CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* CONTRA *MACROPHOMINA* SPP.

MANUELLA COSTA SOUZA[1], FLÁVIA LUANE GOMES[2], LISANDRA LIMA LUZ[3], LÍLLIAN FRANÇA BORGES CHAGAS[4] e ALOÍSIO FREITAS CHAGAS JÚNIOR[5]

[1]Mestranda, PPGBiotec, UFT, Gurupi – TO, manuellacostasouza@mail.uft.edu.br
[2]Mestranda, PPGBiotec, UFT, Gurupi – TO, fluaneg@gmail.com
[3]Acadêmica em Agronomia, UFT, Gurupi – TO, lisandra.lima.luz@gmail.com
[4]Dr. Prof. Adj., UFT, Gurupi – TO, lillianfbc@mail.uft.edu.br
[5]Dr. Prof. Adj., UFT, Gurupi – TO, chagasjraf@mail.uft.edu.br

Apresentado no
Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC
15 a 17 de setembro de 2021

RESUMO: As culturas agrícolas estão sendo cada vez mais atacadas por microrganismos que causam baixa produtividade e extremas perdas aos produtores. O uso de produtos químicos já não apresenta eficiência adequada, sendo então introduzido o controle biológico, no qual microrganismos antagonistas, como as rizobactérias, conseguem realizar a inibição de patógenos. Este estudo teve como finalidade a avaliação do potencial antagonista da bactéria *Pseudomonas fluorescens* contra o fungo *Macrophomina* spp., utilizando três métodos diferentes, sendo cultura fúngica sobre cultura antagonista, método da cultura pareada, e método de pareamento com risco central, realizando todo o experimento em triplicata. As avaliações foram realizadas com sete dias após incubação em câmara de crescimento B.O.D., realizando-se medição das colônias e calculando-se a porcentagem de cescimento, submetendo-se em seguida os dados ao teste de Tukey a 5% de significância. Foi constatado que a *Pseudomonas flurescens* foi eficaz na inibição de crescimento micelial do fungo patogênico *Macrophomina* spp.
PALAVRAS-CHAVE: Antagonismo, microrganismo, antibiose, patógeno.

BIOLOGICAL CONTROL *IN VITRO* OF *PSEUDOMONAS* F*LUORESCENS* AGAINST *MACROPHOMINA* SPP.

ABSTRACT: Microorganisms that cause low growth rates and extremes for producers are increasingly attacking agricultural crops. The use of chemical products is no longer sufficient, so that biological control is introduced, no antagonist of microorganisms, such as rhizobacteria, is able to inhibit pathogens. This study used the evaluation of a potential antagonist of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* against the fungus *Macrophomina* spp., using three different methods, being fungal culture on antagonist culture, paired culture method, and central risk pairing method, performing all the triplicate experiment. As tests were performed seven days after incubation in the B.O.D. growth chamber, using colonies and calculations in the P.G.I. (percentage of growth inhibition), submitting the data to the Tukey test at 5% significance. The *Pseudomonas flurescens* was found to be effective in inhibiting the mycelial growth of the pathogenic fungus *Macrophomina* spp.
KEYWORDS: Antagonism, microorganism, antibiosis, pathogen.

INTRODUÇÃO

Uma das principais causas da baixa produtividade de culturas agrícolas são as doenças provocadas por patógenos que habitam o solo e podem causar prejuízos consideráveis com perdas expressivas na produtividade.

Os microrganismos são causadores de inúmeras reações químicas relacionadas ao processo de ciclagem de nutrientes para as plantas, sendo seu uso uma alternativa vantajosa para o aumento da produtividade e redução da incidência de doenças e pragas.

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) habitam e colonizam as raízes das plantas induzindo o crescimento vegetal, além de muitas também atuarem na absorção de nutrientes, como o fósforo, através da solubilização de fosfato, e síntese de fitohormônios como o ácido indol acético (AIA), e além disto têm a capacidade de produzirem substâncias que causam a inibição de patógenos, controlando assim efeitos deletérios e suprimindo os patógenos presentes por indução de resistência (Vessey, 2003; Compant et al., 2005).

No Brasil, as principais culturas agrícolas são frequentemente acometidas por várias pragas e doenças que causam sérios danos econômicos e perdas nas lavouras, podendo ser de origem bacteriana, fúngica, virótica ou provocada por nematoides, sendo que as doenças causadas por fungos atacam do início ao final da cultura e preocupam bastante os produtores, citando por exemplo o *Macrophomina phaseolina*, responsável por causar doenças em mais de 500 culturas diferentes, também chamado de podridão de tronco e raízes (Marroni & Germani; 2011).

A doença provocada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* causa diminuição no estande das plantas no campo, menor qualidade das sementes, além de induzir a maturação precoce e morte das plantas, visto que durante os estádios iniciais de infecção do patógeno na cultura, não são verificados sintomas perceptíveis nos órgãos aéreos das plantas, pois o mesmo ainda apresenta-se latente; quando as plantas se aproximam do final da estação de crescimento e o patógeno entra em sua fase necrotrófica, inicia o aparecimento de sintomas como murchas e necrose devido ao bloqueio de feixes vasculares através de suas estruturas, secreção de enzimas e toxinas patogênicas (Bellé & Fontana, 2018).

Um método muito utilizado de controle de patógenos é o químico, porém o uso intensivo vem gerando resistência microbiana, além da contaminação ambiental, o que tem levado a introdução do controle biológico utilizando microrganismos antagonistas (Moreira et al., 2008; Santos & Silvia, 2014).

O *Macrophomina phaseolina* é um fungo encontrado no solo, de difícil controle, pois formam estruturas de resistência denominadas microescleródios, resistindo ao controle químico, o que leva o produtor a optar pela rotação de culturas e o uso do controle biológico (Santos et al., 2010).

Um dos microrganismos que conseguem controlar o *Macrophomina phaseolina* é a bactéria *Pseudomonas fluorescens* devido sua capacidade de produção de diversos compostos antibióticos (Santos et al., 2010). A antibiose é a relação em que um ou mais metabólitos produzidos por um microrganismo causa um efeito danoso sobre outro, inibindo a germinação e o crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (Mariano et al., 2005).

A competição é a relação entre organismos vinculados na mesma atividade, podendo competir por espaço, oxigênio e nutrientes. *Pseudomonas fluorescens* são importantes antagonistas utilizadas no controle biológico visto que competem pelo Fe^{+3}, em mecanismos realizados por sideróforos (Mariano et al., 2005).

A *Pseudomonas fluorescens* é um dos mais efetivos antagonistas selecionados no solo, para supressão de doenças. *Pseudomonas* do solo produzem pigmentos verde-amarelados, fluorescentes, sendo fácil a observação em meio King-B, além de produzirem o 2,4-diacetilfloroglucinol, metabólito sintetizado por algumas colônias, muito importante para o controle biológico (Santos et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de *Pseudomonas fluorescens* como antagonista do fungo *Macrophomina* spp. *in vitro*, realizando três diferentes formas de confronto entre estes microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Tocantins – UFT, campus de Gurupi. Foram utilizados os isolados de *Pseudomonas fluorescens* e *Macrophomina* spp. do banco de cepas do laboratório e repicados em meio de cultura específico para cada microrganismo.

Para início do experimento, o fungo foi repicado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e armazenado por quatorze dias de incubação, em câmara de crescimento (B.O.D.) sob fotoperíodo de

12 horas à temperatura de 25 ± 2 °C (Salgado et al., 2003). Já a *Pseudomonas fluorescens* foi cultivada em meio de cultura líquido em shaker orbital, por 9 horas a 28 °C.

Neste estudo, a atividade antagonista de *Pseudomonas fluorescens* foi testada contra o fungo patógeno *Macrophomina* spp., utilizando-se três métodos.

No método A foi utilizada a técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista, onde 100 µl da bactéria fermentada foi colocado em placa de petri com meio de cultura B.D.A. e espalhado com alça de Drigalski estéril, e em seguida foi colocado no centro da placa um disco de 7 mm contendo meio de cultura com colônias da cultura fúngica com quatorze dias de crescimento.

No método B foi utilizada a técnica de cultura pareada, na qual um disco de 7 mm contendo meio de cultura com colônias da cultura fúngica com quatorze dias de crescimento foi colocado uma extremidade da placa de petri com meio de cultura B.D.A. a 5 mm de distância da borda, e na outra extremidade a também 5 mm de distância da borda da placa foi colocado 10 µl da bactéria fermentada (Melo & Valarini, 1995).

No método C foi utilizada a técnica de pareamento com risco no centro da placa de acordo com Dennis e Webster (1971) com algumas modificações, sendo que no centro da placa foi feito um risco de uma extremidade à outra utilizando 40 µl da bactéria fermentada, com o auxílio de uma micropipeta automática, e no centro de cada um dos lados da placa com meio de cultura B.D.A. foi colocado um disco de 7 mm contendo meio de cultura com colônias da cultura fúngica com quatorze dias de crescimento.

Além disso também foi feito a testemunha em placas com meio de cultura e um disco de 7 mm contendo meio de cultura com colônias da cultura fúngica com quatorze dias de crescimento dispostas no centro da placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após todos os procedimentos, o experimento foi incubado em câmara de crescimento (B.O.D.) sob fotoperíodo de 12 horas à temperatura de 25 ± 2 °C. Foi realizada uma avaliação com sete dias após os procedimentos, medindo o raio das colônias, em três sentidos diametralmente opostos, com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela fórmula de Menten et al. (1976), onde: PIC = [(Crescimento da testemunha – Crescimento do tratamento) / Crescimento da testemunha] x 100. Os tratamentos que não obtiveram inibição de crescimento receberam nota zero.

Os dados foram analisados no programa estatístico SISVAR, e submetido ao teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após sete dias em B.O.D., pode-se verificar a atuação da *Pseudomonas fluorescens* sobre o fungo *Macrophomina* spp., confirmando seu potencial no controle biológico deste fitopatógeno.

Como pode ser observado na tabela 1, todos os métodos testados apresentaram resultados significativos em relação à testemunha, onde pode-se perceber que em todos os testes a pseudômonas conseguiu inibir o crescimento do patógeno.

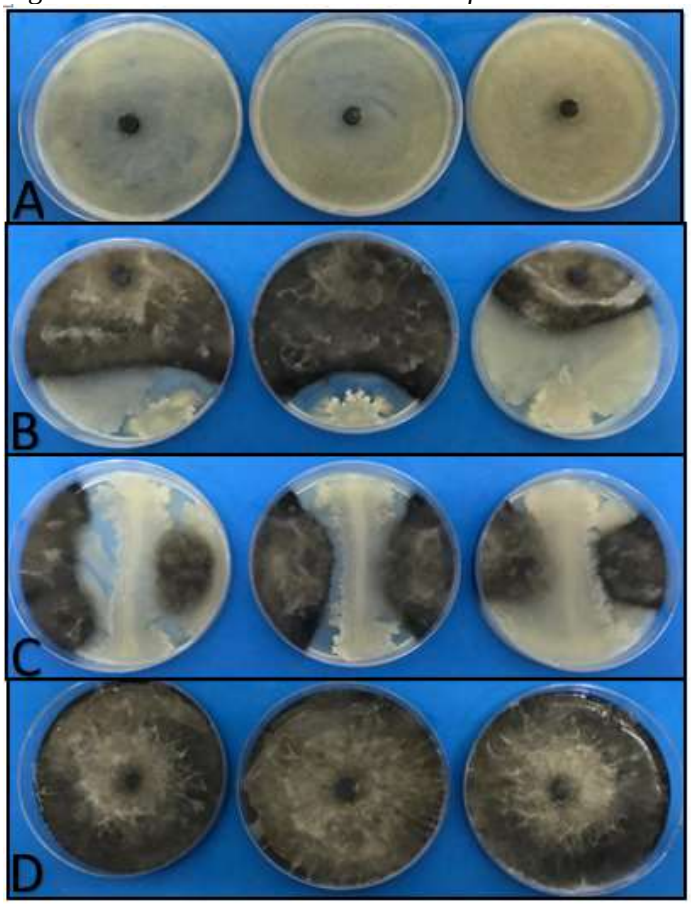
Tabela 1. Diâmetro das colônias de *Macrophomina* spp. e porcentagem de inibição

Tratamento	**Diâmetro da colônia (mm)**					
	Método A	**PCI (%)**	**Método B**	**PCI (%)**	**Método C**	**PCI (%)**
Pseudomonas	0,00 b	100	52,88 b	35,97	29,99 b	62,51
Testemunha	80,00 a		80,00 a		80,00 a	
CV (%)	0,00		4,20		8,04	

Observando os resultados obtidos nos três métodos, é possível verificar que o método 1 foi o mais eficaz contra a propagação do fungo, seguido pelo método 3 e pelo método 2, respectivamente.

Na figura 1 é possível observar a atuação da *Pseudomonas fluorescens* contra o *Macrophomina* spp., que possivelmente está atuando no processo de antibiose, que segundo Bettiol & Ghini (1995), é um processo no qual o microrganismo antagonista produz algum metabólito que causa efeito danoso sobre o outro microrganismo, podendo haver contato físico ou não entre eles.

Figura 1. Biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* contra *Macrophomina* spp.



Legenda: A (método A), B (método B), C (método C), e D (testemunha).
Fonte: autor

Gonzaga (2012) afirma em seu estudo que o antagonismo exercido pela *Pseudomonas flurescens* sobre patógenos é devido às inúmeras substâncias antimicrobianas capazes de produzir propriedades antifúngicas e antibacterianas como fenazinas, acetilfloroglucinol, oomicina, antranilatos, pioluteorina, pioverdinas, amônea, pioquelinas, entre outros.

Corroborando os resultados deste trabalho, Karunanithi et al. (2000) observaram que um isolado de *Pseudomonas fluorescens* produziu o composto antibiótico pirolinitrina, que foi capaz de inibir o crescimento de *Macrophomina phaseolina*, produzindo uma zona de inibição de 12 mm.

CONCLUSÃO

A rizobactéria *Pseudomonas flurescens* foi eficaz na inibição de crescimento micelial do fungo patogênico *Macrophomina* spp. pelos três métodos de antagonismo testados, sendo o método da cultura fúngica sobre cultura antagonista (método A), o que obteve maior porcentagem de inibição em relação aos demais.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

Bellé, R. B., Fontana, D. C. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. Enciclopédia Biosfera, v.15 n. 28 p. 779, 2018

Bettiol, W.; Ghini, Controle Biológico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. São Paulo: Ceres, P.717-728. 1995.

Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and environmental microbiology. v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

Dennis, C.; Webster, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. Transactions of the British Mycological Society. v. 57, p.359-363, 1971.

Gonzaga, A. D. Antagonismo de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o jardim de fungos associados a formigas cortadeiras Atta sexdens *Hymenoptera* (Formidae: Attini). 176f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. 2012.

Karunanithi, K. Muthusamy, M.; Seetharaman, K. Pyrolnitrin production by *Pseudomonas fluorescens* effective against *Macrophomina phaseolina*. Crop Research (Hisar), v. 19, n. 2, p. 368-370, 2000.

Mariano, R. L.; Silveira, E. B.; Gomes, A. M. Controle biológico de doenças radiculares. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais, 303. 2005.

Marroni, I. V.; Germani, J. C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L). Revista Brasileira de Agroecologia, v. 6, n. 3, p. 159-167, 2011.

Melo, I. S.; Valarini, P. J. Potential of rhizobacteria in the control of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in cucumber (*Cucumis sativum* L.). Scientia Agricola, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.

Menten, J. O. M; Machado, C. C; Minussi, E; Castro, C; Kimati, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de M*acrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "*in vitro*". Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

Moreira, C. G. Á.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Bonaldo, S. M.; Stangarlin, J. R.; Cruz, M. E. DA S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. Summa Phytopathologica, v.34, n.4, p.332-7, 2008.

Salgado, A. P. S. P.; Cardoso, M. D. G.; Souza, P. E. D.; Souza, J. A. D.; Abreu, C. M. P.; Pinto, J. E. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. Ciênc. agrotec. vol.27 no.2, 2003.

Santos, M. S. B.; Silva, A. A. C. R. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. Revista Ceres, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.

Santos, P.; Benato, L.; Souza, N. V.; Vieira, N.; Almeida, A. Utilização de *Pseudomonas fluorescens* no controle biológico de *Macrophomina phaseolina*. Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E). 2010

Vessey, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.Plant and soil, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.