

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA HOLZ

Avaliação antagônica do embate *Pyricularia graminis-tritici* versus rizobactérias
nativas de solos do oeste do Paraná

PALOTINA

2016

SABRINA HOLZ

Avaliação antagônica do embate *Pyricularia graminis-tritici* versus rizobactérias
nativas de solos do oeste do Paraná

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Agronomia da Universidade
Federal do Paraná, Setor Palotina, como
requisito à obtenção do título de grau obtenção
de Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dr. Vivian Carré Missio

PALOTINA

2016

Aos meus pais Ademir e Eliane, por todo amor, apoio e força que deram durante esta etapa da minha formação acadêmica.

Ao meu irmão Ricardo, pelo carinho e afeto.

DEDICO

Ao meu namorado Jonathan, por todo amor e companheirismo e a todos os amigos e professores que fizeram parte da minha formação e auxiliaram de alguma forma.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por tudo que tenho e que sou, por toda paciência que tem me dado e pela presença constante ao meu lado me protegendo e abençoando meu caminho e me mostrando sempre que nele eu posso confiar. Agradeço a Mãe Rainha, Nossa Senhora Aparecida, por me guiar, iluminar e estar presente em meus dias. Ao Espírito Santo por todo discernimento e calma para lidar com as situações.

Agradeço muito a minha família, aos meus pais por toda educação, por tantos ensinamentos, a dedicação nas coisas que fazemos, ao amor, carinho e afeto que nunca faltou e pelo exemplo de pessoas que são. Ao meu pai, Ademir Miguel Holz, por me passar o amor que tem pela agricultura, por tantos conhecimentos, experiências e por toda ajuda nesse período acadêmico, tantas vezes tirando minhas dúvidas e me incentivando em continuar estudando e nunca desistir dos meus sonhos, “Você é o meu paizão, literalmente”. A minha mãe, Eliane Maria Holz, por toda oração dedicada a mim, pois em oração sempre estamos juntas. Agradeço por todo amparo que me dá, o companheirismo, apoio, discernimento, e por tantas vezes me dizer: “calma, que tudo vai dar certo, pede pro Espírito Santo”. Ao meu irmão, Ricardo Luis Holz, por todo empenho e ajuda que sempre me deu e ser meu parceiro de visitar a lavoura e passar seus conhecimentos. Agradeço também ao meu Avô, Ernesto Sebaldo Holz, por toda sabedoria, pela alegria e humor que só ele tem. Enfim, não é fácil sair de casa e cortar o cordão umbilical, mas obrigada por acreditarem em mim e quero trazer muito orgulho para vocês. “Eu amo vocês família”.

Agradeço ao meu namorado Jonathan Durante, por toda paciência, parceria, companheirismo, a nunca desistir de mim, por estar comigo em todos os momentos, por tanto carinho, amor e afeto que temos um com o outro. Você me entende, me conhece, me aguenta e eu te amo muito.

Aos amigos que a Universidade me presenteou, saibam que cada um está guardado em meu coração. Agradeço a todos da IV turma de Agronomia da UFPR - Palotina, em especial a Ana Claudia P. Casagrande, Marinara Ferneda Ventorim, Vinicius Gabriel C. Pereira, Eduardo Mazotti, Lucas Senhor da Silva, Luisa Baccin, Thiago Marangoni, Tiago Weber Land e Wesler Marcelino por toda parceria, amizade, por tantos momentos vividos nesses 4 anos e meio, pois com a dedicação,

esforço, humor e alegria de cada um de vocês, as coisas se tornavam mais fáceis e torço muito pelas conquistas de todos. A Samara Moreira Perissato minha colega de quarto e amiga, pela convivência, amizade e por toda ajuda nesses anos, antes e durante a vida acadêmica. A minha prima Leticia Holz pelo convívio e amizade nesse último semestre. Aos meus amigos de infância, Jéssica Lara da Costa e Jonatan Arantes, que apesar da distância, sempre estamos juntos de alguma forma. Aos meus amigos do laboratório, Manoel Penachio e Fernando Gonçalves por todo apoio e ajuda nos projetos e parceira nos congressos.

Agradeço a Cleonice Lubian, que auxiliou na estatística do trabalho, tirando minhas dúvidas e me ajudando.

Ao todos os professores, que fizeram parte da minha formação acadêmica. Aos Professores da fitopatologia Roberto Luis Portz e Vivian Missio pelo auxílio e por disponibilizarem o laboratório para a realização do meu trabalho, em especial a minha orientadora Prof^a Vivian Carré Missio, pela orientação, paciência, sabedoria e por me mostrar que sempre é preciso ter cautela nos trabalhos em laboratório e pelo incentivo em continuar a vida acadêmica seguindo na área de fitopatologia.

A professora, Luciana Grange e ao grupo de estudos FIXTEC, sou muito grata pela disponibilização das rizobactérias para que eu pudesse realizar meu experimento. Em especial, agradeço muito ao Anderson Scherer e Lucas Hass que não mediram esforços para me ajudar com as “bac”.

Ao Professor Paulo Ceresini da UNESP, de Ilha Solteira, por disponibilizar os isolados de *Pyricularia graminis-tritici*, para a realização do trabalho.

Aos técnicos do DCA, que sempre estiveram dispostos a auxiliar.

Agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente fizeram parte do meu trabalho e da minha formação acadêmica.

*“É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito
É saber sonhar
E então fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar ♪”*

Ana Vilela

RESUMO

A cultura do trigo está entre as culturas mais importantes visando à 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 isolados de rizobactérias da região oeste do Paraná com potencial de uso no controle do patógeno *P. graminis-tritici*. Os ensaios in vitro contaram com doze tratamentos contendo gêneros distintos de bactérias, sendo *Bacillus*, *Falsibacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Delftia* e *Azospirillum*, e o 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 colocou-se primeiramente o fungo no centro da placa sete dias antes em meio de cultura farinha de aveia. Após o período, adicionaram-se as bactérias dispendo equidistantes e próximas à borda da placa. Para o teste de compostos voláteis utilizou-se de placas bipartidas com os microrganismos um de cada lado, sendo o fungo em meio farinha de aveia e as bactérias em King B. Para ambos os testes, as placas foram mantidas por sete dias em B.O.D, com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 hrs e avaliou-se a inibição do crescimento micelial do patógeno. Para o ensaio de antagonismo o destaque foi para o isolado 56 (*Bacillus* 631), que propiciou a maior inibição do crescimento micelial de *P. graminis-tritici*, diferindo-se dos outros isolados, assim como a 203 (*Enterobacter*) e 208 (*Delftia*), que também tiveram bom desempenho. Para o teste de compostos voláteis, foi observada inibição do desenvolvimento de *P. graminis-tritici* pela observação visual do menor crescimento micelial aéreo do fungo, porém não houve diferença estatística significativa em relação às medias de inibição do crescimento micelial. 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.

ABSTRACT

Wheat crops is one of the most important food source for population. Among culturing limitations diseases highlight, such as, wheat light caused by *Pyricularia graminis-tritici* whose ear attack leads to huge productive losses. Considering chemical and genetic difficulties to control this pathogen, biological control using Rizobacteria as agents is a great alternative, due to theirs several action mechanism being direct against phytopathogens. Therefore, this study aimed to evaluated rozobacteria isolates from west of Paraná state and check the potential against P.graminis-tritici. All *in vitro* assays had 12 treatments containing different bacteria genus, as *Bacillus*, *Falsibacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Delftia* and *Azospirillum*. Control treatment only contemplated fungi. There were five repetitions, each one evolving on Petri plate, using completely randomized design (CRD). Matched culture method was employed adding, seven days before, the fungus on the plate center containing oatmeal flour medium. Following this period, bacteria were equidistantly added, near plate side. For volatile compounds test, polystyrene dishes 94 x 16 mm divided into two parts were used, containing microorganisms side to side, fungi in oatmeal flour medium and bacteria in King B. medium. To both tests plates remained into B.O.D, under 24° C temperature, 12-hour photoperiod during seven days. Pathogen mycelia growth inhibition was evaluated. To antagonism test 56 isolate (*Bacillus* 631) stand out, due to higher inhibition to mycelia growth of *P. graminis-tritici*, unlike other isolates, such as 203 (*Enterobacter*) and 208 (*Delftia*), that had great performance. Observations at naked eyes revealed less mycelia growth of fungus, however statistical results did not present significance compared to other medias. Other trials should be performed to confirm obtained data, using filter method to detect antibodies, beyond *in vivo* tests.

Key-Words: Wheat Blast; Bacterial isolates; Biocontrol; Antagonism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: CONFIGURAÇÃO DO ENSAIO “ <i>in vitro</i> ” EM PLACA DE PETRI PARA O TESTE DE ANTAGONISMO ENTRE <i>Pyricularia graminis-tritici</i> E RIZOBACTÉRIAS	18
FIGURA 2: BACTÉRIAS COM MENOR POTENCIAL DE INIBIÇÃO À <i>P. graminis-tritici</i> , SENDO A – PLACA CONTROLE, B - <i>Azospirillum</i> COMERCIAL, C- ISOLADO 493 (<i>Enterobacter</i>) E D – ISOLADO 188 (<i>Paenobacillus</i> 1130).	20
FIGURA 3: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>P. graminis-tritici</i> PELA PRESENÇA DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS, SENDO A – PLACA CONTROLE, B – ISOLADO 56 (<i>Bacillus</i> 631), C – ISOLADO 203 (<i>Enterobacter</i>) E D – ISOLADO 208 (<i>Delftia</i>)	22
FIGURA 4: CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>P. graminis-tritici</i> PELA PRESENÇA DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS, SENDO A – PLACA CONTROLE, B - <i>Azospirillum</i> Embrapa, C – ISOLADO 81 (<i>Falsibacillus</i> 812), D – ISOLADO 15 (<i>Falsibacillus</i> 259) E E – ISOLADO 102 (<i>Bacillus</i> 305).	23
FIGURA 5: EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO DE <i>P. graminis-tritici</i> APÓS 7 DE CONFRONTO <i>in vitro</i> . SENDO A - 81 (<i>Falsibacillus</i> 812), B - 102 (<i>Bacillus</i> 305), C - 121 (<i>Bacillus</i> 613), D - 56 (<i>Bacillus</i> 631), E - 188 (<i>Paenibacillus</i> 1130), F - 15 (<i>Falsibacillus</i> 259), G - 203 (<i>Enterobacter</i>), H - <i>Azospirillum</i> Embrapa, I - 208 (<i>Delftia</i>), J – 493 (<i>Enterobacter</i>), K – PLACA CONTROLE E L – CONTROLE EM PLACA DE PETRI.	28
FIGURA 6: EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS APÓS 7 DIAS COM O FUNGO E AS RIZOBACTÉRIAS A - 208 (<i>Delftia</i>), B - 203 (<i>Enterobacter</i>), C - 56 (<i>Bacillus</i> 631) E D – PLACA CONTROLE.	29
FIGURA 7: EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS COM AS RIZOBACTÉRIAS 2 DIAS ANTES DO FUNGO. A - 208 (<i>Delftia</i>), B - 203 (<i>Enterobacter</i>), C - 56 (<i>Bacillus</i> 631) E D – PLACA CONTROLE.	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS <i>in vitro</i> A PARTIR DE SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO GÊNICA DE 16S RIBOSSOMAL.....	17
TABELA 2: EFEITO ANTAGÔNICO DAS RIZOBACTÉRIAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO APÓS 15 E 20 DIAS.....	21
TABELA 3: RESULTADOS OBTIDOS QUANTO A PRODUÇÃO DE QUITINASE E ACETOÍNA DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS DE SOLOS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	25
TABELA 4: EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Pyricularia graminis-tritici</i>	27
TABELA 5: CRESCIMENTO DO FUNGO SOB COMPOSTOS VOLÁTEIS DAS BACTÉRIAS APÓS 7 DIAS COM OS DOIS MICRORGANISMOS.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO REFERENCIADA	11
2 OBJETIVOS	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO E MATERIAL.....	16
3.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Pyricularia graminis-tritici</i>	16
3.3 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS	16
3.4 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO “ <i>in vitro</i> ” DE RIZOBACTÉRIAS COM <i>Pyricularia graminis-tritici</i>	17
3.5 AVALIAÇÃO “ <i>in vitro</i> ” DO EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO FUNGO <i>Pyricularia</i>	18
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 TESTE DE ANTAGONISMO	20
4.2 EFEITO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS NO CRESCIMENTO MICELIAL.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO REFERENCIADA

A cultura do trigo está entre as culturas mais produzidas e cultivadas no mundo, visando como prioridade à alimentação humana e servindo também para alimentação animal (BOSCHINI, 2010). Apesar da grande importância desta cultura, existem limitações para a sua produção, entre elas o frequente aparecimento de doenças que ocasionam queda da produtividade mais acentuada nas regiões com maior área de cultivo associado as condições são mais propícias para ocorrência das doenças (ARRUDA et al., 2005).

Dentre estas se destaca a brusone do trigo, uma doença causada por *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., na forma teleomorfica *Magnaporthe grisea* (Hebert) e que foi primeiramente identificada em 1985 no Estado do Paraná segundo Igarashi et al., (1986). Recentemente essa doença foi descrita por Castroagudínet al., (2016) como sendo *Pyricularia graminis-tritici*, que pode proporcionar muitas perdas para cultura, em peso por espiga de até 72,5%, dependendo da época da infecção (GOULART e PAIVA, 2000). E ainda causa danos qualitativos nos grãos, deixando-os deformados, diminuindo tamanho e perdendo peso específico (GOULART et al., 2007).

Os sintomas da doença são caracterizados pelo aparecimento de espigas brancas a 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. Outra fonte de inóculo são as sementes, em que estas quando infectadas servem como veículo de disseminação do patógeno. O inóculo constituído por conídios é liberado e transportado pelo vento a longas distâncias, aumentando ainda mais a infestação. Os conídios em geral possuem dois septos e são formados no topo do conidióforo. As condições ambientais requeridas à infecção do patógeno são temperatura de 21-27°C e 10-14 horas de molhamento das espigas (KIMATI et al., 2005).

O controle de doenças na cultura do trigo, pensando do ponto de vista econômico e ambiental é principalmente pelo uso de cultivares resistentes, assim a busca por essas cultivares nos programas de melhoramento é muito grande, mas por outro lado a dificuldade encontrada pelos melhoristas é devido às poucas fontes de resistência encontradas em trigo comum (CRUZ et al., 2010).

Segundo Urashima (2004), esses fungos filamentosos apresentam

mecanismos de variabilidade genética que lhes conferem uma maior adaptação a diferentes ambientes e ainda possuem uma gama de hospedeiros de gramíneas cultivadas, nativas e invasoras, sendo de extrema importância para a agressividade do fungo, além da sobrevivência em restos culturais da planta cultivada como arroz e trigo mantendo a fonte de inóculo (KIMATI et al., 2005).

O uso do controle químico constitui-se a principal forma de manejo de doenças no trigo. 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 (URASHIMA, 1999; GOULART e PAIVA, 1993; ROCHA et al., 2014), com eficiência de no máximo 50% para os fungicidas aplicados. Segundo Urashima (2004) a grande diversidade de isolados existentes, com diferentes padrões de virulência e distintos graus de suscetibilidade das cultivares associado às variações do ambiente, aumentam a dificuldade de controle da doença.

Haja visto, que há limitações no controle químico para esse patossistema, além de atualmente haver a busca por alternativas de controle de doenças que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente e ao homem, visando a redução ou eliminação do uso de defensivos. Surge então o controle biológico como uma forma alternativa no manejo integrado de doenças para supressão da enfermidade e para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos, garantindo assim uma agricultura sustentável (FILHO-LANNA et al., 2010).

Dessa forma, as bactérias saprófitas da rizosfera, denominadas rizobactérias, surgem como uma opção de microrganismo de biocontrole para esclarecer as interações entre antagonista-patógeno-hospedeiro e também devido o grande potencial no controle de fitopatógenos (SOUZA-JUNIOR et al., 2010). Essas bactérias habitam na superfície de raízes ou próximas delas, e se nutrem de exsudatos liberados pela planta conforme Lucy et al., (2004) e através de várias habilidades como a fixação de nitrogênio entre outros, acabam tendo a capacidade de promover crescimento e aumentar a produtividade de culturas (VESSEY, 2003).

Campos Silva et al., (2008) descrevem que os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência são as *Pseudomonas*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e a família Enterobacteriaceae. Em especial, o gênero *Bacillus* spp. se destaca por apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos.

A ampla utilização desses microrganismos no biocontrole de fitopatógenos 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 ainda, pela competição por ferro, por espaço e nutrientes. Dentre esses, Romeiro (2007) destaca a antibiose como um mecanismo universal de antagonismo e agentes de biocontrole, com a produção de substâncias antimicrobianas. Os metabólitos produzidos têm efeito nocivo sobre o outro, como por exemplo, inibindo o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos, tendo assim um efeito fungicida (SILVEIRA, 2001).

Os compostos chamados de antibióticos são compostos orgânicos com baixo peso molecular que, em baixas concentrações, podem interferir no crescimento ou nas atividades metabólicas de outros organismos (FRAVEL, 1988). A competição por espaço ou por substrato é um mecanismo microbiano antagônico e pode ter importantes implicações em controle biológico de enfermidade de plantas (ROMEIRO, 2007). A competição se dá por meio da interação entre dois ou mais organismos dispostos no mesmo nicho na competição por alimentos (nutrientes), espaço e oxigênio (BETTIOL, 1991). Outro mecanismo de antagonismo pode ser a produção de compostos antimicrobianos voláteis, onde essas substâncias podem inibir o crescimento e multiplicação de outros microrganismos (MADIGAN et al., 2003).

Em relação à produção de enzimas líticas que certas bactérias são capazes de produzir para exercer sua antibiose contra fungos, podem-se destacar as quitinases, β -1,3-glucanases, celulasas, lípases e proteases. A ação dessas enzimas é de degradar os componentes da parede celular dos fungos, como glucanas e quitinas, destruindo estruturas do patógeno como hifas e propágulos (CHIN-A-WOENG et al., 2003).

Em relação ao gênero *Bacillus*, há efetivamente mais de 172 espécies aceitas, em 2012/13 foram incluídas novas espécies. Em condições não favoráveis as bactérias esporulam, sendo um só esporo por célula vegetativa e resistentes ao ambiente. Algumas espécies não esporulam em meios especiais e dependem das condições de cultivo "*in vitro*". As espécies desse gênero são classificadas em três grupos, segundo a morfologia do esporo e do esporângio (GOMES, 2013).

Deste modo, destaca-se a importância da realização deste trabalho, com a hipótese de identificar *in vitro* isolados de rizobactérias com potencial como agentes

de biocontrole de *P. graminis-tritici*, visto a dificuldade de controle dessa doença pelos outros métodos, assim contando com a efetividade das rizobactérias como agentes de controle biológico.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

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

Objetivos específicos

Avaliar dentre os isolados de rizobactérias nativas de solos do oeste do Paraná as que apresentavam alta competitividade “*in vitro*” contra *P. graminis-tritici*.

Avaliar o potencial antagônico de isolados de rizobactérias sobre *P. graminis-tritici* através da liberação de compostos voláteis.

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO E MATERIAL

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Os materiais utilizados foram todos previamente autoclavados e esterilizados. O experimento foi todo realizado em câmara de fluxo laminar visando à assepsia e a não obtenção de contaminantes.

3.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Pyricularia graminis-tritici*

Para a realização dos ensaios, o isolado utilizado foi disponibilizado pelo professor Paulo Ceresini da Universidade Estadual Paulista, UNESP de Ilha Solteira que possui uma coleção de mais de 600 isolados de *Pyricularia*. A espécie *Pyricularia graminis-tritici* é uma nova espécie identificada e o isolado trabalhado foi 12.0.009i, descrito por Castroagudín et al., (2016). Este foi obtido da planta de trigo (*Triticum aestivum*), coletado no ano de 2012 da região de Londrina – PR latitude S 23°18'02.7" e longitude WO 51°16'43.7" e possui resistência ao grupo químico de fungicidas das Estrobirulinas. O isolado cedido era mantido pelo método de liofilização, sendo que fragmentos de papel liofilizados com o fungo foram transferidos para o meio de cultura de farinha de aveia (60 g de farinha de aveia, 12 g de ágar L⁻¹), e após 20 dias de crescimento realizou-se a repicagem, mantendo o fungo em B.O.D com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro.

3.3 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS

Os isolados utilizados nesse trabalho fazem parte da coleção de cultura do grupo de estudos FIXTEC, da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina, sob a responsabilidade da Prof.^a Dra. Luciana Grange. Estas estirpes foram obtidas de solos da região oeste do Paraná submetidos a diferentes sistemas de manejos de cultivo e natural. A seleção dos isolados foi realizada a partir de um “screening” envolvendo etapas de agrupamentos por diversidade morfológica e genética.

Fez-se então a recuperação das células bacterianas em meio líquido, a partir

da coleção e, após três dias de crescimento em meio de cultura King B (10g peptona, 5 ml glicerol, 0,75 g K₂HPO₄, 0,75 g MgSO₄ 7H₂O e 10 g ágar L⁻¹), realizou o teste de antagonismo *in vitro*.

A identificação das bactérias são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1: ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS *in vitro* A PARTIR DE SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO GÊNICA DE 16S RIBOSSOMAL.

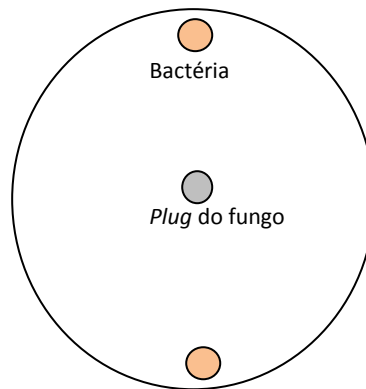
NÚMERO	ESPÉCIES
208	<i>Delftia</i>
203	<i>Enterobacter</i>
493	<i>Enterobacter</i>
102	<i>Bacillus</i> 304
56	<i>Bacillus</i> 631
81	<i>Falsibacillus</i> 812
15	<i>Falsibacillus</i> 259
188	<i>Paenobacillus</i> 1130
Azo 1	<i>Azospirillum</i> comercial
Azo 2	<i>Azospirillum</i> Embrapa

FONTE: O Autor (2016).

3.4 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO “*in vitro*” DE RIZOBACTÉRIAS COM *Pyricularia graminis-tritici*

Para os 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. Como o crescimento micelial de *P. graminis-tritici* é lento mesmo nas condições ideais para o desenvolvimento, foi realizada a repicagem do fungo em todas as placas, deixando-o crescer por sete dias. Após esse período, retirou-se uma pequena alíquota com auxílio da alça de “Coli” da colônia da bactéria, dispendo equidistantes e próximas à borda da placa como representado na Figura 1. Como testemunha, usou-se o fitopatógeno cultivado isoladamente sem as bactérias.

FIGURA 1: CONFIGURAÇÃO DO ENSAIO “*in vitro*” EM PLACA DE PETRI PARA O TESTE DE ANTAGONISMO ENTRE *Pyricularia graminis-tritici* E RIZOBACTÉRIAS



FONTE: O Autor (2016).

Realizaram-se dois testes de antagonismo, sendo o primeiro com as dez estirpes de rizobactérias no intuito de fazer uma seleção inicial das mesmas, identificando as que apresentavam melhor potencial antagônico. Para esse teste realizou-se 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. Assim foram 10 tratamentos compostos pelas rizobactérias citadas na Tabela 1 e um controle contendo apenas o fungo, com 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.

Depois de identificadas as bactérias que apresentaram melhor desempenho, eliminaram-se as que não evidenciaram potencial de inibição e realizou-se o segundo teste de antagonismo apenas com os isolados que tiveram melhor comportamento antagônico contra *Pyricularia*. Para este teste, a avaliação ocorreu após oito dias e aos 13 dias após a repicagem de ambos, fungo e isolado de bactéria.

3.5 AVALIAÇÃO “*in vitro*” DO EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO FUNGO *Pyricularia*

Para a realização do experimento foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio de farinha de aveia, foi adicionado um disco de meio (5 mm) contendo micélio

do fitopatígeno. No outro lado da placa contendo o meio King B, após cinco dias do estabelecimento do fungo foram adicionadas às bactérias.

Os tratamentos utilizados foram os mesmos indicados na Tabela 1, com a retirada do *Azospirillum* comercial e a inclusão da bactéria 121 (*Bacillus* 613), consistindo em 10 tratamentos e um controle contendo apenas o fungo de um lado e do outro somente o meio King B. Após a repicagem do fitopatígeno e das bactérias, as placas foram imediatamente vedadas com filme plástico e mantidas a 24 °C sob fotoperíodo de 12h. A avaliação do crescimento micelial foi realizada após sete dias a partir do dia que se repicou as bactérias, com o auxílio de uma régua 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 antagonio nos demais ensaios. 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.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

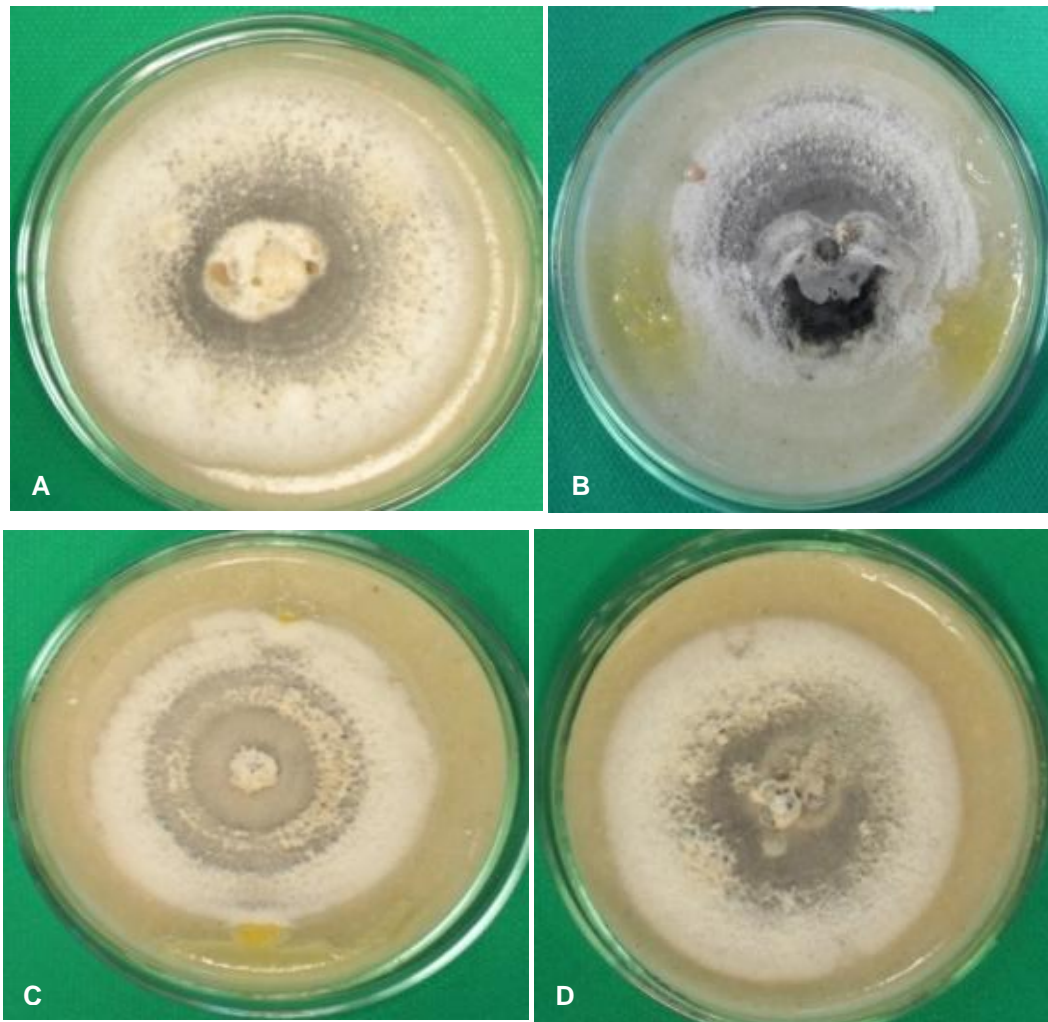
Para ambos os testes as placas foram mantidas em B.O.D sob temperatura de 24°C com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro e o potencial de antagonismo dos isolados foi avaliado por meio de medições do crescimento micelial do fitopatígeno com o auxílio de uma régua milimétrica. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software SISVAR de Ferreira (2011), e teste tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTE DE ANTAGONISMO

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 2).

FIGURA 2: 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).



FONTE: O Autor (2016).

Os resultados obtidos com o segundo teste *in vitro* realizado são apresentados na Tabela 2. Neste ensaio apenas as bactérias que demonstraram maior potencial antagonista no primeiro teste foram avaliadas. Observando assim a,

o crescimento micelial do fungo após 15 e 20 dias no embate entre *P. graminis-tritici* e as rizobactérias.

TABELA 2: EFEITO ANTAGÔNICO DAS RIZOBACTÉRIAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO APÓS 15 E 20 DIAS.

Tratamentos	Medida do crescimento micelial (cm)			
	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 percentagem (%).

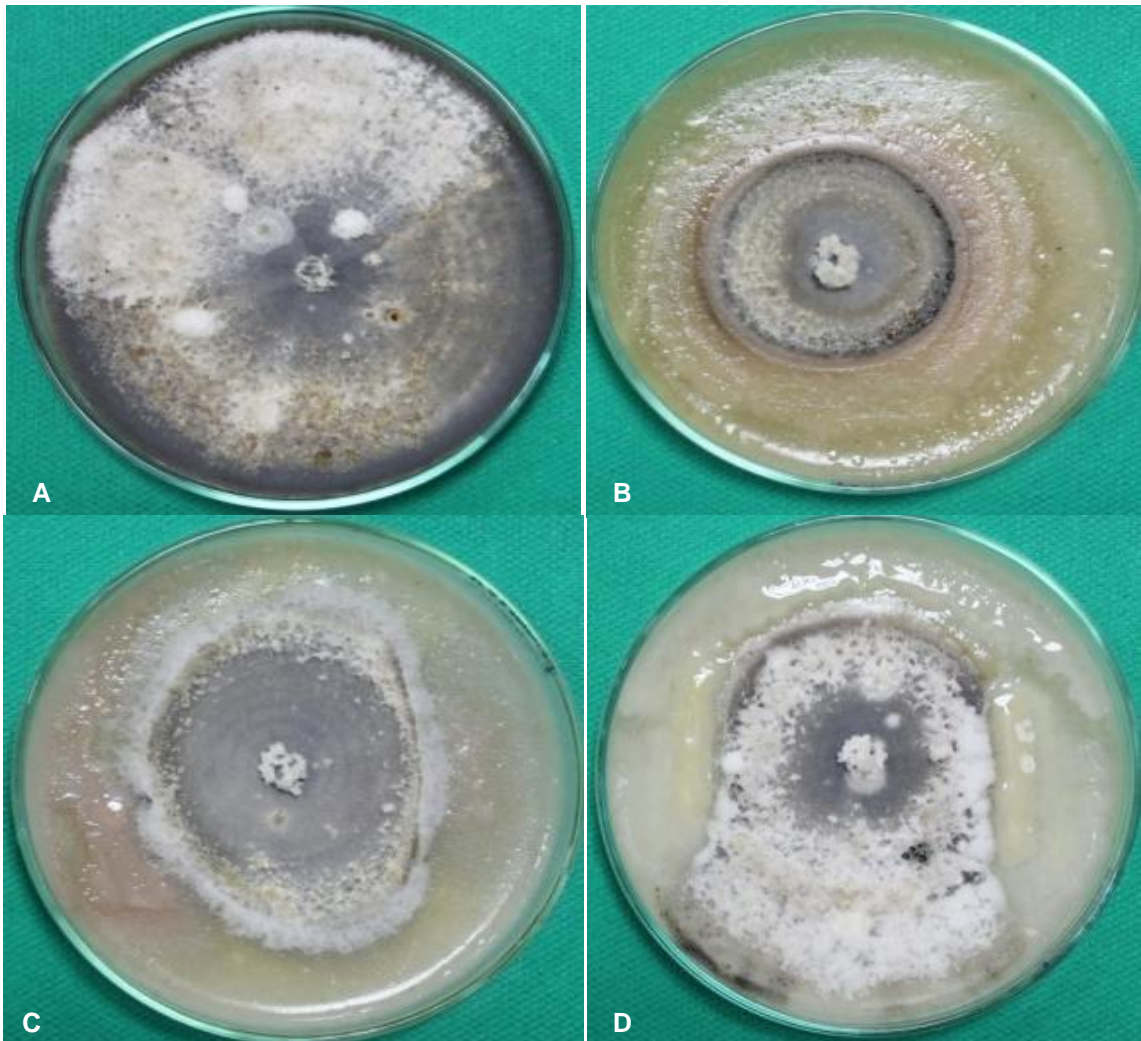
Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste tukey ($P \leq 0,05$).

FONTE: O Autor (2016).

No antagonismo *in vitro* alguns dos isolados bacterianos diminuíram significativamente o crescimento micelial de *Pyricularia* quando comparados com a testemunha (TABELA 2). 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, observou-se 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. Já os isolados 102 (*Bacillus* 305) e 15 (*Falsibacillus* 259), foram os quais proporcionaram menor inibição do crescimento de *Pyricularia* em relação à testemunha, não diferindo do controle.

As imagens apresentadas na Figura 3 demonstram que houve ação antagonista dos isolados 56, 203 e 208. Observa-se que a estirpe 56 (*Bacillus* 631) apresentou um crescimento agressivo que não permitiu o desenvolvimento de *P. graminis-tritici*, ocorrendo à inibição do mesmo. Nas Figuras 3C e D, percebe-se que o fungo cresce para a lateral aonde não há o crescimento da colônia dos isolados das bactérias 203 e 208, respectivamente, não avançando sobre as mesmas.

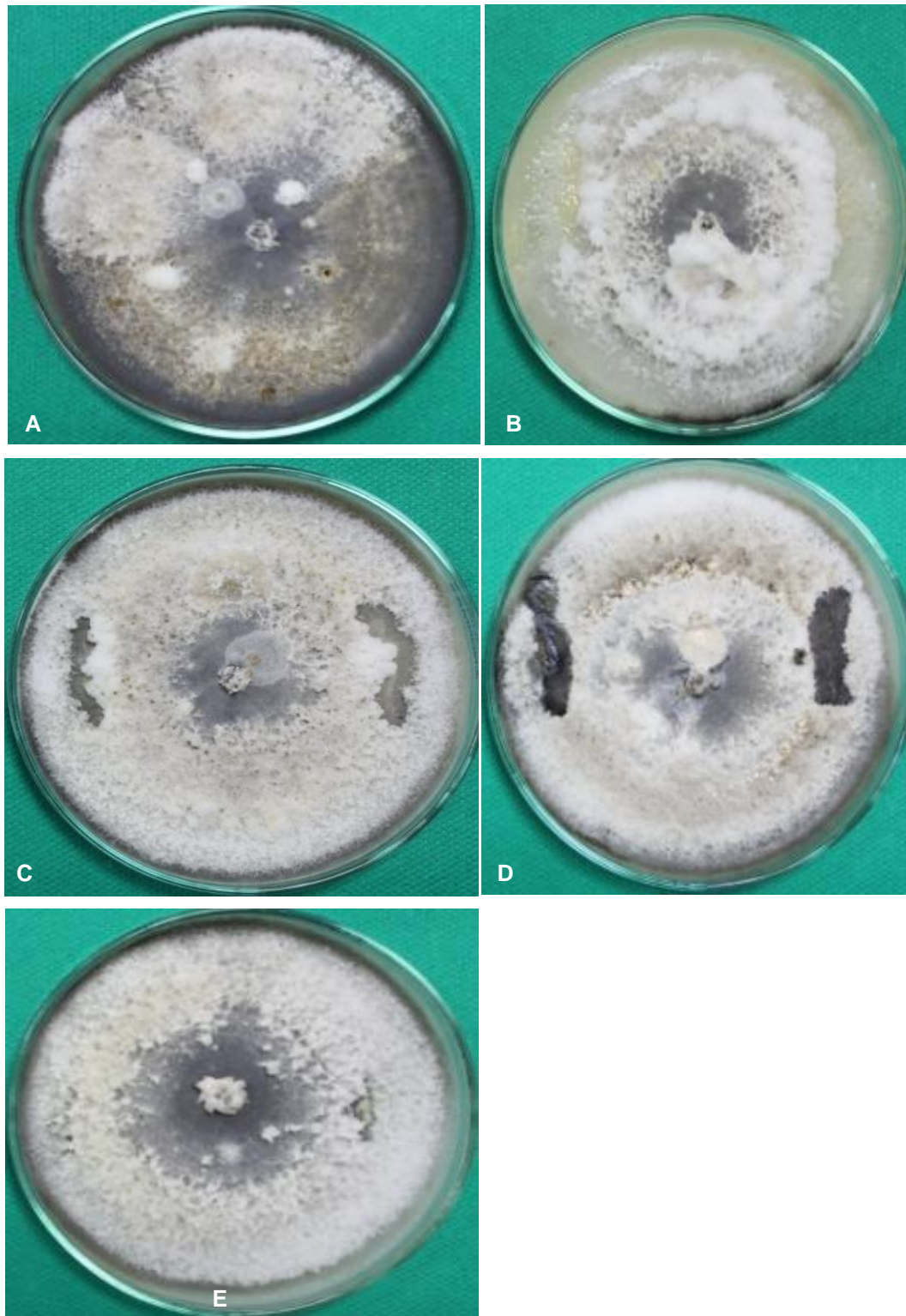
FIGURA 3: INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *P. graminis-tritici* PELA PRESENÇA DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS, SENDO A – PLACA CONTROLE, B – ISOLADO 56 (*Bacillus* 631), C – ISOLADO 203 (*Enterobacter*) E D – ISOLADO 208 (*Delftia*)



FONTE: O Autor (2016).

Na Figura 4, são apresentadas as bactérias que desempenharam menor potencial de inibição do fitopatógeno, podendo perceber como *P. graminis-tritici* cresce totalmente sobre a placa, comparando com o controle, sem haver interferência da bactéria.

FIGURA 4: 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).



FONTE: O Autor (2016).

Ongena et al., (2005) relata que a rizobactéria *B. subtilis*, registrada em muitos trabalhos mostra-se como excelente agente de biocontrole, o que corrobora

com alguns isolados testados no presente trabalho, como o tratamento que continha o isolado 56 sendo uma *Bacillus*, e que resultou em uma expressiva inibição de *P. graminis-tritici in vitro*.

Analisando os resultados obtidos, pode se considerar que algumas estirpes bacterianas realizaram ações antagonistas diretas contra o patógeno, que podem envolver os mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas e de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

Segundo Kupper et al., (2003), as bactérias antagônicas, como *B. subtilis*, a qual vem se destacando no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita, agem de modo mais acentuado por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição. Os autores enfatizam que é amplo o espectro de ação desses microrganismos que agem por antibiose, sendo mais efetiva a produção de compostos tóxicos para inibir os fungos do que outro mecanismo antagônico.

Silva et al., (2004) destacam que *B. cereus* age através da antibiose com a produção de dois antibióticos de largo espectro, zwittermicina e kanosamina. 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).

Em testes conduzidos por Costa (2010), o autor analisou a capacidade de isolados endofíticos de folhas de feijoeiro em produzir enzimas líticas (celulase, pectinases e protease), sideróforos e antagonismo. Dentre os gêneros que apresentaram produção de celulose estavam *Bacillus* e *Paenibacillus*. Para a produção de pectinases os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Delftia* estavam presentes. Para síntese proteases estavam *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Delftia*, entre outros e para produção de sideróforos entre os gêneros estavam *Bacillus*, *Enterobacter* e *Delftia*.

Dentre as substâncias que as espécies do gênero *Bacillus* podem secretar, destacam-se as enzimas amilolíticas, proteolíticas e antibióticos (MELO, 1998). Esses isolados produzem uma ampla variedade de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (ONGENA et al., 2005). Embora essas três substâncias possuam estruturas semelhantes, elas se diferem em alguns aspectos biológicos em relação à sua atividade. Como exemplo, iturinas e fengicinas apresentam alta inibição do

crescimento de vários fitopatógenos. Já as surfactinas exercem efeito antifúngico sinérgico com a iturina A (MAGET-DANA et al., 1992).

Tendulkar et al., (2007) realizando testes com *B. licheniformis* BC98 a fim de inibir o crescimento micelial de *Magnaporthe grisea*, identificaram a molécula surfactina inibindo o patógeno em $96,9 \pm 2,7$ %, alterando a morfologia das hifas, inibindo a germinação dos esporos e ocasionando formação anormal do tubo germinativo nos esporos germinados.

Monteiro (2016) realizou a quantificação de quitinase e acetoína para as mesmas estirpes testadas no presente trabalho. Na Tabela 3 são apresentados os resultados quanto à produção acetoína e quitinase para as estirpes de rizobactérias. Destacando a estirpe 56, que demonstrou maior inibição do crescimento de *P. graminis-tritici* nos testes de antagonismo, a qual apresentou a produção positiva de quitinase, e em torno de 1,508 milimolar de acetoína.

TABELA 3: RESULTADOS OBTIDOS QUANTO A PRODUÇÃO DE QUITINASE E ACETOÍNA DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS DE SOLOS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.

GÊNERO	ISOLADO	QUITINASE*	[C]ACETOÍNA(mM)**
<i>Paenibacillus</i>	188	-	1,560
<i>Falsibacillus</i>	81	-	1,627
<i>Falsibacillus</i>	15	-	0,905
<i>Bacillus</i>	56	+	1,508
<i>Bacillus</i>	102	-	1,103
<i>Bacillus</i>	121	+	1,333
<i>Enterobacter</i>	203	-	1,302
<i>Enterobacter</i>	208	-	0,539

* + presença e - ausência da formação de halo de degradação

**[C] concentração de acetoína em milimolar (mM). Fonte: MONTEIRO (2016).

Schallmeyer et al., (2004) mencionam que isolados bacterianos do gênero *Bacillus* são bastante conhecidos e estudados por possuírem alto potencial para secretar enzimas degradativas como por exemplo, as quitinases. Whipps (2001) analisando as substâncias produzidas por *B. Cereus* no embate com *Rhizoctonia solani*, observou que as enzimas quitinolíticas (quitinases) degradam as hifas do patógeno. O uso de enzimas tal como a quitinase tem-se mostrado ativa e eficiente em estudos de antagonismo contra fungos fitopatogênicos (RAMPINO et al., 2013). Bactérias como *Bacillus* spp, *Arthrobacter* spp e *Enterobacter* spp. são descritas como sendo boas produtoras de quitinases. A produção das enzimas normalmente ocorre após indução pela interação entre o antagonista e o fitopatógeno, seguida da digestão da célula alvo (QUEIROZ, 2003).

Em relação à metodologia para testes *in vitro* de antagonismos, têm-se os quantitativos que utilizam ágar em placas, como: cultura pareada, papel celofane, placa sobreposta, camada dupla, líquido metabólico e ainda os que empregam ágar em lâmina e meio líquido. Dentre estes o da cultura pareada é o mais comumente utilizado para avaliar antagonismo *in vitro* (MARIANO, 1993).

Segundo Alves et al., (1990), o método da cultura pareada com a forma de pareamento por disco de ágar, é o indicado para *P. oryzae* x arroz, utilizando antagonistas do gênero *Bacillus*. E desta forma se pode considerar que este protocolo utilizado no presente trabalho foi adequado considerando o patossistema *P. graminis-tritici* x trigo, bem como a avaliação de rizobactérias como antagonistas, e neste caso, empregou-se o uso de discos de meio de cultura farinha de aveia, o qual é mais indicado para o crescimento do fungo.

O método do líquido metabólico ou método do filtrado para detecção de antibióticos também foi satisfatório para patossistema *P. oryzae* x arroz, utilizando *B. subtilis* como antagonista, metodologia empregada por Bettioli e Kimatti (1989), onde verificaram a inibição do crescimento micelial de *P. oryzae*. Ainda notaram que, com o aumento da concentração da solução ou “caldo”, onde os isolados de *B. subtilis* foram multiplicados, houve um aumento na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pyricularia*.

Analisando o biocontrole sobre esses mesmos patógenos do arroz, Leelasuphakul et al. (2006), obtiveram filtrados de compostos antifúngicos produzidos por *B. subtilis*, que inibiram o crescimento micelial de *P. grisea* e *R. solani*, e se apresentaram termoestáveis; os filtrados esterilizados apresentaram maior atividade do que aqueles autoclavados, embora para *P. grisea* essa diferença tenha ocorrido apenas até o 3º dia de avaliação, ambos apresentando após isto, inibição de 100%.

Para Jia et al., (2011) a atividade antifúngica sobre *M. oryzae* através de filtrados de *B. subtilis*, inibiu em até 67 % o crescimento micelial do fitopatógeno, inibindo a formação do tubo germinativo e ocasionando a formação anormal dos apressórios.

4.2 EFEITO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS NO CRESCIMENTO MICELIAL

Os compostos voláteis podem atuar na inibição do crescimento de um patógeno, agindo na alteração da morfologia das colônias, retardando e/ou reduzindo o crescimento de um fitopatógeno (ROMEIRO, 2007).

No teste de compostos voláteis foram utilizadas placas bipartidas a fim de avaliar a capacidade dos isolados de rizobactérias em inibir o crescimento micelial de *P. graminis-tritici* por liberação de substâncias voláteis. 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 4.

TABELA 4: 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 ($P \leq 0,05$).

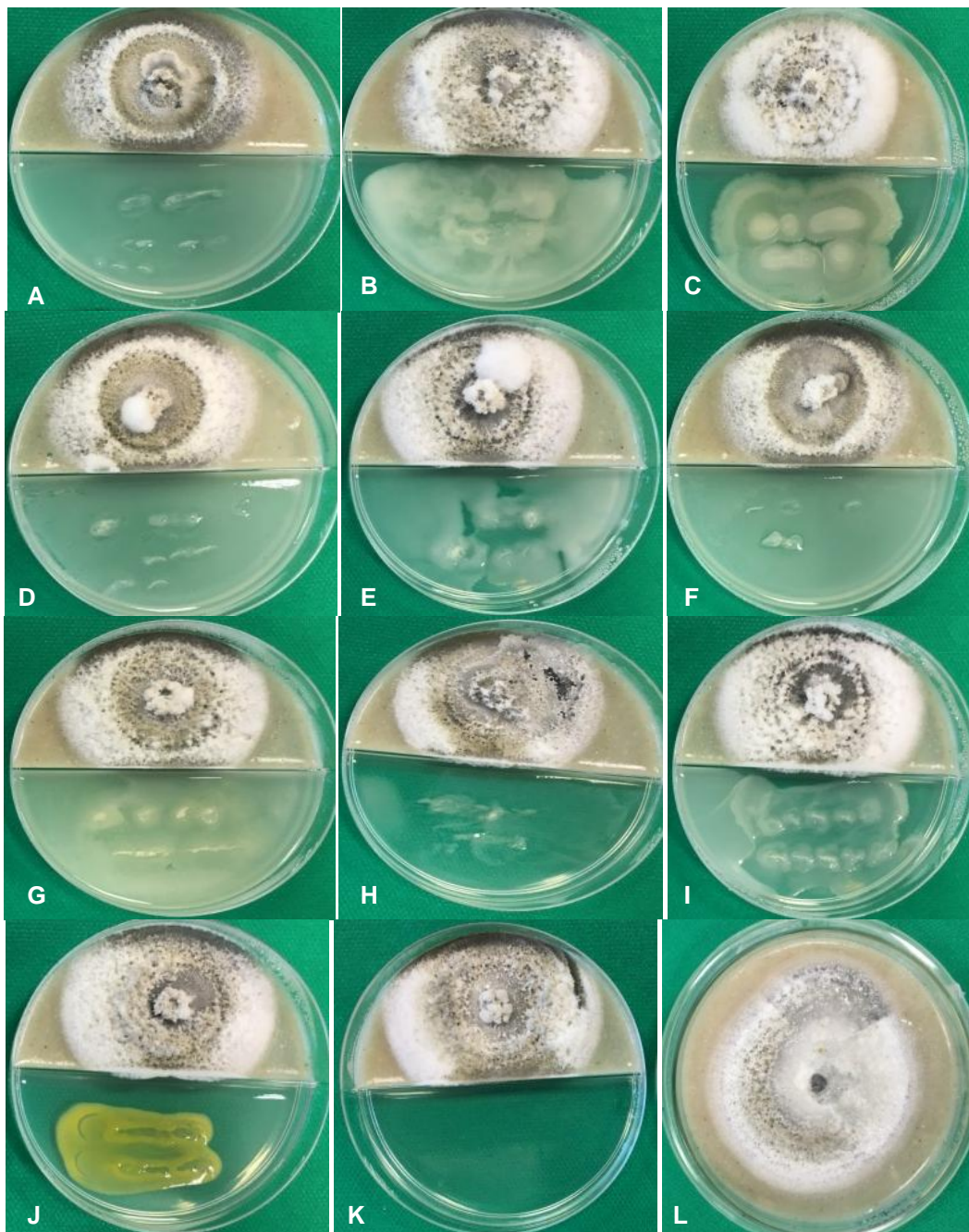
FONTE: O Autor (2016).

Pelos resultados apresentados na Tabela 4, 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.

Na Figura 5 são apresentadas as imagens das placas bipartidas esse efeito sobre *P. graminis-tritici*, comparada com o controle, percebem-se também o pouco

espaço para o desenvolvimento de ambos os microrganismos, quando comparado com o crescimento do patógeno em placa de Petri, dessa forma tirou-se medidas apenas na horizontal devido o crescimento desuniforme dos dois lados, e na figura o fungo possuindo 12 dias (FIGURA 5).

FIGURA 5: EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO DE *P. graminis-tritici* APÓS 7 DE CONFRONTO *in vitro*. SENDO A - 81 (*Falsibacillus* 812), B - 102 (*Bacillus* 305), C - 121 (*Bacillus* 613), D - 56 (*Bacillus* 631), E - 188 (*Paenibacillus* 1130), F - 15 (*Falsibacillus* 259), G - 203 (*Enterobacter*), H - *Azospirillum* Embrapa, I - 208 (*Delftia*), J - 493 (*Enterobacter*), K - PLACA CONTROLE E L - CONTROLE EM PLACA DE PETRI.

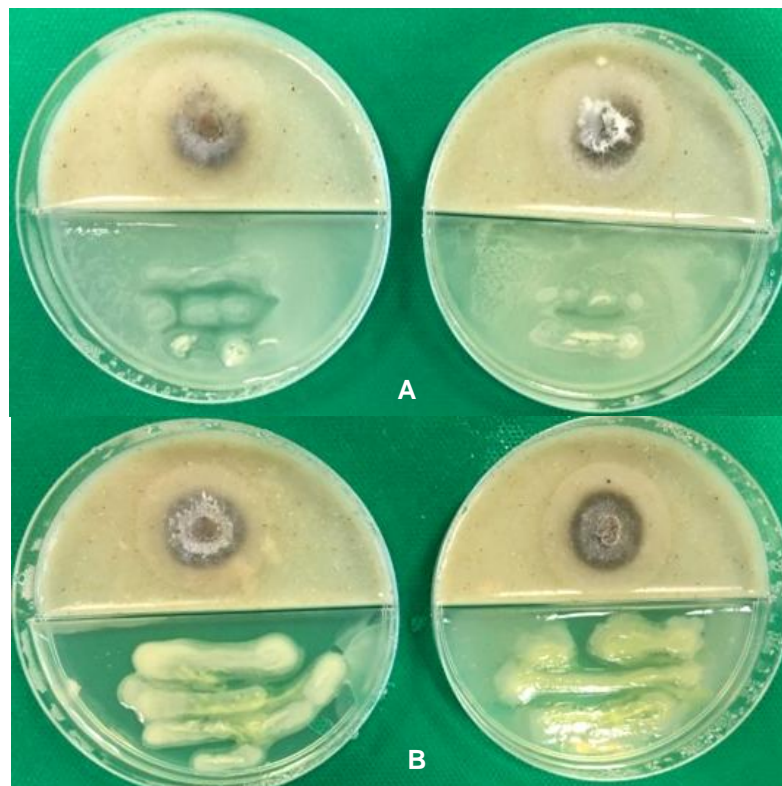


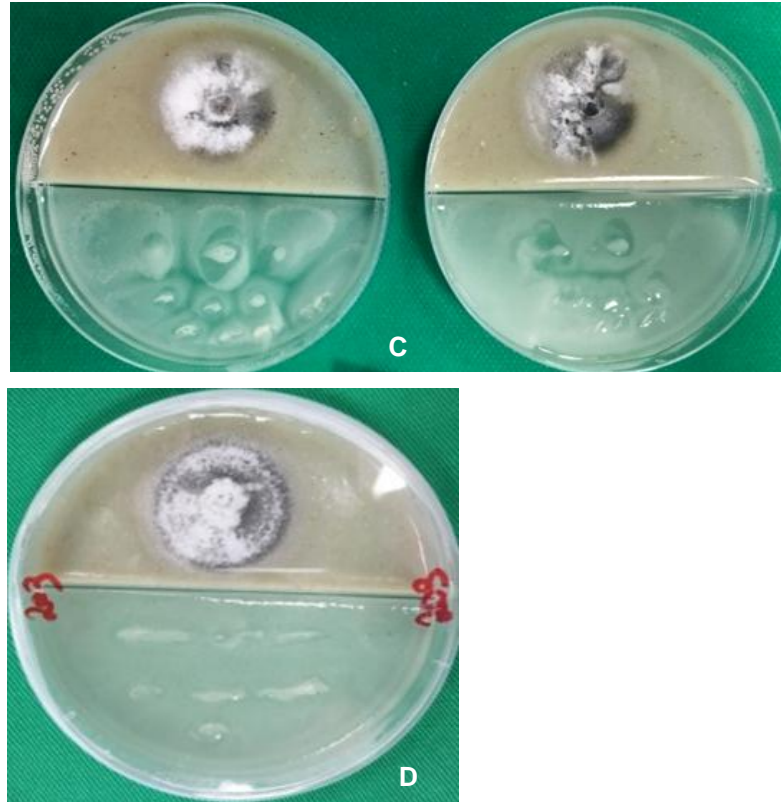
FONTE: O Autor (2016).

No segundo teste, o experimento foi conduzido colocando os dois microrganismos no mesmo dia e avaliando após sete dias (FIGURA 6). Nesse ensaio apenas as estirpes que demonstraram maior potencial pelo teste do antagonismo visto no item 4.1 foram avaliadas, sendo a 208 (*Delftia*), a 203 (*Enterobacter*) e a 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 6). 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 6: 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.





FONTE: O Autor (2016).

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

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

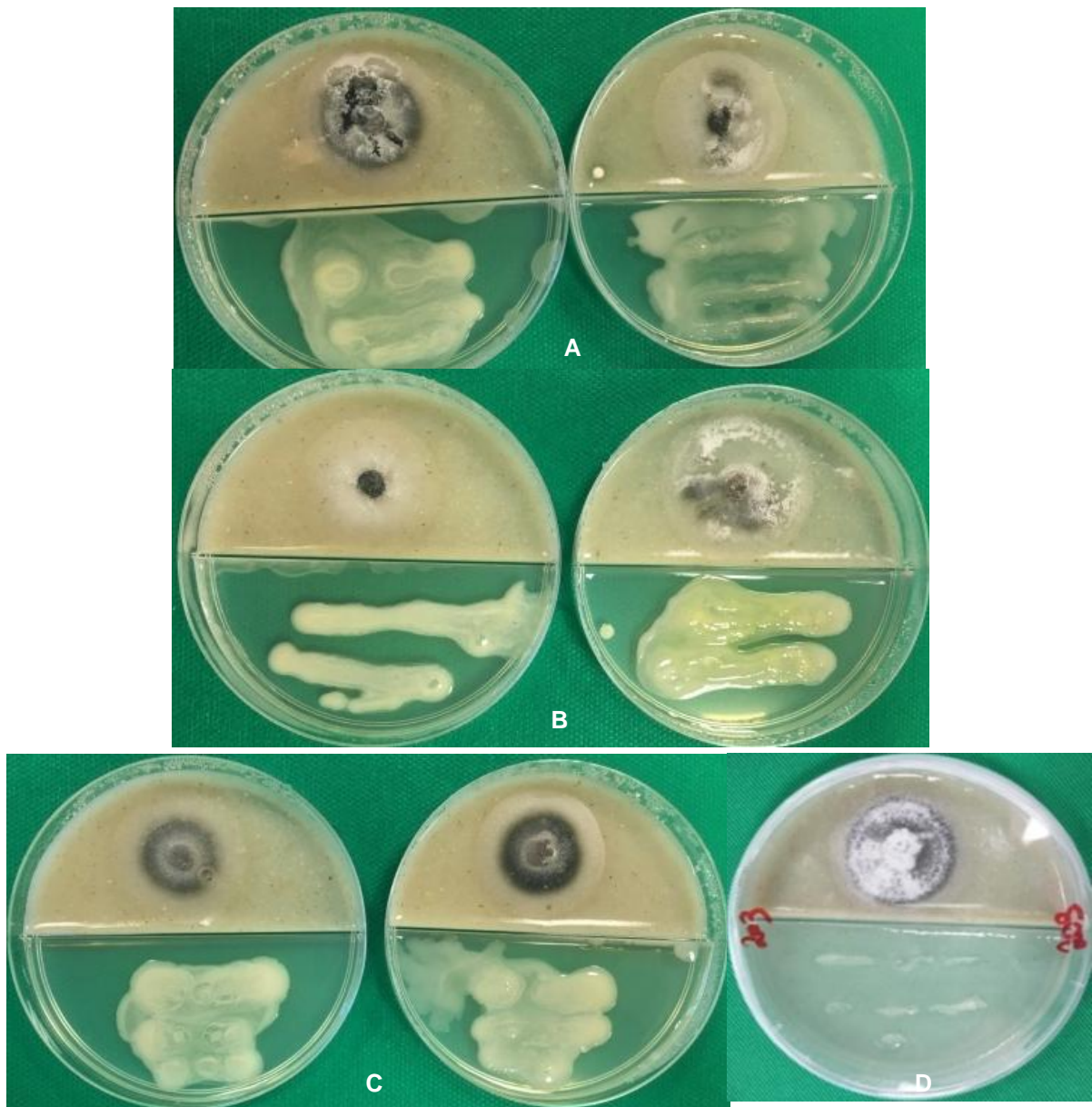
Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste tukey ($P \leq 0,05$).

FONTE: O Autor (2016).

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 7). Assim como para o segundo teste esse também foi realizado apenas

as rizobactérias 208 (*Delftia*), 203 (*Enterobacter*) e 56 (*Bacillus* 631), 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. Mais uma vez considera-se que houve um efeito dos compostos voláteis dessas estirpes bacterianas sobre o patógeno.

FIGURA 7: 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.



FONTE: O Autor (2016).

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.

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.

Os compostos voláteis produzidos por *B. subtilis*, foram encontrados por Chen et al., (2008) e identificados através da cromatografia, indicando a presença de substâncias como 2-etil-hexanol, 2,4-bis (2-metilpropil) fenol, 4-hidroxibenzaldeído e 2-nonanona que apresentaram natureza antifúngica contra alguns fitopatógenos envolvidos em diferentes patossistemas.

O envolvimento da produção de compostos voláteis em antagonismo de rizobactérias é relatado em muitos estudos de biocontrole, como por exemplo, o efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos por diversos isolados de rizobactérias sobre o crescimento micelial de *R. solani* (KAI et al., 2007); de isolados de *B. subtilis* com inibição bastante significativa contra fungos, como *Fusarium oxysporum* também devido à produção de compostos voláteis (KNOX et al., 2000).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, pode-se considerar que dentre os isolados de rizobactérias avaliados, a 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.

Para o teste de compostos voláteis, a redução no crescimento micelial aéreo de *P. graminis-tritici* é um indicativo da ação de antagonismo do isolados testados pela volatilização de substâncias antimicrobianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. L. B.; TANAKA, M.A A. A.; ,EMTEM, J. O. M.; NUNES, M. E. T. Inibição do crescimento micelial de *Perycularia oryzae* de trigo e arroz por *Bacillus* spp. **Fitopatologia Brasileira**. 1990.
- ARRUDA, M.A.; BUENO, C.R.N.C.; ZAMPROGNO, K.C.; LAVORENTI, N.A.; URASHIMA, A.S. Reação do trigo à *Magnaporthe grisea* nos diferentes estádios de desenvolvimento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.30, p.121-126, 2005.
- BETTIOL, W. Biocontrole na Filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.59-97. 1997.
- BETTIOL, W.; KIMATTI, H. Seleção de microorganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). **Summa Phytopathologica** 15: 257 299 – 266. 1989.
- BETTIOL,W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas – Cap. 1. In: BETTIOL,W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA,1991.
- BOSCHINI, A.P.M. **Produtividade e qualidade de grãos de trigo influenciados por nitrogênio e lâminas de água no Distrito Federal**. Dissertação de Mestrado. Brasília. 2010.
- 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.
- NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Nonconventional protein secretion in yeast. *Trends in Microbiology*, **Cambridge**, v. 14, n. 1, p. 15-21, 2006.
- CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.919–923, 2008.
- CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, v. 157, n.3. 2003.

COSTA, L.E.O. **Diversidade genética, antagonismo microbiano e produção de fitases por bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais. 2010.

CRUZ, M.F.A.; PRESTES, A.M.; MACIEL, J.L.N.; SCHEEREN, P.L. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, n.1, p.024-031, 2010.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review Phytopathology**, v.41. 2003.

FERREIRA, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, 35(6), 1039-1042.

FRAVEL, D. R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p.75-91, 1988.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Bacillus* spp.** Tópicos em Bacteriologia Veterinária. FAVET-UFRGS. 2013.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F.A. Avaliação de fungicidas no controle da brusone (*Pyricularia oryzae*) do trigo (*T. aestivum*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.18, p.167-173, 1993.

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.

GOULART, A.C.P.; SOUSA, P.G.; URASHIMA, AS. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p.358-363, 2007.

IGARASHI, S.; UTIAMADA, C.M.; IGARASHI, L.C.; KAZUMA, A.H.; LOPES, R.S. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**. 11:351-352. 1986.

JIA, S.; ZENG, D.; WU, X.; TU, G.. Inhibitory of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus subtilis* C-D6 against *Magnaporthe oryzae*. **Chinese Journal of biological Control**, v. 27, n. 3, 362-367, 2011.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; BIRGIT, P. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelia growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 187. 2007.

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

KNOX, O. G. G.; KILLHAM, K.; LEIFERT, C.; ATKINSON, D.; GOLLOTTE, A.; HARLING, R.; HARRIER, L. A.; HOCART, M. Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Applied Soil Ecology*. V.15, n.2. 2000.

KUPPER, K. C.; FERNANDES, N. G.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.3, P. 251-257. 2003.

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

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest. **Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LEELASUPHAKUL, W.; SIVANUNSAKUL, P.; PHONGPAICHIT, S. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.990–997, 2006.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.86, n.1., p.1-25, 2004.

MACNIEL, J. L. N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**. Washington. N.50. 2011.

MADIGAN, M. M. J.; MARTINKO, PARKER, J. E. Brock biology of microorganisms. **New York: Prentice Hall**. 1104p. 2003.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p.1047–1051. 1992.

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.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L.(Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, v. 1. 1998.

MONTEIRO, J. P. S. **Biocompostos produzidos por rizobactérias envolvidas no biocontrole**. Universidade Federal do Paraná. Palotina. 2016.

ONGENA, M.; DUBY, F.; JOURDAN, E.; BEAUDRY, T.; JADIN, V.; DOMMES, J.; THONART, P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, 692-698, 2005.

QUEIROZ, B. P. V. DE. **Isolamento e seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e controle de Phytophthora parasitica em citros**. Tese defendida em 25/10/2016, 120 f. Doutorado- Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2003.

RAMPINO, A. . et al. **Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability**. International Journal of Pharmaceutics, v. 455, n. 1–2, p. 219–228, 2013.

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: Procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 172P. 2007.

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.

SILVA, H. A. S.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control** 29: 288 – 295. 2004.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE. 2001.

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.

TENDULKAR, S. R.; SAIKUMARI, Y. K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, TK.; BALARAM, P.; CHATTOO, B. B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**. 2007.

URASHIMA, A.S. Genetic analysis of *Magnaporthe grisea* pathogenicity on wheat. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.24, p.567-569, 1999.

URASHIMA, A.S.; LAVORENT, N.A.; GOULART, A.C.P.; MEHTA, Y.R. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.29, n.5, p.511- 518, 2004.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**. **V. 255. 2003.**

WHIPPS, J. M. Roots and their environment: microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** 52: 487-511. 2004.