



20º Seminário de  
Iniciação Científica e  
4º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Oriental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



20º Seminário de  
Iniciação Científica e  
4º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

**Embrapa Amazônia Oriental**  
Belém, PA  
2016



## ANTAGONISMO *in vitro* DE RIZOBACTÉRIAS CONTRA *Bipolaris* sp., AGENTE ETIOLÓGICO DE MANCHAS FOLIARES NA CULTURA DO MILHO

Iêda Alana Leite de Sousa<sup>1</sup>, Ruth Linda Benchimol<sup>2</sup>, Carina Melo da Silva<sup>3</sup>, Cássia Cristina Chaves Pinheiro<sup>4</sup>, Ana Karoliny Alves Santos<sup>5</sup>, Eudes de Arruda Carvalho<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Bolsista PET-Florestal, estagiária da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ialanaleites@gmail.com

<sup>2</sup> Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ruth.benchimol@embrapa.br

<sup>3</sup> Bolsista CAPES pós-graduação, Laboratório de Fitopatologia, carinamelosilva@gmail.com

<sup>4</sup> Bolsista CNPq Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, cassiapinheiro002@gmail.com

<sup>5</sup> Estagiária Embrapa Amazônia Oriental, karol.ine20@gmail.com

<sup>6</sup> Pesquisador Embrapa Quarentena Vegetal, Laboratório de Fitopatologia, eudes.carvalho@embrapa.br

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagônico *in vitro* de rizobactérias contra *Bipolaris* sp., importante patógeno causador de manchas foliares na cultura do milho. O método adotado foi o de pareamento de colônias. No centro de placas de Petri contendo BDA e circundadas próximo à borda com as rizobactérias, foi depositado um disco de micélio do patógeno. Estas foram incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h claro/escuro. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e cinco repetições. As avaliações do crescimento diamétrico (mm) foram diárias, sendo, posteriormente, calculado o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), que foi comparado entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ), utilizando-se o programa SISVAR, versão 5.6. As rizobactérias testadas apresentam mecanismos que inibiram o crescimento micelial *in vitro* de *Bipolaris* sp. O isolado P23 apresentou maior potencial de inibição contra o patógeno, diferindo estatisticamente de todos os tratamentos, apresentando potencial de utilização em futuros programas de controle biológico da mancha de *Bipolaris* do milho.

**Palavras-chave:** *Bacillus*, *Zea mays*, *Pseudomonas*.

### Introdução

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem a sua produtividade ameaçada por doenças foliares, que são responsáveis pela redução em 40% na produção (CASA; REIS, 2003). Entre as principais doenças destacam-se as que possuem fungos como agentes etiológicos, como helmintosporiose (*Bipolaris* sp.), antracnose (*Colletotrichum graminicola*) e ferrugem (*Puccinia* spp.). Assim como os outros



agentes fúngicos, o *Bipolaris* sp. provoca danos significativos nas plantas, em decorrência do mau funcionamento e da destruição dos tecidos fotossintéticos (CASELA et al., 2006).

Diferentes estratégias de manejo vêm sendo adotadas para o controle dessas doenças na cultura, como, por exemplo, o uso de variedades resistentes, rotação de culturas, eliminação de plantas infestantes e controle químico, bem como o balanço nutricional e o plantio da cultura em época adequada, que evitam que os períodos críticos para a produção coincidam com as condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento das doenças (CASELA et al., 2006).

O controle biológico por microrganismos surge como uma alternativa e um componente auxiliar para o manejo das manchas foliares na cultura do milho e também para a redução, ou eliminação, do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos. A diversidade de microrganismos, bem como suas relações antagônicas, é uma ferramenta importante para o controle biológico aplicado. Particularmente com as rizobactérias, muitos trabalhos vêm sendo realizados para se conhecer sobre as interações antagonista-patógeno-hospedeiro, a fim de entender os mecanismos que compõem essas interações (RYAN et al., 2008). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagônico *in vitro* de rizobactérias contra *Bipolaris* sp., importante agente causal de manchas foliares na cultura do Milho.

### Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Os isolados de *Bipolaris* sp. foram obtidos por meio do isolamento indireto de estruturas do patógeno em folhas com sintomas característicos da doença, de milho cultivado em sistema de plantio direto, em Paragominas, PA. As rizobactérias foram obtidas de amostras de solo da Empresa Socôco Produtos Alimentícios S/A, ambos depositados na coleção de microorganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. A partir de testes preliminares selecionou-se dois isolados de rizobactérias do gênero *Bacillus* (B23 e B14) e três do gênero *Pseudomonas* (P22, P23 e P41).

Foi utilizado o método de pareamento de colônias. O patógeno foi cultivado em meio de cultura de BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por sete dias antes da instalação do experimento. As rizobactérias foram reativadas em meio de cultura de NA (Nutriente-Ágar) por 48 horas.



Posteriormente, em placas de Petri contendo BDA, com um auxílio de um bastão de vidro estéril, traçou-se um círculo contínuo de crescimento bacteriano acompanhando a borda das placas, depositando-se os discos de micélio do patógeno ( $\varnothing = 9$  mm) no centro de cada placa. Como testemunha utilizou-se placas de BDA contendo no seu centro apenas o disco de micélio do fungo, sem as rizobactérias. As placas foram incubadas à temperatura igual a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h claro/escuro em BOD.

A avaliação do experimento foi realizada diariamente, a partir de 24 horas da sua instalação sendo realizada a medição do crescimento diamétrico das colônias (mm) até o momento em que a primeira placa da testemunha completou seu crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos constituídos de três rizobactérias do gênero *Pseudomonas* (P22, P23 e P41) e duas do gênero *Bacillus* (B23 e B14), mais a testemunha, em cinco repetições. Os dados obtidos com essa avaliação foram empregados no cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM). Devido a não normalidade dos dados, estes foram transformados utilizando-se função logarítmica, e submetidos à Análise de Variância (ANOVA), feita pelo teste F ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ). As médias de crescimento micelial foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ), utilizando-se o programa SISVAR, versão 5.6.

### Resultados e Discussão

Constatou-se que as rizobactérias testadas demonstraram efeito inibitório significativo no crescimento micelial do patógeno, quando comparado com o tratamento testemunha (Figura 1).

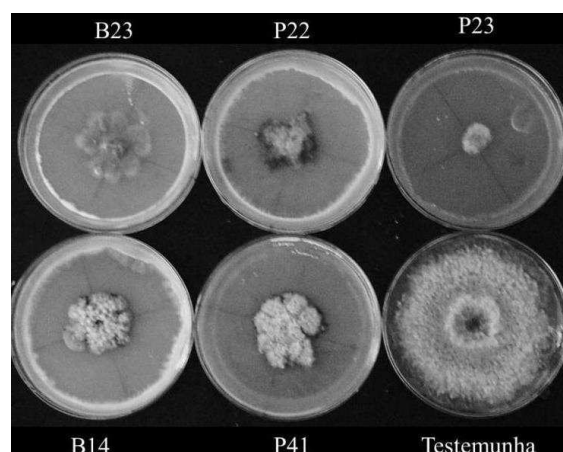
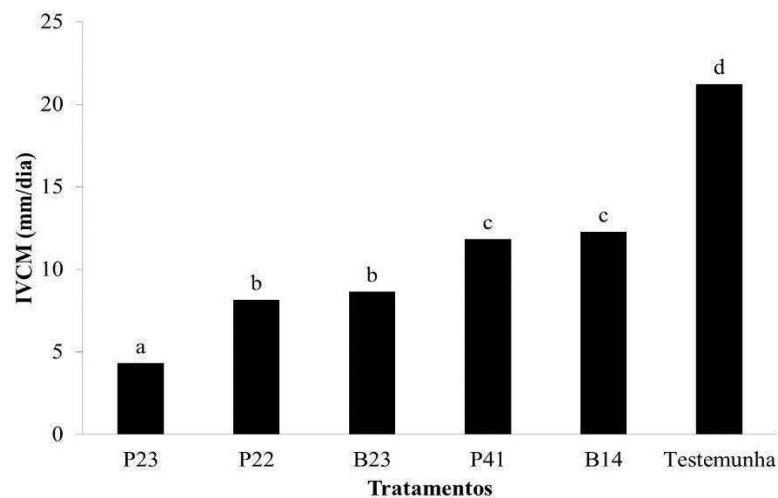


Figura 1- Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Bipolaris* sp. por rizobactérias. (Fonte: I. A L. de Souza).



O crescimento micelial médio de *Bipolaris* sp. foi de 1,69 cm, 2,12 cm, 2,47 cm, 2,68 cm, 2,91 cm, na presença dos isolados P23, P22, B23, P41 e B14, respectivamente, enquanto que na testemunha, o crescimento do patógeno foi de 4,27 cm, sendo superior, portanto, àquele na presença dos antagonistas, indicando a inibição do crescimento micelial na presença dos mesmos. O isolado P23 apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais tratamentos, com maior inibição do crescimento micelial do patógeno (Figura 2).

O crescimento micelial de *C. gloeosporioides* foi inibido em estudo feito por Fuga et al. (2011), no qual foi avaliada a inibição do crescimento micelial desse patógeno por diversos isolados bacterianos. Entre as possíveis explicações para esse resultado encontra-se a competição por nutrientes entre as rizobactérias e o fungo, e a produção de substâncias prejudiciais ao patógeno (TROTEL-AZIZ et al., 2008), pois há uma enorme variação na síntese de substâncias antifúngicas produzidas *in vitro* contra o patógeno (FUGA et al., 2011). Destacando-se a produção dessas substâncias no biocontrole, estudo feito por Shiomi et al. (2008) testou 95 isolados de rizobactérias do milho com ação antagônica a patógenos de plantas e resultou em seis isolados promissores para o controle de fitopatógenos, devido à produção de compostos tóxicos, de sideróforos e de enzimas extracelulares responsáveis pelo antagonismo.



**Figura 2** – Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Bipolaris* sp. pareado com cinco isolados de rizobactérias.



### Conclusão

O isolado P23 atuou significativamente na inibição do crescimento micelial de *Bipolaris* sp., apresentando potencial de utilização em futuros programas de controle biológico da mancha de *Bipolaris* sp. na cultura do milho.

### Referências Bibliográficas

- CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Ed.). **Milho**: estratégia de manejo para alta produtividade. Piracicaba: ESALQ, USP, 2003. p. 1-18.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças foliares**. In: PEREIRA FILHO, I. A. (Ed.). **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/dfoliares.htm>>. Acesso em: 31 jul. 2016.
- FUGA, C. A. G.; GONÇALVES, D. C.; CUNHA, W. V. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Bacillus* spp. *in vitro*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 1, p. 188-194, jul. 2011.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.
- SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.
- TROTEL-AZIZ, P.; CONDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 21-32, Sep. 2008.