



Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* e *Bacillus velezensis* no biocontrole de fitopatógenos agrícolas
*Volatile organic compounds of *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* and *Bacillus velezensis* in the biocontrol of agricultural phytopathogens*

SCHUSTER-RUSSIANO, Maira Cristina¹; DOS SANTOS, Joeliton Campani²;
SALVADORI, Camila Natasha³; SABURO, Roberto Sadão Sinabucro⁴; MAZARO,
Sérgio Miguel⁵;

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná, maira.schuster@outlook.com; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campanijeliton@gmail.com; ³Universidade Tecnológica Federal do Paraná, camilasalvadori@alunos.utfpr.edu.br; ⁴Universidade Tecnológica Federal do Paraná, robertossaburo@gmail.com; ⁵Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sergio@utfpr.edu.br.

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de agroecossistemas

Resumo: O uso de microrganismos benéficos aplicados ao controle biológico de doenças, é uma ferramenta eficaz e em pleno crescimento agroecológico. O trabalho objetivou verificar o potencial de cepas dos antagonistas *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* e *Bacillus velezensis*, quanto a antibiose por produção de compostos orgânicos voláteis, capazes de inibir ou reduzir o crescimento micelial de *Fusarium tucumaniae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. O experimento foi conduzido em placas de Petri®, onde um foi posto um disco de micélio do fitopatógeno no centro da placa, e na parte superior adicionado a placa do antagonista, compondo a metodologia da placa selada. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Pode-se perceber que *B. velezensis* reduziu o crescimento de todos os fitopatógenos estudados, através da liberação de compostos orgânicos voláteis, enquanto as cepas de *T. asperellum* e *T. harzianum* não apresentaram controle.

Palavras-chave: antibiose; antagonistas, solo, doenças, biológicos.

Introdução

A agroecologia aborda o ambiente com um enfoque sistêmico, ou seja, com uma visão integrada, sem isolar os fatores, mas trabalhando de forma conjunta e dinâmica, onde os sistemas produtivos e elementos estão interligados e interagindo, tendo sobre si uma interdependência, chegando ao equilíbrio (STAMATO, 2005). O uso indiscriminado de agrotóxicos traz riscos à saúde humana, animal e ambiental, e foge dos princípios agroecológicos, pois culmina no desequilíbrio do ecossistema. Logo, uma abordagem biológica no controle de pragas e doenças traz maior segurança, pois consiste em empregar um organismo (predador, parasita ou patógeno) capaz de controlar outro organismo considerado danoso ao agroecossistema (PENTEADO, 2011).

Dentre os principais fitopatógenos habitantes de solo, tem se *Fusarium* spp., causador da síndrome da morte súbita (KIMATI et al. 1997); *Sclerotinea sclerotiorum*, causadora do mofo branco (SEIXAS; MAZARO; REY, 2017); e



Rhizoctonia solani, que ocasiona tombamento de plântulas (AMORIN; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Os antagonistas comumente utilizados no controle biológico destes fitopatógenos, pertencem aos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus*. *Trichoderma* spp. é um fungo saprofítico, encontrado na superfície do solo e serapilheira, geralmente em solos ácidos e em climas temperados, produzindo clamidósporos ou microescleródios, que são estruturas de resistência (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019). Já *Bacillus* spp. correspondem a bactérias gram-positivas, que formam esporos e endosporos resistentes ao calor, e se caracterizam por produzirem distintos compostos ativos (MEYER et al. 2022). Dentre os mecanismos de ação destes antagonistas, podem se citar: competição por espaço e nutrientes, antibiose, produção de compostos orgânicos voláteis e indução de resistência (BENITEZ, 2004).

Desta forma, o trabalho objetivou verificar o potencial dos antagonistas *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* e *Bacillus velezensis*, quanto a antibiose por produção de compostos orgânicos voláteis, capazes de inibir ou reduzir o crescimento micelial de *F. tucumaniae*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*.

Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. Para avaliação dos compostos orgânicos voláteis, foi utilizado o método da placa selada, ou também chamado de método da placa invertida (INTANA et al. 2021).

Em câmara de fluxo laminar, com placas de Petri® de 8,3 cm de diâmetro, contendo 15 mL de meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) solidificado, foi transferido utilizando alça de platina estéril, um disco de micélio de 7 mm de diâmetro do antagonista *T. asperellum* e *T. harzianum*; e 20 µL de *Bacillus velezensis*, diluído na concentração de 10⁹ células/g. As placas foram vedadas e incubadas em BOD à 25°C com um fotoperíodo de 12 horas, por um período de sete dias, a fim de que os antagonistas completassem o crescimento sobre a placa. Em seguida, em placas de Petri® contendo o mesmo meio BDA solidificado, foi disposto no centro de cada placa, um disco de micélio de 7 mm de diâmetro do respectivo fitopatógeno (*F. tucumaniae*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*), e na parte superior foi adicionado a placa de cada antagonista com o crescimento prévio de sete dias, compondo a metodologia da selada/invertida (Figura 1). Cada placa correspondente a uma unidade experimental.



Figura 1. Esquema da placa selada, disposto de uma placa contendo o antagonista e na outra o microrganismo fitopatogênico, vedados com plástico filme.

As placas foram vedadas com plástico filme, e incubadas em BOD à 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Com auxílio de uma régua graduada avaliou-se a cada 24 horas o crescimento micelial dos patógenos, até cada testemunha atingir o crescimento completo na placa. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetição por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors; por se tratar de um experimento qualitativo x quantitativo, realizou-se a ANOVA (scott knott à 5% de probabilidade de erro) seguido da análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017). A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada com base na fórmula de Menten et al. (1976):

$$Inibição (\%) = \left[\frac{\phi \text{ da testemunha} - \phi \text{ do tratamento}}{\phi \text{ da testemunha}} \right] * 100$$

Os fitopatógenos utilizados, *Fusarium tucumaniae* (CMES 25), *Sclerotinia sclerotiorum* (CMES 2131) e *Rhizoctonia solani* (CMES1861) foram obtidos da “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais” da Embrapa Soja em Londrina, PR.

Resultados e Discussão

Ao testar os compostos orgânicos voláteis destes três antagonistas empregados no controle biológico de doenças, pode-se perceber que para os três fitopatógenos, apenas *B. velezensis* apresentou efeito de antibiose (figura 2 e tabela 1). Havendo uma redução de 51% no crescimento micelial de *F. tucumaniae* e em torno de 70% de redução de *S. sclerotiorum* e *R. solani*, no quarto dia de avaliação.

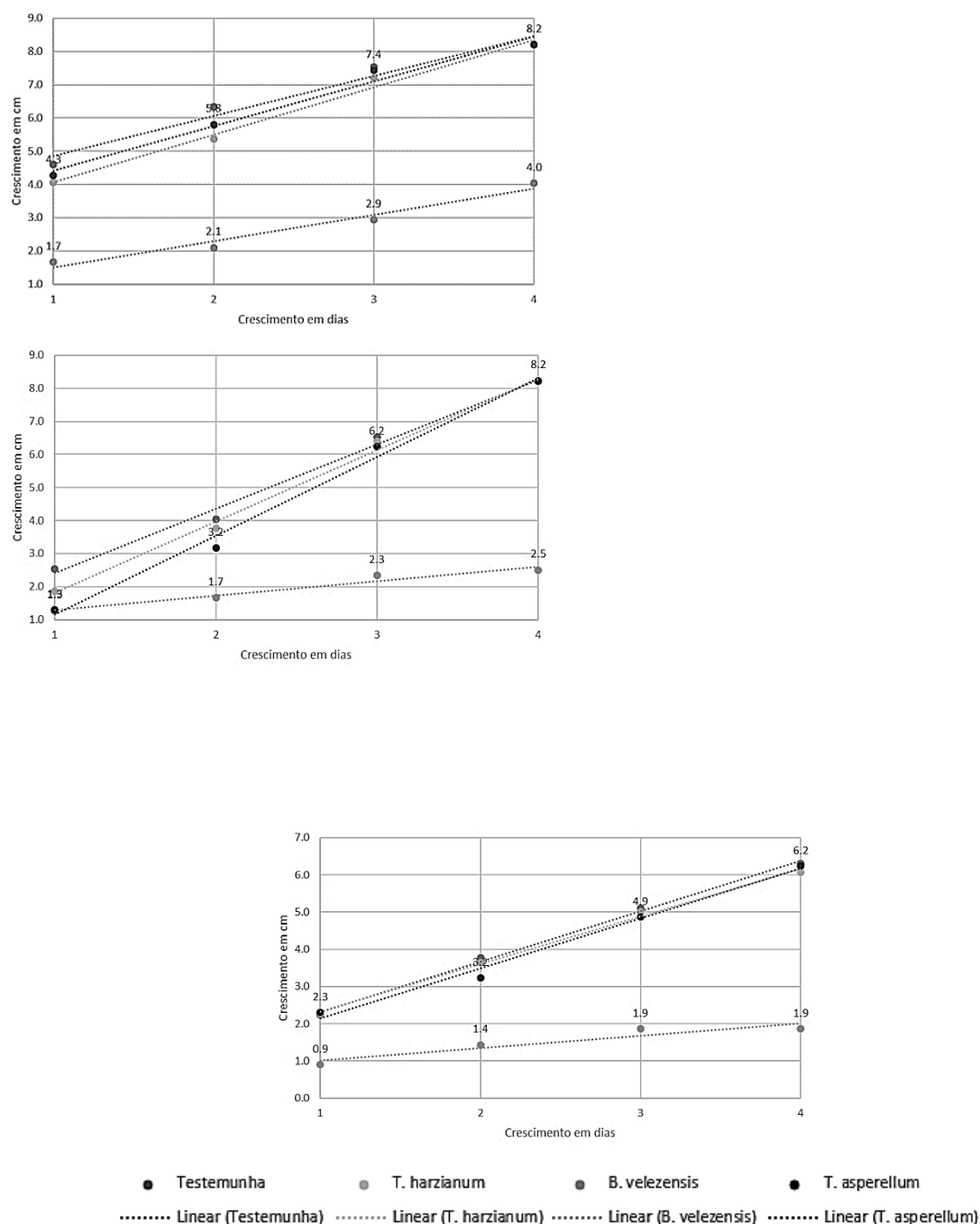


Figura 2. Efeito dos compostos orgânicos voláteis de *T. asperellum*, *T. harzianum*, e *B. velezensis* sobre *F. tucumaniae*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* respectivamente. (CV = 8,14%, *F. tucumaniae*; 11,47, *S. sclerotiorum*; e 8,19%, *R. solani*).

Tabela 1. Equação da reta e R^2 referentes à regressão da figura 1.

Tratamento	Equação da reta	R^2
<i>Fusarium tucumaniae</i>		
Testemunha	$y = 1.2x + 3.6667$	0.9620
<i>T. harzianum</i>	$y = 1.4233x + 2.65$	0.9887



<i>B. velezensis</i>	$y = 0.7933x + 0.7$	0.9656
<i>T. asperellum</i>	$y = 1.3433x + 3.0667$	0.9790
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		
Testemunha	$y = 1.95x + 0.45$	0.9909
<i>T. harzianum</i>	$y = 2.1633x - 0.35$	0.9947
<i>B. velezensis</i>	$y = 0.4367x + 0.85$	0.9568
<i>T. asperellum</i>	$y = 2.3867x - 1.2333$	0.9909
<i>Rhizoctonia solani</i>		
Testemunha	$y = 1.3533x + 0.966$	0.9970
<i>T. harzianum</i>	$y = 1.2767x + 1.05$	0.9967
<i>B. velezensis</i>	$y = 0.3333x + 0.6833$	0.8787
<i>T. asperellum</i>	$y = 1.3433x + 0.8$	0.9897

O mesmo foi observado por Massawe et al. (2018), onde cepas de *Bacillus* endofíticas, isoladas de sementes de milho, produziram oito compostos orgânicos voláteis danosos à *S. sclerotiorum*, e quatro compostos voláteis que induziram acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células, interferindo na produção de escleródios e no crescimento micelial. Verificando também, que os compostos voláteis produzidos por *B. velezensis* ocasionaram alterações morfológicas nas membranas das organelas miceliais do fitopatógeno.

Em trabalho realizado por Santos et al. (2022) constataram que compostos orgânicos voláteis de *Bacillus* sp. foram capazes de reduzir o crescimento micelial e promover danos morfológicos às células de *F. kalimantanense* pertencente ao complexo *F. oxysporum*, agente causador do mal do Panamá na cultura da bananeira. Outra cepa de *B. subtilis* estudada, foi capaz de reduzir severamente o crescimento micelial de *R. solani* e *Pythium ultimum* por meio da liberação de compostos orgânicos voláteis, ocasionando anomalias fisiológicas nas células, distorção e vacuolização das hifas, devido ao estresse (FIDDAMAN; ROSSAL, 1993).

O efeito volátil de cada espécie pode diferir de acordo com a cepa trabalhada. Rao et al. (2022) verificaram que a cepa de *Trichoderma atroviride* LZ42 libera compostos voláteis capazes de reduzir o crescimento micelial de *F. oxysporum* com a metodologia da placa selada, além de atuar como um bioestimulador de mudas de tomateiro. Qualhato et al. (2013) ao trabalhar com cepas de *T. harzianum* e *T. asperellum* observaram que algumas cepas apresentavam efeitos na redução do crescimento micelial de *F. solani*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* através da liberação de compostos orgânicos voláteis.

Conclusões

Pode-se observar que a cepa de *B. velezensis* estudada, apresentou efeito de antibiose por meio da liberação de compostos orgânicos voláteis, capazes de reduzir o crescimento micelial dos fitopatógenos habitantes de solo *F. tucumaniae*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*; enquanto as cepas de *T. harzianum* e *T. asperellum* não foram eficazes no controle dos fitopatógenos.



Agradecimentos

Agradecimento ao apoio da CAPES e à UTFPR.

Referências bibliográficas

AMORIN, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Vol.01. 4 ed. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, SP, 2011. ISSN 978-85-318-0052-8.

INTANA, W., KHEAWLENG, S., SUNPAPAO, A. *Trichoderma asperellum* T76-14 liberou compostos orgânicos voláteis contra a podridão pós-colheita de frutas em melões (*Cucumis melo*) causada por *Fusarium incarnatum* . **J Fungi (Basileia)**. 2021;7(1):46. Publicado em 12 de janeiro de 2021. doi:10.3390/jof7010046.

KIMATI, H., AMORIN, A., BERGAMIN FILHO, L.E.A., CAMARGO, J.A.M., REZENDE. São Paulo, Agronômica Seres, 3 ed. 1997.

MASSAWE, V.C., HANIF, A., FARZAND, A., MBURU, D.K., OCHOLA, S.O., WU, L., TAHIR, H.A.S., GU, Q., WU, H., GAO, X. Volatile Compounds of Endophytic *Bacillus* spp. have Biocontrol Activity Against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. 2018 Dec;108(12):1373-1385. doi: 10.1094/PHYTO-04-18-0118-R. Epub 2018 Oct 31. PMID: 29927356.

MENTEN, J.O. M; MACHADO, C. C; MINUSSI, E; CASTRO, C; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MEYER, M.C. **Bioinsumos na cultura da soja**. - Brasília, DF: Embrapa, 2022.

MONTE, E., BETTIOL, W., HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças em plantas. In MEYER, M.C., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. **Trichoderma uso da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PENTEADO, S.R. Agricultura orgânica. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação, (Série Produtor Rural, Edição Especial), 2001. 41 p.

QUALHATO, T.F., LOPES, F.A., STEINDORFF, A.S., BRANDÃO, R.S., JESUINO, R.S., ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett**. 2013 Sep;35(9):1461-8. doi: 10.1007/s10529-013-1225-3. Epub 2013 May 21. PMID: 23690037.

RAO, Y., ZENG, L., JIANG, H., MEI, L., WANG, Y. *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings. **BMC Microbiol**. 2022 Apr 5;22(1):88. doi: 10.1186/s12866-022-02511-3. PMID: 35382732; PMCID: PMC8981656.



SANTOS, J.E.A., DE BRITO, M.V., PIMENTA, A.T.A., DA SILVA, G.S., ZOCOLO, G.J., MUNIZ, C.R., DE MEDEIROS, S.C., GRANGEIRO, T.B., LIMA, M.A.S., DA SILVA, C.F.B. Antagonism of volatile organic compounds of the *Bacillus* sp. against *Fusarium kalimantanense*. **World J Microbiol Biotechnol**. 2022 Dec 27;39(2):60. Doi: 10.1007/s11274-022-03509-9. PMID: 36574179.

SEIXAS, C. D. S., MAZARO, S. M., REY, M. S. **Sistemas de produção de soja orgânica**. In Mazaro, S. M. Porto Alegre RS, Editora cinco continentes, 2017.

STAMATO, B. **Cartilha** - Agricultura ecológica, manejo de agroecológico, agroecologia, agricultura familiar, técnicas ecológicas. Instituto Giramundo Mutuano. Botucatu, SP. Editora Criação Ltda, 2005.