

Sensibilidade *in vitro* de urediniósporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis**

Claudia C. F. dos Santos^{1**}, Hilário A. de Castro¹, Wagner Bettiol², Américo Angeli Júnior^{1***}

¹ UFLA, Depto. de Fitossanidade, C.P. 37, 37.200-000, Lavras-MG. E-mail: claudia@cnpmembrapa.br

² EMBRAPA/CNPMA, C.P. 69, 13820-000, Jaguariúna-SP.

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras.

** Bolsista da CAPES

*** Bolsista do CNPq

Aceito para publicação em: 02/03/98.

RESUMO

Santos, C.C.F. dos, Castro, H.A., Bettiol, W., Angeli Junior, A. Sensibilidade *in vitro* de urediniosporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica*, v.24, p.183-185, 1998.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de vinte e quatro isolados de *Bacillus subtilis*, antagônicos a *Pyricularia oryzae*, sobre *Puccinia psidii*, agente causal da ferrugem do eucalipto. Três desses isolados foram provenientes de folhas de eucalipto, enquanto os demais foram procedentes de folhas de arroz. Os isolados bacterianos foram testados *in vitro*, sob a forma de caldo

fermentado, caldo fermentado autoclavado e sobrenadante, quanto à capacidade de inibição da germinação de urediniosporos do patógeno. Todos os isolados reduziram a germinação dos urediniosporos nas três formas empregadas, demonstrando que os metabólitos produzidos por *B. subtilis* são termoestáveis e a inibição independe da presença de células vivas.

Palavras-chave adicionais: Ferrugem do eucalipto, controle biológico.

ABSTRACT

Santos, C.C.F. dos, Castro, H.A., Bettiol, W., Angeli Junior, A. *In vitro* sensibility of *Puccinia psidii* urediniospores to *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica*, v.24, p.183-185, 1998.

The present work aimed at evaluating the effect of twenty-four isolates of *Bacillus subtilis*, antagonistic to *Pyricularia oryzae*, on *Puccinia psidii*, the causal agent of eucalyptus rust. Three of these isolates were from eucalyptus leaves, while the others were from rice leaves. The bacterial isolates were tested *in vitro*, as

fermented broth, autoclaved fermented broth and supernatant, checking the effect on the germination of *P. psidii* urediniospores. All isolates decreased urediniosporic germination in the three preparations used, showing that metabolites produced by *B. subtilis* are heat-stable and the inhibition independent of living cells.

Additional keywords: Eucalyptus rust, biological control.

A ferrugem do eucalipto, causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter, é de ocorrência comum em eucaliptais suscetíveis à doença, com até dois anos de idade, em brotações após o corte ou até o estágio fenológico B, podendo causar severos danos a nível de viveiro ou campo (FERREIRA, 1989).

Há fungicidas eficientes para o controle da ferrugem, entretanto o uso indiscriminado desses produtos pode trazer consequências indesejáveis ao ambiente. Na busca de alternativas para o controle de doenças, espécies resistentes associadas ao controle biológico podem constituir-se em soluções interessantes.

Muitos trabalhos demonstram o potencial do controle biológico de doenças foliares por meio do manejo de bactérias residentes ou não no filoplano. Dentre estas, *Bacillus* spp. são frequentemente encontradas no filoplano de muitas espécies vegetais. BETTIOL (1988) obteve isolados desta bactéria a partir de folhas de arroz e eucalipto. *Bacillus subtilis* Cohn é descrita como bactéria móvel, aeróbia, Gram-positiva, em forma de bastonete, com flagelos peritríquios e que ocorre em diversos ambientes, podendo, em condições adversas, produzir esporos que permitem a sua sobrevivência (SNEATH, 1986). A capacidade de produção de antibióticos junto a substâncias que atuam como surfactantes, pode ser uma das maneiras pelas quais *B. subtilis* exerce antagonismo a várias espécies de fitopatógenos (GOTTLIEB & SHAW, 1970). A ação principal de *B. subtilis* ocorre na germinação de esporos (BETTIOL, 1991).

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar o efeito de vinte e quatro isolados de *B. subtilis* sobre a germinação *in vitro* de uredíniosporos de *Puccinia psidii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliaram-se vinte e quatro isolados de *B. subtilis* antagonísticos a *Pyricularia oryzae* Cav. (*Magnaporthe grisea*) (BETTIOL & KIMATI, 1989) quanto à capacidade de inibição *in vitro* da germinação de uredíniosporos de *P. psidii*. Três desses isolados (AP-02, AP-11 e AP-14) foram provenientes de folhas de eucalipto, enquanto os demais foram procedentes de folhas de arroz. Cultivaram-se os isolados de *B. subtilis* em tubos de ensaio de 15 cm de comprimento contendo 5 ml de meio sólido de KADO & HESKETT (1970), sob condições normais de laboratório, durante 48 horas. Adicionou-se água destilada esterilizada aos tubos, até a altura do meio de cultura, agitando-os manualmente para obtenção de uma suspensão bacteriana. Transferiu-se uma alíquota de 1,5 ml da suspensão para erlenmeyers de 50 ml de capacidade contendo 20 ml de meio 523 de Kado e Heskett líquido, os quais foram dispostos em agitador, sob condições de ambiente de laboratório, durante 7 dias consecutivos. Após o período de incubação, o caldo obtido foi separado em três partes iguais, permanecendo a primeira parte sem alteração, a qual foi denominada caldo fermentado (CF). A segunda parte foi centrifugada a 11.180 g durante 10 min. para obtenção do sobrenadante (S), e a terceira autoclavada a 120°C/20 min., obtendo-se o caldo fermentado autoclavado (CFA).

Uma suspensão de uredíniosporos de *P. psidii* contendo Tween 80 a 1% foi preparada e sua concentração ajustada a $2,0 \times 10^4$ esporos/ml com auxílio de um hemocitômetro.

Amostras de 5 µl da suspensão foram depositadas em lâminas escavadas. A seguir, 5 µl das preparações, CF, CFA ou S foram depositados sobre a suspensão de uredíniosporos. As lâminas

foram colocadas em caixas de plástico incolor transparente tipo GERBOX, envolvidas em papel alumínio, contendo em seu interior uma camada de algodão umedecida em água sob uma folha de papel de filtro também previamente umedecida em água. Dois tratamentos testemunhas foram empregados: deposição de 5,0 µl da suspensão de uredíniosporos junto a 5,0 µl de água destilada e deposição de 5,0 µl da suspensão de uredíniosporos junto a 5,0 µl do meio 523 de Kado e Heskett líquido.

Após 12 horas de incubação sob temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, determinou-se a porcentagem de germinação, com base no número de uredíniosporos germinados e no número total de uredíniosporos, realizando-se dez leituras (10 campos sob aumento de 400x). Considerou-se como uredíniosporo germinado aquele que apresentava um tubo germinativo com comprimento de, no mínimo, duas vezes o maior diâmetro do esporo. Todos os tratamentos foram repetidos quatro vezes, sendo cada repetição constituída de uma lâmina escavada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de germinação *in vitro* de uredíniosporos de *P. psidii* em presença dos 24 isolados de *B. subtilis* foi reduzida significativamente nas três formas empregadas (Quadro 1). Apenas nos tratamentos em que se aplicou o CFA dos isolados AP-11, AP-12, AP-14, AP-105, AP-114, AP-339 e AP-420 detectou-se germinação de uredíniosporos, ainda que insignificante quando comparada à testemunha. Mesmo assim, neste caso, os uredíniosporos apresentaram germinação rudimentar, exibindo tubos germinativos com comprimento reduzido e extremidades de formato alterado, além de estarem localizados às margens das gotículas, o que provavelmente dificultou um maior contato com o CFA. Similarmente, hifas de *Eutypa lata* em contato com *B. subtilis* tiveram as extremidades malformadas, espessas e com número anormal de vacúolos, enquanto os ascósporos do patógeno não germinaram quando em presença de substância tóxica produzida pela bactéria (FERREIRA et al., 1991).

Os resultados mostram que os isolados de *B. subtilis* antagonísticos a *Pyricularia oryzae* (saprófita facultativo) reduziram a germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii*, o qual é parasita biotrófico. Isto sugere que os produtos tóxicos produzidos pela bactéria, provavelmente, devem atuar em rotas metabólicas comuns a ambos os patógenos, mas para que tal suposição seja comprovada, seriam necessários testes específicos. MIZUBUTI (1992), constatando a ação antagonística de *B. subtilis* sobre a germinação de uredíniosporos de *Uromyces appendiculatus*, sugeriu que *B. subtilis* possua modo de ação abrangente e/ou produza diferentes substâncias antibióticas, devido ao efeito deletério constatado sobre patógenos de naturezas de parasitismo completamente distintas.

BETTIOL & KIMATI (1989) postularam que *B. subtilis* inibiu *P. oryzae* por antibiose. Provavelmente, *B. subtilis* atue alterando vários processos fisiológicos ou rotas metabólicas que sejam comuns a vários organismos. Em decorrência do provável amplo espectro de ação, o surgimento de isolados do patógeno resistentes aos antibióticos produzidos por *B. subtilis* pode ser menos frequente. Dessa forma, além da redução no uso de fungicidas, que são normalmente empregados para o controle da ferrugem do eucalipto, com a utilização de *B. subtilis* deve ser bastante reduzida a possibilidade de surgimento de isolados resistentes às substâncias antibióticas produzidas.

Quadro 1 - Porcentagem de germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii*, sobre lâminas de vidro, em presença de caldo fermentado (CF), sobrenadante (S) ou caldo fermentado autoclavado (CFA) de diferentes isolados de *Bacillus subtilis*.

Tratamentos	% de germinação*	Tratamentos	% de germinação*
AP - 02 CF	0	AP - 137 CF	0
AP - 02 S	0	AP - 137 S	0
AP - 02 CFA	0	AP - 137 CFA	0
AP - 03 CF	0	AP - 165 CF	0
AP - 03 S	0	AP - 165 S	0
AP - 03 CFA	0	AP - 165 CFA	0
AP - 11 CF	0	AP - 181 CF	0
AP - 11 S	0	AP - 181 - S	0
AP - 11 CFA	2,00**	AP - 181 CFA	0
AP - 12 CF	0	AP - 183 - CF	0
AP - 12 S	0	AP - 183 - S	0
AP - 12 CFA	2,78**	AP - 183 - CFA	0
AP - 14 CF	0	AP - 203 - CF	0
AP - 14 S	0	AP - 203 - S	0
AP - 14 CFA	3,18**	AP - 203 - CFA	0
AP - 42 CF	0	AP - 336 CF	0
AP - 42 S	0	AP - 336 S	0
AP - 42 CFA	0	AP - 336 CFA	0
AP - 51 CF	0	AP - 339 CF	0
AP - 51 S	0	AP - 339 S	0
AP - 51 CFA	0	AP - 339 CFA	1,59**
AP - 91 CF	0	AP - 365 CF	0
AP - 91 S	0	AP - 365 S	0
AP - 91 CFA	0	AP - 365 CFA	0
AP - 94 CF	0	AP - 401 CF	0
AP - 94 S	0	AP - 401 S	0
AP - 94 CFA	0	AP - 401 CFA	0
AP - 105 CF	0	AP - 420 CF	0
AP - 105 S	0	AP - 420 S	0
AP - 105 CFA	3,98**	AP - 420 CFA	2,39**
AP - 114 CF	0	AP - 429 CF	0
AP - 114 S	0	AP - 429 S	0
AP - 114 CFA	1,19**	AP - 429 CFA	0
AP - 115 CF	0	AP - 471 CF	0
AP - 115 S	0	AP - 471 S	0
AP - 115 CFA	0	AP - 471 CFA	0
Test. água	33,30	Test. Meio Kado Heskett	35,00

* Média de 4 lâminas x 10 campos/lâmina (aumento 400x). ** Germinação rudimentar de uredíniosporos às margens da gotícula.

O sobrenadante de *B. subtilis* reduziu a germinação de uredíniosporos de *P. psidii*, demonstrando que o efeito inibitório independe da presença de células vivas. De acordo com MIZUBUTI (1992), o(s) princípio(s) ou substância(s) ativa(s) causador(es) da inibição difundem-se no meio de cultura e seu efeito mostra-se independente da presença de células bacterianas. Algum composto produzido por *B. subtilis* e liberado no meio de

cultura é o responsável pela redução da germinação dos uredíniosporos. Segundo BAKER et al. (1983), essa substância seria uma glicoproteína (95% de proteína e 5% de carboidratos) com peso molecular de 5-10 Kdaltons.

Os resultados obtidos com o caldo fermentado autoclavado de *B. subtilis* demonstraram que os metabólitos produzidos pela bactéria são termoestáveis.

Em vista dos resultados obtidos, constata-se o potencial de *B. subtilis* para o controle da ferrugem do eucalipto. Entretanto, pesquisas mais aplicadas, como ensaios *in vivo*, a busca de isolados mais eficientes e o estudo da compatibilidade da bactéria com fungicidas devem ser realizados, visando reduzir os danos decorrentes da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, C.J., STAVELY, J.R., THOMAS, C.A., SASSER, M., MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoly* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, St. Paul, v.73, n.8, p.1148-1152, 1983.
- BETTIOL, W. Seleção de microorganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba, 1988. 140p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo.
- BETTIOL, W., KIMATI, H. Seleção de microorganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.15, n.3-4, p.257-266, 1989.
- BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: Bettiol, W. (Org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPMA, 1991. p.33-52.
- FERREIRA, F.A. *Patologia florestal, principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- FERREIRA, J.H.S., MATTHEE, F.N., THOMAS, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, p.283-287, 1991.
- GOTTLIEB, D., SHAW, P.D. Mechanisms of action of antifungal antibiotics. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.8, p.371-402, 1970.
- KADO, C.I., HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, p.969-976, 1970.
- MIZUBUTI, E.S.G. *Controle da ferrugem do feijoeiro com Bacillus subtilis*. Viçosa, 1992. 87p. Tese (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa.
- SNEATH, P.H. Endospore - forming Gram - Positive Rods and Cocci. In: Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wickins, 1986. p.1104-1207.