



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

AVALIAÇÃO DE ANTAGONISMO *IN VITRO* DO EMBATE *Pyricularia graminis-tritici* VERSUS RIZOBACTÉRIAS NATIVAS DE SOLOS DO OESTE DO PARANÁ

Sabrina Holz¹, Anderson Scherer², Vivian Carré Missio¹, Luciana Grange¹, Cleonice Lubian¹, Roberto Luis Portz¹, Paulo Cezar Ceresini³

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 cultura do trigo está entre as culturas mais importantes visando a alimentação humana. Dentre as limitações da cultura, destacam-se as doenças, como a brusone do trigo causada por *Pyricularia graminis-tritici* que ataca as espigas ocasionando grandes perdas. Tendo em vista a dificuldade do controle químico e genético, surge o controle biológico como uma forma alternativa, utilizando rizobactérias como agentes de biocontrole, devido a gama de mecanismos de ação que possuem com ação direta contra fitopatógenos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o antagonismo *in vitro* de isolados de rizobactérias da região oeste do Paraná com potencial no controle do patógeno *P. graminis-tritici*. Os ensaios contaram com 11 tratamentos, contendo gêneros como *Bacillus*, *Falsibacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Delftia* e *Azospirillum*, e um tratamento controle somente com o fungo. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri, utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Utilizou-se do método da cultura pareada em que se repicou primeiramente o fungo no centro da placa sete dias antes em meio de cultura farinha de aveia, devido o crescimento lento do patógeno. Após o período, adicionaram-se as bactérias dispendo equidistantes e próximas à borda da placa. Realizou-se dois testes, o primeiro foi uma seleção das melhores analisando após sete dias e o segundo com as bactérias restantes, sendo uma análise quantitativa avaliando aos 15 e 20 dias. As placas foram mantidas em B.O.D, com temperatura de 24°C e fotoperíodo 12 hrs, avaliou-se a inibição medindo o crescimento da colônia com uma régua e após submeteu-se os dados a ANOVA e teste Tukey 5%. Após avaliação o destaque foi para estirpe 56 (*Bacillus* 631), que proporcionou a maior inibição do crescimento micelial de *P. graminis-tritici*, diferindo-se dos demais. As estirpes 203 (*Enterobacter*) e 208 (*Delftia*), também apresentaram um bom desempenho na inibição do patógeno. Outros ensaios devem ser realizados para afirmar os dados obtidos, como o método do filtrado para detecção de antibióticos e testes *in vivo*.

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

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

Os sintomas da doença são caracterizados pelo aparecimento de espigas brancas a



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

partir do ponto de penetração, sendo que ocasiona a morte da espiga deste ponto em diante. O patógeno pode sobreviver em hospedeiros secundários e os restos culturais de plantas cultivadas e sementes. (KIMATI et al., 2005).

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).

Haja visto, que há limitações no controle químico e genético para esse patossistema, surge então o controle biológico como uma forma alternativa no manejo integrado de doenças para supressão da enfermidade (FILHO-LANNA et al., 2010).

Dessa forma, as rizobactérias, surgem como uma opção de microrganismo de biocontrole (SOUZA-JUNIOR et al., 2010). Dentre os gêneros de bactérias utilizados como *Pseudomonas*, *Bacillus* spp., e a família Enterobacteriaceae, destaca-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 antagonismo *in vitro* de isolados de rizobactérias da região oeste do Paraná com potencial 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 realizaçãodos ensaios *in vitro* de antagonismo foi empregado o método de Cultura Pareada segundo (MARIANO, 1993) com modificações. Cada placa de Petri contendo o meio de cultura farinha de aveia, recebeu um disco de micélio do patógeno de 5 mm de diâmetro no centro da placa, devido crescimento lento do fungo deixou-se crescer por sete dias e após retirou-se uma pequena alíquota da colônia da bactéria, dispondo equidistantes e próximas à borda da placa. O isolado *Pyricularia graminis-tritici* foi fornecido pelo professor Paulo Ceresini da UNESP, Ilha Solteira.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Realizaram-se dois testes de antagonismo, sendo o primeiro com as dez estirpes de rizobactérias (208 (*Delftia*), 203 (*Enterobacter*), 493 (*Enterobacter*), 102 (*Bacillus* 304), 56 (*Bacillus* 631), 81 (*Falsibacillus* 812), 15 (*Falsibacillus* 259), 188 (*Paenobacillus* 1130), *Azospirillum* comercial e *Azospirillum* Embrapa como padrão) e um controle somente com o fungo, no intuito de fazer uma seleção inicial das mesmas, identificando as que apresentavam melhor potencial antagonístico sendo para este uma avaliação qualitativa, pela observação visual das placas identificando os isolados com maior um potencial de inibição ou competição com o fungo fitopatogênico pela restrição do desenvolvimento da colônia. Foram cinco repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC). A avaliação ocorreu após sete dias da repicagem.

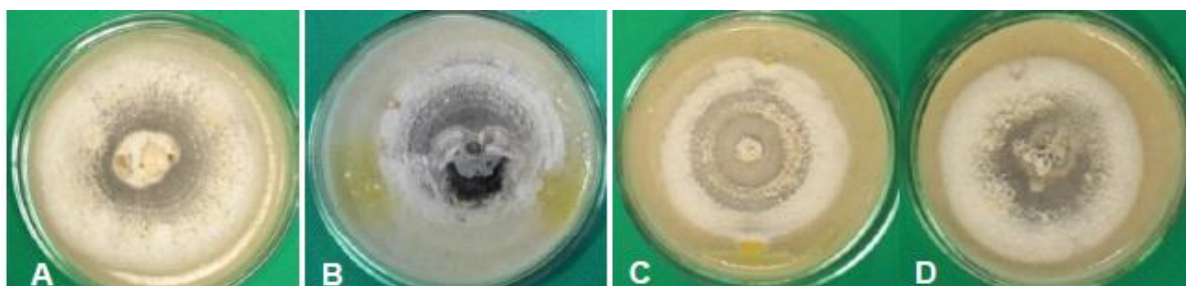
O segundo teste de antagonismo foi realizado com as rizobactérias restantes, que tiveram melhor comportamento antagonístico contra *Pyricularia*. Para este teste, a primeira avaliação ocorreu após oito dias e a segunda medida 13 dias após a repicagem das bactérias.

Para ambos os testes as placas foram mantidas em B.O.D sob temperatura de 24°C com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro e o as medidas foram retiradas com auxílio de uma régua milimétrica. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software SISVAR e teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de seleção dos isolados de bactérias com maior potencial de antagonismo, foram descartados os microrganismo de número 188 (*Paenobacillus* 1130), 493 (*Enterobacter*) e *Azospirillum* comercial. Essas bactérias não interferiram no crescimento de *P. graminis-tritici*, o qual não teve dificuldade em crescer por toda a placa (FIGURA 1).

Figura 1. Bactérias com menor potencial de inibição à *P. graminis-tritici*, sendo A – placa controle, B - *Azospirillum* comercial, C- isolado 493 (*Enterobacter*) e D – isolado 188 (*Paenobacillus* 1130).





XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Os resultados obtidos com o segundo teste *in vitro* sendo realizado eliminando as três bactérias citadas acima, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito antagonico das rizobactérias sobre o crescimento micelial do fungo após 15 e 20 dias.

Medida do crescimento micelial (cm)				
Tratamentos*	7 dias	15 dias	Tratamentos	20 dias
56 (<i>Bacillus</i> 631)	3,75 a	4,3000 a	56	4,2000 a
203 (<i>Enterobacter</i>)	3,75 a	4,6800 ab	208	4,5200 a
208 (<i>Delftia</i>)	3,75 a	4,7400 ab	203	5,1000 ab
81 (<i>Falsibacillus</i> 812)	3,75 a	5,8200 bc	Azo Embrapa	6,7600 bc
<i>Azospirillum</i> Embrapa	3,75 a	5,8600 bc	81	7,1400 c
15 (<i>Falsibacillus</i> 259)	3,75 a	6,2800 c	15	7,6000 c
102 (<i>Bacillus</i> 305)	3,75 a	6,9000 c	102	8,2000 c
Controle	3,75 a	6,6600 c	Controle	7,9000 c
C.V. (%)	0,0	11,42	C.V. (%)	15,32

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 antagonismo *in vitro* alguns dos isolados bacterianos diminuiram significativamente o crescimento micelial de *Pyricularia* quando comparados com a testemunha (TABELA 1). O isolado de rizobactéria 56 (*Bacillus* 631) destacou-se com uma maior inibição já nos 15 dias após a repicagem, diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos. Aos 20 dias após a repicagem, observamos que o isolado 56 manteve a inibição, as bactérias 208 (*Delftia*) e 203 (*Enterobacter*) também apresentaram diferença, porém estas necessitaram de mais tempo para isso.

As imagens apresentadas na Figura 2 demonstram que houve ação antagonista dos isolados 56, 203 e 208. Na Figura 4, são apresentadas as bactérias que desempenharam menor potencial de inibição do fitopatógeno.

Figura 2. Inibição do crescimento micelial de *P. graminis-tritici* pela presença de isolados de rizobactérias, sendo A – placa controle, B – isolado 56 (*Bacillus* 631), C – isolado 203 (*Enterobacter*) e D – isolado 208 (*Delftia*)



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

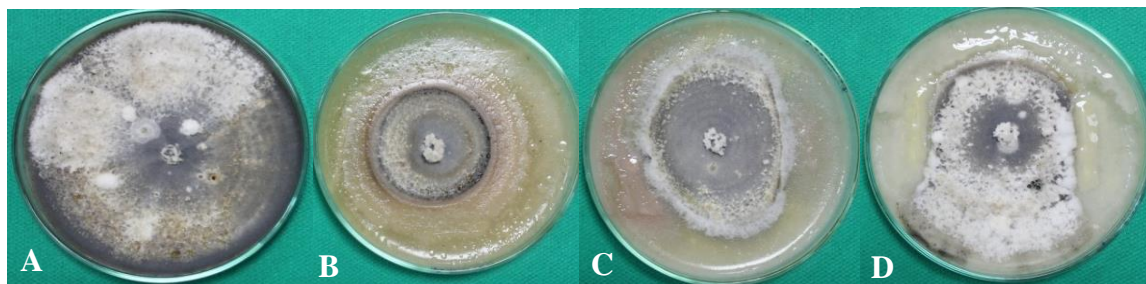
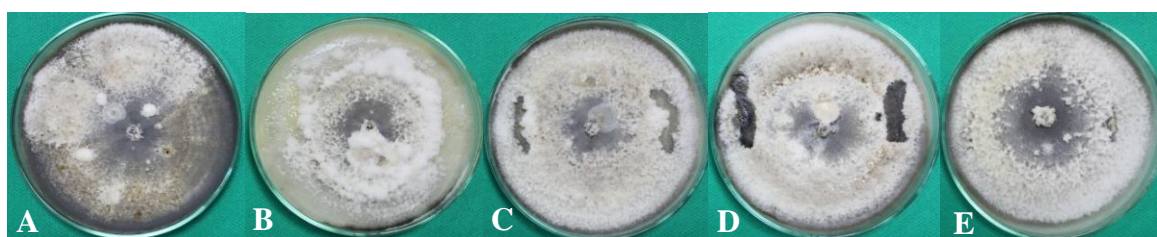


Figura 3. Crescimento micelial de *P. graminis-tritici* pela presença de isolados de rizobactérias, sendo A – placa controle, B - *Azospirillum* embrapa, C – isolado 81 (*Falsibacillus* 812), D – isolado 15 (*Falsibacillus* 259) e E – isolado 102 (*Bacillus* 305).



Trabalhos demonstraram a atividade antagônica de *B. subtilis* a *Pyricularia oryza* (brusone do arroz) através da aplicação em sementes e parte aérea. Empregando seus metabólitos considera-se algo bastante promissor para o avanço do controle biológico para esse patossistema (BETTIOL, 1997).

Schallmey et al., (2004) mencionam que isolados bacterianos do gênero *Bacillus* possuem alto potencial para secretar enzimas degradativas como por exemplo, as quitinases.

CONCLUSÃO

Pode-se considerar que o isolado 56 (*Bacillus* 631) apresentou bons resultados no teste de antagonismo, comportando-se como forte candidata ao bicontrol de *P. graminis-tritici*, assim como a 203 (*Enterobacter*) e 208 (*Delftia*), que também apresentaram um desempenho satisfatório.

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,



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

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.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN, A. F. **Manual de Fitopatologia, vol. 2, doenças das plantas cultivadas** 4^o Ed. São Paulo: Agronômicas Ceres. 2005.

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.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. **Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production**. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 50, p. 1-17. 2004.

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.