



Efeito de *Pseudomonas fluorescens* sobre fungos de solo e promoção de crescimento em associação com *Azospirillum brasilense*
Effect of Pseudomonas fluorescens on soil fungi and growth promotion in association with Azospirillum brasilense

SANTOS, Joeliton Campani dos¹; SCHUSTER-RUSSIANO, Maira Cristina²; SALVADORI, Camila Natascha³; CUCHI, Danieli⁴; MAZARO, Sérgio Miguel⁵

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campanijoeliton@gmail.com; ² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, maira.schuster@outlook.com; ³ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, camilasalvadori@alunos.utfpr.edu.br; ⁴ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, danieli1cuchi@gmail.com; ⁵ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sergio@utfpr.edu.br.

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de Agroecossistemas

Resumo: As rizobactérias apresentam inúmeros benefícios já comprovados nos cultivos agrícolas. Com objetivo de avaliar a ação direta de *P. fluorescens* a patógenos e sua associação com *A. brasilense* na promoção de crescimento. Avaliou-se o potencial *P. fluorescens*, cepa ATCC 13525, no controle dos patógenos *Fusarium tucumaniae*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, em condições *in vitro*, utilizando a metodologia de confronto direto, avaliando o crescimento micelial diariamente. A promoção de crescimento, foi realizada em casa de vegetação, as sementes de soja da cultivar BS 1511 IPRO®, foram inoculadas, semeadas em vasos contendo substrato, 50 dias após a semeadura, avaliou-se o comprimento de parte aérea, do sistema radicular, a massa verde da parte aérea e massa verde das raízes. Para ambos os estudos o delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições. Quanto ao controle de patógenos obteve-se que *P. fluorescens*, reduziu o crescimento micelial de *F. tucumaniae*, já para *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* está estirpe não apresentou controle. Para a promoção de crescimento os resultados apresentam incrementos nas raízes, parte aérea e biomassa quando realizada a associação entre *P. fluorescens* e *A. brasilense*.

Palavras-chave: orgânicos; bioinsumos; sustentabilidade; agroecossistemas; rizobactérias.

Introdução

A crescente demanda de soja orgânica segue alinhada à tendência da sociedade de buscar hábitos de vida saudáveis (INAGAKI; JUNQUEIRA; BELLON, 2018). A grande diversidade de agentes fitopatogênicos que acometem a cultura, acarreta em grandes desafios no sistema de produção orgânico (SEIXAS; MAZARO; REY, 2017).

Os patógenos de solo apresentam difícil controle, e o uso de bioprodutos promove o equilíbrio da comunidade biótica do solo além de assegurar a qualidade do mesmo, propiciando maior sustentabilidade agrícola (FERREIRA et al., 2009). Deste modo, algumas cepas de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* são reconhecidas como antagonistas, tendo em vista a ação sobre vários patógenos de raiz, principalmente fungos de solo, num amplo número de plantas cultivadas (HAAS; DÉFAGO, 2005).



Já existem relatos científicos do uso de *P. fluorescens* no biocontrole de fungos de solo (SHOWKAT 2012; ALVARÉZ et al., 2015). No entanto, no Brasil tal bactéria vem sendo explorada como promotora de crescimento e solubilizadora de nutrientes, estando carente de informações sobre seu possível potencial no biocontrole de patógenos de solo (BETTIOL, 1991; HAAS; DÉFAGO, 2005). As bactérias do gênero *Azospirillum* além da Fixação Biológica do Nitrogênio, são capazes de produzir compostos promotores de crescimento em plantas ou induzir a planta a produzir estes compostos (RODRIGUES et al., 2012). Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antagonista da rizobactéria *P. fluorescens* sobre os principais fungos de solo. Tal qual, sua eficiência como promotora de crescimento em plantas de soja, ou quando associadas ao *A. brasiliense*.

Metodologia

Os experimentos foram conduzidos junto ao laboratório de Controle Biológico II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Os agentes biológicos e fitopatógenos foram obtidos da coleção de microrganismos do laboratório de Fitossanidade, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus Dois Vizinhos, provenientes da EMBRAPA Soja.

Por meio do teste de confronto direto avaliou-se a estirpe ATCC 13525 de *P. fluorescens*, quanto seu potencial de biocontrole de *F. tucumaniae*, *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Onde em fluxo laminar, com placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar), foram dispostos discos de micélio 7 mm de diâmetro, de um lado o fitopatógeno e do outro a *P. fluorescens*. Posteriormente, as placas foram vedadas com papel filme e incubadas em BOD com temperatura de 25 °C e 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. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada com base na fórmula de Menten et al. (1976):

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

Para avaliar os efeitos isolados e a co-inoculação entre *P. fluorescens* e *A. brasiliense* (cepa AbV6), realizou-se a inoculação com 2 ml + 2 ml/kg de semente, respectivamente, para cada agente biológico estudado, sendo estas na concentração de 2×10^8 UFC.ml⁻¹. O experimento de promoção de crescimento, conduzido em casa de vegetação, contendo 4 tratamentos com 4 repetições. Em vasos contendo substrato comercial, foram dispostas quatro sementes de soja cultivar BS 1511 IPRO® inoculadas. Quando as plantas atingiram estágio fenológico (V3- V4), realizou-se o desbaste deixando duas plantas/vaso. Aos cinquenta dias após a semeadura, avaliou-se o comprimento de parte aérea, do sistema radicular, a massa verde da parte aérea e massa verde das raízes. As plantas se encontravam no estágio fenológico vegetativo (V8-V9). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias agrupadas pelo teste de Skott Knott

a 5% de probabilidade, seguido da análise de regressão por meio do software R Biometrics (BHERING, 2017).

Resultados e Discussão

Para o controle de patógenos por meio do confronto direto, pode-se observar que o isolado de *P. fluorescens* não apresentou potencial antagonista sobre o crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Entretanto, quando confrontado com *F. tucumaniae*, a bactéria *P. fluorescens* reduziu o crescimento micelial.

Observa-se na figura 1, que em relação à testemunha nas 192 horas, houve redução do crescimento micelial de (A) *F. tucumaniae* em 13,26%. A redução micelial deu-se a partir do quinto dia de avaliação após o início do experimento. Corroborando com Sottero et al. (2006), que estudaram a aplicação de rizobactérias na cultura da alface (*Lactuca sativa*) e obtiveram que alguns isolados de bactéria *P. fluorescens* apresentaram competição *in vitro* contra *Fusarium* sp.

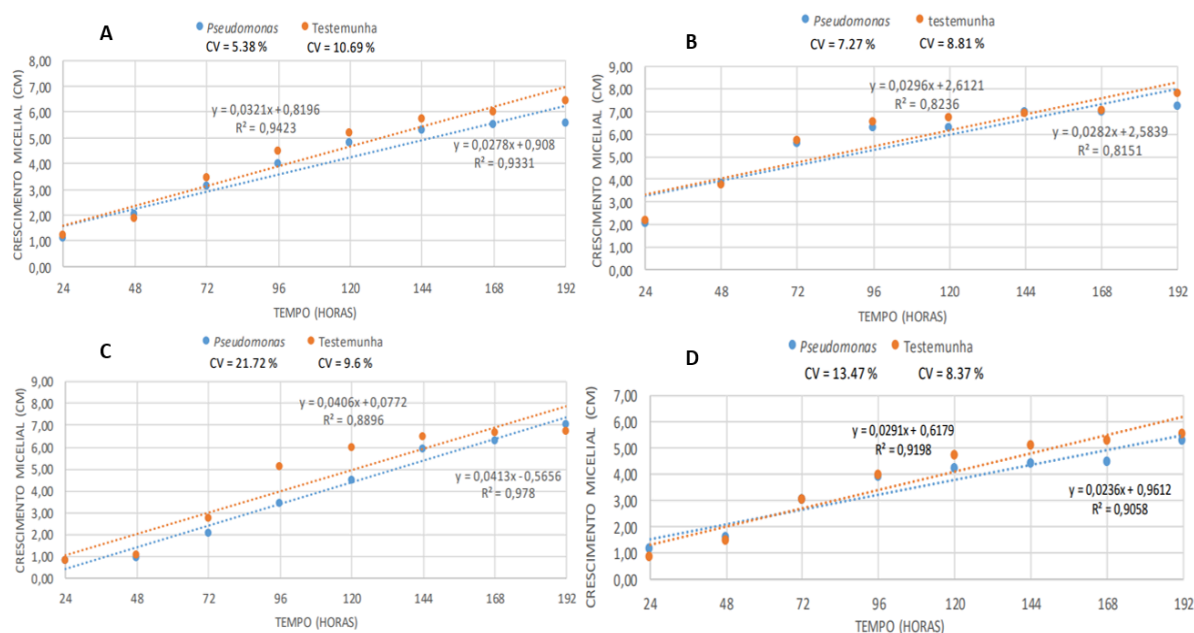


Figura 1: Resultado do potencial antagonista de *P. fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de A) *F. tucumaniae* B) *M. phaseolina* C) *S. sclerotiorum* e D) *R. solani* em 192 horas de avaliação.

Ainda na Figura 1, nota-se que não ocorreu a redução do crescimento micelial de (B) *M. phaseolina* e (C) *S. sclerotiorum*, quando realizado o confronto com *P. fluorescens* ao longo das 192 horas de avaliação. Embora *P. fluorescens* tenha se mostrado promissora para utilização no controle biológico, chegando a inibir até 54,2% do crescimento micelial e desenvolvimento de *M. phaseolina*, patógeno causador da podridão do carvão na soja (SANTOS et al., 2010), no presente trabalho nenhuma evidência torna significativa a eficiência desta cepa em relação ao desenvolvimento da testemunha. Aeron et al. (2011), observaram potencial



antifúngico da estirpe PS1 de *P. fluorescens* provocando alterações morfológicas nos micélios de *S. sclerotiorum*. Com potencial para ser agente biológico no controle do patógeno causador de mofo-branco em feijão, soja e algodão.

Observa-se que para (D) *R. solani*, ocorreu redução no crescimento micelial a partir da 120 horas, contudo no final do experimento houve redução de 4,68% no crescimento do patógeno, não demonstrando atividade antagonista. Contraposto de Brites, Dominguez e Grabowski (2019), que ao estudarem *P. fluorescens* reduziu em 45,3% o crescimento de *R. solani*, e tem suas justificativas pautadas considerando os compostos antimicrobianos hidrossolúveis produzidos por *P. fluorescens*.

Quanto à promoção de crescimento, houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1). Na variável comprimento de parte aérea, a associação de *A. brasilense* + *P. fluorescens*, apresentou melhor desempenho, contudo, não diferiu estatisticamente do tratamento isolado de *P. fluorescens*. Tais tratamentos apresentaram ganhos significativos quando comparados com a testemunha. A associação de *A. brasilense* + *P. fluorescens*, proporcionou também ganhos significativos para o comprimento de sistema radicular e massa verde da parte aérea, diferenciando dos demais tratamentos. Esses dados corroboram com a pesquisa de Pacentchuk et al. (2020), que obteve resultados positivos com a co-inoculação *P. fluorescens* na soja. Também verificado por Novinscak, Joly e Filion (2019), que a partir da inoculação de *P. fluorescens*, evidenciaram a capacidade da bactéria em aumentar a biomassa vegetal e o rendimento de óleo de sementes em soja e outras culturas como a canola.

Tratamentos	CPA (cm)	CSR (cm)	MVPA(g)	MVSR (g)
Testemunha	46c	57c	25c	19b
<i>A. brasilense</i>	53b	61b	34b	26a
<i>P. fluorescens</i>	59a	64b	33b	27a
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	64a	67a	39a	29a
CV%	13,4	12,5	9,7	8,6

*Médias seguidas pela mesma letra e mesma coluna não possuem diferença estatística pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 1: Comprimento parte aérea (CPA), comprimento sistema radicular (CSR), massa verde parte da aérea (MVPA), massa verde do sistema radicular (MVSR), de plantas de soja inoculadas com *P. fluorescens* + *A. brasilense*.

Para a massa verde do sistema radicular, a análise de variância (tabela 1) mostra que os tratamentos onde realizou-se a inoculação não diferiram entre si, no entanto esses três tratamentos diferiram da testemunha, onde não se realizou a inoculação. Levando em consideração a ação de *P. fluorescens* e *A. brasilense* como promotores de crescimento. Chiarini et al. (1997), por sua vez, ao estudarem *P. fluorescens* em plantas de sorgo, obtiveram incrementos tanto na massa da matéria fresca da parte aérea como também da raiz. Já para Gasoni et al. (2001) quando estudaram *P. fluorescens* na cultura da alface alcançaram respostas positivas



apenas em relação à massa da matéria fresca da parte aérea. E do mesmo modo, Bulegon et al. (2016) obtiveram resultados promissores com a inoculação *A. brasilense*, na cultura da soja. Hungria (2011), observou o potencial de incremento de raízes e altura das plantas de milho quando realizada a inoculação com *Azospirillum*. Bem como, Cotrim et al. (2016) que obteve que plântulas de trigo demonstraram benefícios no crescimento da raiz, da parte aérea e matéria seca de parte aérea através do tratamento via semente com ácido húmico em associação do *A. brasilense*.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos no estudo, pode-se concluir que *P. fluorescens* (ATCC 13525) em condições *in vitro*, apresenta redução do crescimento micelial de *F. tucumaniae*. Ainda, quando associada com *A. brasilense* atua na promoção de crescimento da cultura da soja, propiciando ganhos no comprimento de parte aérea e sistema radicular, bem como incrementos na biomassa das plantas. Destacando-se está como uma alternativa sustentável para uso nos cultivos orgânicos e nos convencionais, reduzindo o uso exacerbado de produtos agrotóxicos sintéticos.

Referências bibliográficas

AERON, A. DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K.; PANDEY, P.; BAJPAI, V.K.; KANG, S.C. Multifarious activity of bioformulated *Pseudomonas fluorescens* PS1 and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian rapeseed (*Brassica campestris* L.). **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 81–93, 21 abr. 2011.

ÁLVAREZ, S.P.; COTO ARBELO, O.; ÁVILA Q.G. *Pseudomonas fluorescens* Migula, controle biológico o patógeno: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen?. **Revista de Protección Vegetal**, v. 30, n. 3, p. 225- 234, 2015.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente** Livro científico, 1991.

BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17: 187-190p, 2017.

BRITEZ, A.; DOMINGUEZ, J.A.; GRABOWSKI, C.J. Bactérias benéficas, mecanismos de antagonismo no controle biológico de fungos patogênicos em sementes de soja (*Glycine max*). In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Recife. 2019. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. 2019.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Inoculation of Burkholderia cepacia, *Pseudomonas fluorencens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*. Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biol. Biochem.**, 30:81-87, 1997.

COTRIM, M. F.; ALVAREZ, R. C. F.; SERON, A. C. C. qualidade fisiológica de sementes de trigo em resposta a aplicação de *Azospirillum brasilense* e ácido húmico. **Revista Brasileira de Engenharia de Biossistemas**, 10:349-357, 2016.



FERREIRA, E. P. de B. VOSS, M.; DOS SANTOS, H. P.; DE-POLLI, H.; NEVES, M. C.; RUMJANEK, N. G. Diversidade de *Pseudomonas fluorescentes* em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 140-148, 2009.

GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOSSEN, V.; ZUMELZÚ, G.; BABBITT, S.; KAHN, N. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). **Plant Diseases Protec.**, p.530-535, 2001.

HAAS, D; DÉFAGO, G. Controle biológico de patógenos transmitidos pelo solo por *Pseudomonas fluorescentes*. **Nature reviews microbiology**, v.3, n.4, p.307- 319, 2005.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina. **Embrapa Soja**, 2011.

INAGAKI, M. N.; JUNQUEIRA, C. P.; BELLON, P. P. Desafios da produção de soja orgânica como determinante à implantação de seu cultivo para fins comerciais na Região Oeste do Paraná. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 7, n. 1, p. 682-699, 2018.

JUNIOR, A. F. C.; BORBA, E.; MARTINS, A. L. L.; SOUZA, M. C.; GOMES, F. L.; DE OLIVEIRA, R. S.; CHAGAS, L. F. B. *Bacillus* sp. como promotor de crescimento em soja *Bacillus* sp. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 44, n. 2-3, 2021.

NOVINSKAK, A.; JOLY, D. L.; FIOLON, M. Complete Genome Sequence of the Plant Growth- Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* LBUM677. **Microbiol Resources Announcements**, 8(25), 1-2. 2019.

PACENTCHUK, F.; GOMES, J. M.; DE LIMA, V. A.; MENDES, M. C.; SANDINI, I. E.; JADOSKI, S. O. Efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura da soja. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 12, p.14-16, 2020.

RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.L.; MEDEIROS, V.D.; BARROS, B.G.F. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience journal**, v. 28, n. 1, 2012.

SANTOS, P.; BENATO, L.; DE SOUZA, N.V.; ALMEIDA, A. Utilização de *P. fluorescens* no controle biológico de *Macrophomina phaseolina*. **Embrapa Soja-Documentos** (INFOTECA-E), 2010.

SEIXAS, CDS; MAZARO, S. M.; REY, M. dos S. **Manejo de doenças em sistema de cultivo orgânico**. 2017.

SHOWKAT, S. Controle biológico de *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* sp. por *Pseudomonas fluorescens* isoladas do solo da rizosfera de trigo da Caxemira. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 1, n. 4, pág. 24-32, 2012.

SOTTERO A. N. Rizobactérias e alfafa: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, 2006; Vol. 30, No. 2, PP. 225-234.