é devido às poucas fontes de resistência encontradas em trigo comum (CRUZ et al., 2010).

Dessa forma, as rizobactérias surgem como uma opção de microrganismo para controle biológico desse patossistema (SOUZA-JUNIOR et al., 2010). Dentre os gêneros de bactérias utilizados como *Pseudomonas*, *Bacillus* spp., e a família Enterobacteriaceae, destacam-se as *Bacillus* spp. por apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos (CAMPOS SILVA et al., 2008).

A ampla utilização desses microrganismos no biocontrole é devido à abundância de mecanismos de ação que podem possuir a ação direta contra fitopatógenos, pela antibiose, síntese de substâncias antimicrobianas, compostos antibióticos e voláteis agindo na supressão de patógenos, e pela competição por espaço e nutrientes (ROMEIRO, 2007).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da liberação de compostos voláteis de isolados de rizobactérias da região oeste do Paraná no controle do patógeno causador da brusone do trigo (*Pyricularia graminis-tritici*).

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Para a realização do experimento foram utilizadas placas de poliestireno divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo meio de farinha de aveia, foi adicionado um disco de micélio do fitopatógeno. No outro lado da placa contendo o meio King B, após cinco dias do estabelecimento do fungo foram adicionadas às bactérias. O isolado *Pyricularia graminis-tritici* foi fornecido pelo professor Paulo Ceresini da UNESP, Ilha Solteira.

Os tratamentos utilizados foram 208 (*Delftia*), 203 (*Enterobacter*), 493 (*Enterobacter*), 102 (*Bacillus* 304), 56 (*Bacillus* 631), 121 (*Bacillus* 613), 81 (*Falsibacillus* 812), 15 (*Falsibacillus* 259), 188 (*Paenobacillus* 1130), e *Azospirillum* Embrapa como padrão, consistindo em 11 tratamentos totais sendo um controle contendo apenas o fungo de um lado e do outro somente o meio King B. A avaliação do crescimento micelial foi realizada após sete dias a partir do dia em que se repicaram as bactérias, com o auxílio de uma régua



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

milimétrica tirou-se as medidas. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri bipartida.

Foram realizados também dois testes apenas com as bactérias 203, 208 e 56 a fim de analisar a interferência em relação ao tempo de estabelecimento de cada microrganismo. Esses três isolados (203, 208 e 56) foram selecionados para esse teste por apresentarem melhor desempenho antagônico em outro experimento com as mesmas estirpes. No ensaio 1 a bactéria e o fungo foram repicados no mesmo dia na placa de Petri bipartida; no ensaio 2 inicialmente repicou-se a bactéria e após dois dias foi repicado um disco de meio de cultura contendo *P. graminis-tritici*. A avaliação da inibição do crescimento de *P. graminis-tritici* foi realizada após sete dias da repicagem do patógeno.

As placas foram mantidas em B.O.D a 24 °C sob fotoperíodo de 12h, e os dados submetidos a ANOVA e teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste primeiro teste, em função do crescimento lento que o fitopatógeno possui, colocou-se o fungo para crescer cinco dias antes da repicagem das bactérias do outro lado da placa. Os resultados de inibição do crescimento micelial de *P. graminis-tritici* são apresentados na Tabela 1,

Tabela 1. Efeito de compostos voláteis de isolados de rizobactérias sobre o crescimento micelial de *Pyricularia graminis-tritici*.

Tratamentos*	Crescimento micelial (cm)	
	5 dias	12 dias
81 (<i>Falsibacillus</i> 812)	3,0600 a	5,1400 a
102 (<i>Bacillus</i> 305)	3,0400 a	5,4400 a
121 (<i>Bacillus</i> 613)	3,1400 a	5,4600 a
56 (<i>Bacillus</i> 631)	3,1200 a	5,4800 a
188 (<i>Paenibacillus</i> 1130)	3,1200 a	5,5200 a
15 (<i>Falsibacillus</i> 259)	3,1200 a	5,7000 a
203 (<i>Enterobacter</i>)	3,1400 a	5,7400 ab
<i>Azospirillum</i> Embrapa	3,0400 a	5,7800 ab
208 (<i>Delftia</i>)	3,2000 a	5,8400 ab
493 (<i>Enterobacter</i>)	3,2400 a	5,8600 ab
Controle	3,3600 a	6,4400 b
C.V. (%)	5,85	6,05

C.V.: Coeficiente de variação em percentagem (%).

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste tukey ($P \leq 0,05$)

*Os tratamentos utilizados fazem parte da coleção de cultura da UFPR, Palotina.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

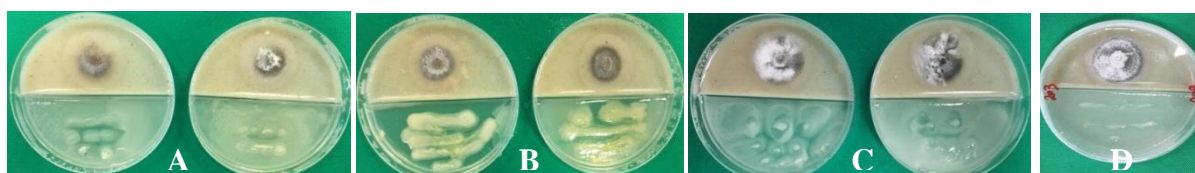
7 a 9 de Fevereiro de 2017

Pelos resultados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que não houve diferença estatística entre as rizobactérias testadas na inibição do crescimento micelial de *P. graminis-tritici*, mas algumas se diferiram do tratamento controle. Acredita-se que as rizobactérias possam ter liberado compostos voláteis, mas devido o crescimento do fungo cinco dias antes, elas não conseguiram inibi-lo significativamente.

No segundo teste, o experimento foi conduzido colocando os dois microrganismos no mesmo dia e avaliando após sete dias (FIGURA 2) com as estirpes 208 (*Delftia*), 203 (*Enterobacter*) e 56 (*Bacillus* 631).

Pode-se verificar que o fitopatógeno teve um crescimento micelial radial semelhante ao da placa controle que continha apenas o fitopatógeno. Entretanto, apesar de haver crescimento em área semelhante percebe-se que não há um crescimento micelial aéreo expressivo do fungo, principalmente para as placas em que há o confronto de *P. graminis-tritici* com o isolado 208 (*Delftia*) e 203 (*Enterobacter*) (FIGURA 3). Pode-se considerar que a ausência do crescimento aéreo de *P. graminis-tritici* seja um indicativo do efeito de algum composto volátil produzido por esses isolados bacterianos sobre o desenvolvimento do patógeno.

Figura 2. Efeito de compostos voláteis após 7 dias com o fungo e as rizobactérias. A - 208 (*delftia*), B - 203 (*enterobacter*), C - 56 (*bacillus* 631) e D – placa controle.



Observando a tabela verifica-se que os tratamentos não diferiram entre si, mas o tratamento 203 (*Enterobacter*) demonstrou uma diferença significativa do controle (TABELA 5). Demonstrando que há alguma influência no meio, podendo ser compostos liberados pelas bactérias.

Tabela 2. Crescimento do fungo sob compostos voláteis das bactérias após 7 dias com os dois microrganismos.

Crescimento em função de compostos voláteis (cm)	
Tratamentos*	7 dias
203 (<i>Enterobacter</i>)	3,3400 a
208 (<i>Delftia</i>)	3,4000 ab
56 (<i>Bacillus</i> 631)	3,5800 ab



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Controle	3,7200 b
C.V. (%)	5,18

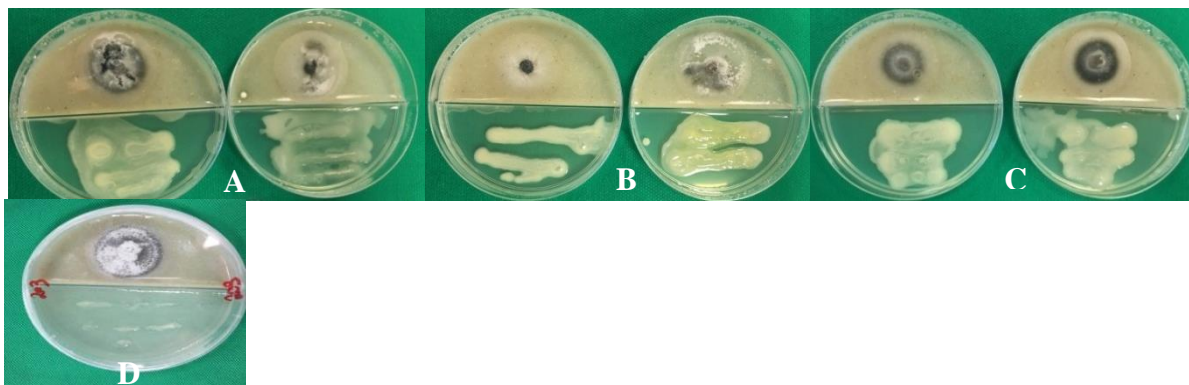
C.V.: Coeficiente de variação em porcentagem (%).

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

*Os tratamentos utilizados fazem parte da coleção de cultura da UFPR, Palotina.

No terceiro teste, conduziu-se o experimento colocando primeiro os isolados de rizobactérias, e após dois dias repicou-se o fungo do outro lado da placa (FIGURA 3), com as rizobactérias 208, 203 E 56, utilizando uma placa controle em que fungo está com sete dias de crescimento. Observou-se que ocorreu algo semelhante ao segundo teste, em que o fitopatógeno teve um crescimento micelial radial, porém sem desenvolvimento aéreo, havendo uma anormalidade no seu desenvolvimento. A análise de variância (ANOVA), não foi significativa pelo teste de tukey, para os tratamentos testados, todos obtiveram o mesmo desempenho comparando com o controle.

Figura 3. Efeito de compostos voláteis com as rizobactérias 2 dias antes do fungo. A - 208 (*Delftia*), B - 203 (*Enterobacter*), C - 56 (*Bacillus* 631) e D – placa controle.



Muitas substâncias podem estar envolvidas na ação de antagonismos de agentes de biocontrole, tais como alcoóis, aldeídos, cetonas, sulfetos entre outros, os quais são citados por Duffy et al., (2003) como compostos voláteis com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias. Knox et al., (2000), encontraram inibição de *Fusarium oxysporum*, ocasionado por isolados de *B. subtilis* através da produção de compostos voláteis.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados, observa-se que houve uma redução no crescimento micelial aéreo de *P. graminis-tritici*, sendo um indicativo da ação de antagonismo dos isolados testados pela volatilização de substâncias antimicrobianas.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTIOL, W. Biocontrole na Filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.59-97. 1997.

CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CASTROAGUDÍN, V.L.; MOREIRA, S.I.; PEREIRA, D.A.S.; MOREIRA, S.S., BRUNNER, P.C.; MACIEL, J.L.N.; CROUS P.W.; MCDONALD, B.A.; ALVES, E.; CERESINI, P.C. *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov., a new *Pyricularia* species causing wheat blast. UNESP- Universidade de São Paulo, Ilha Solteira. 2016.

FILHO-LANNA, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**. V. 4, N. 2, p. 12, 2010.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F.A. Perdas no rendimento de grãos de trigo causadas por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica** 26:279-282. 2000.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 369–409, 1993.

ROCHA, J.R.A.S.C.; PIMENTEL, A.J.B.; RIBEIRO, G.; SOUZA, M.A.S. Eficiência de fungicidas no controle da brusone em trigo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 4, p. 347-352, 2014.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças em plantas: Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, 269p 2007.

SOUZA-JUNIOR, I. T.; MOURA, A. B.; SCHAFER, J. T.; CORREA, B. O.; GOMES, C. B. Biocontrole da queima das bainhas e do nematóide das galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.11, p.1259-1267, nov. 2010.